T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YETİŞKİN LEYDİG HÜCRELERİNİN FARKLANMALARI SIRASINDA OSTEOKALSİN'İN TESTOSTERON VE INSL3 SENTEZİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Gülfidan COŞKUN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT

ADANA-2018

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

YETİŞKİN LEYDİG HÜCRELERİNİN FARKLANMALARI SIRASINDA OSTEOKALSİN'İN TESTOSTERON VE INSL3 SENTEZİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

Gülfidan COŞKUN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT

ADANA-2018

KABUL VE ONAY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

"Yetişkin Leydig Hücrelerinin Farklanmaları Sırasında Osteokalsin'in Testosteron ve INSL3 Sentezine Etkisinin Araştırılması"

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 16 / 04 / 2018

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Sait POLAT
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof.Dr.Ufuk Ö.METE
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof.Dr.Şaban DORAN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof.Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ
Akdeniz Üniversitesi
Üye

Prof.Dr.Ebru BALLI
Mersin Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI

ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 16/04/2018

İMZA

Adı Soyadı

Kayıtlı olunan Program : Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tezin Konusu : Yetişkin Leydig Hücrelerinin Farklanmaları Sırasında Osteokalsin'in Testosteron ve INSL3 Sentezine Etkisinin Araştırılması

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☐ Doktora: X

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof.Dr. Sait POLAT
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon :
E-Posta : spolat@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 05339299503
E-Posta : gcoskun@cu.edu.tr
Adresi : Ç.Ü. Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında her daim bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan, beni cesaretl ğerli danışman hocam, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ş Dr. Sait Polat'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans ve Doktora eğitim-öğretimim boyunca güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen, beni hayata hazırlayan, kendime güvenmemi sağlayan önceki tez danışmanım, Anabilim Dalı Emekli Öğretim Üyesi Sayın Yrd.Doç.Dr.Hülya Özgür'e saygı ve minnetlerimi sunarım.

Teşekkürlerin az kalacağı Anabilim Dalımızın diğer Öğretim Üyeleri ile Tez İzleme Komitesinde bulunan hocalarıma, bana Yüksek lisans ve Doktora eğitimim boyunca kazandırdıkları her şey için şükranlarımı sunarım. Bana kattıkları bu satırlara sığması mümkün olmayan, iyi günde kötü günde yanımda olan değerli mesai arkadaşlarımın hepsine teker teker teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte büyük özveriyle beni destekleyen sevgili eşim Kemal Coşkun'a ve hayatımın her evresinde bana yardımcı olan değerli kardeşim İpek Zülfikaroğlu ile yaşından büyük fedakarlık gösteren, hayattaki en büyük şansım biricik oğlum Hüseyin Aslan Coşkun'a sevgilerimi sunarım. Bugün bu noktada olmamın en büyük nedeni, şimdi bir melek olan sevgili annem Seda Zülfikaroğlu'na ve yine bu süreçte ani kaybıyla derin üzüntü duyduğum sevgili mesai arkadaşım Doktora Öğrencisi Latife Seyran Çelik'e uzaklarda da olsalar sonsuz sevgi ve minnetlerimi sunarım.

Arş. Gör. Gülfidan COŞKUN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL ONAY ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
ETİK BEYANI ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
TEŞEKKÜR iv
İÇİNDEKİLER v
ÇİZELGELER DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ xi
ÖZET xiii
ABSTRACT xv
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Leydig Hücreleri 4
2.1.1. Fetal Leydig Hücreleri 5
2.1.2. Yetişkin Leydig Hücreleri 7
2.1.2.1. Stem (Kök) Leydig Hücreleri 7
2.1.2.2. Progenitör (Öncül) Leydig Hücreleri 8
2.1.2.3. İmmatur (Olgun olmayan) Leydig Hücreleri 9
2.1.2.4. Yetişkin Leydig Hücreleri 10
2.1.3. Leydig Hücre Fonksiyonlarının Düzenlenmesi 11
2.2. Etan Dimetan Sülfonat (EDS) 16
2.3. Steroidogenezis 18
2.3.1. Testosteron 22
2.4. Gonadotropin Releasing Hormon Antagonisti (GnRH antagonisti) 25
2.5. Osteokalsin 27
2.6. INSL3 34
3. GEREÇ ve YÖNTEM 39
3.1. Deney Düzeneği 39
3.2. Kullanılan Kimyasallar 41

3.3. Işık Mikroskopi Yöntemleri 42
3.4. İmmünohistokimya Yöntemleri 42
3.4.1. İmmunohistokimyasal Skorlama Yöntemi 44
3.5. Elektron Mikroskopi Yöntemleri 44
3.6. Biyokimyasal Analiz 46
3.7. İstatiksel Analiz 46
4. BULGULAR 47
4.1. Işık Mikroskobik Bulgular 47
4.1.1. Grup 1A: Kontrol grubu 47
4.1.2. Grup 1B: GnRH antagonisti uygulanan grup 47
4.1.3. Grup 1C: GnRH antagonisti ve Osteokalsin uygulanan grup 48
4.1.4. Grup 1D: Osteokalsin uygulanan grup 48
4.1.5. EDS ile indüklenmiş Leydig hücre hasarı grubu 49
4.1.6. Grup 2A: Kontrol grubu 49
4.1.7. Grup 2B: GnRH antagonisti uygulanan grup 50
4.1.8. Grup 2C: GnRH antagonisti ve Osteokalsin uygulanan grup 50
4.1.9. Grup 2D: Osteokalsin uygulanan grup 50
4.2. İmmunohistokimya Bulguları 51
4.2.1. Grup 1 3βHSD İmmünohistokimyasal Bulgular 53
4.2.2. Grup 1 INSL3 İmmünohistokimyasal Bulguları 54
4.2.3. Grup 1 GPRC6A İmmünohistokimyasal Bulguları 55
4.2.4. EDS ile indüklenmiş Leydig hücre hasarı grubu 56
4.2.5. Grup 2 3βHSD İmmünohistokimyasal Bulgular 57
4.2.6. Grup 2 INSL3 İmmünohistokimyasal Bulgular 58
4.2.7 Grup 2 GPRC6A İmmünohistokimyasal Bulgular 59
4.2.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme 60
4.3. Elektron Mikroskobik Bulgular 63
4.3.1. Grup 1A: Kontrol grubu 63
4.3.2. Grup 1B: GnRH antagonisti uygulanan grup 64
4.3.3. Grup 1C: GnRH antagonisti ve Osteokalsin uygulanan grup 67
4.3.4. Grup 1D: Osteokalsin uygulanan grup 69
4.3.5. EDS ile indüklenmiş Leydig hücre hasarı grubu 71

4.3.6. Grup 2A: Kontrol grubu 71
4.3.7. Grup 2B: GnRH antagonisti uygulanan grup 73
4.3.8. Grup 2C: GnRH antagonisti ve Osteokalsin uygulanan grup 75
4.3.9. Grup 2D: Osteokalsin uygulanan grup 77
4.4. Biyokimyasal Bulgular 79
5. TARTIŞMA 81
6. SONUÇLAR 91
KAYNAKLAR 93
ÖZGEÇMİŞ 108

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No: **Sayfa No:**

Çizelge 1. Prepubertal dönem için uygulama tablosu. 40
Çizelge 2. Postpubertal dönem için uygulama tablosu. 41
Çizelge 3. Işık mikroskobik doku takip işlemi. 42
Çizelge 4. Elektron mikroskobik doku takibinde dehidratasyon, şeffaflandırma ve immersiyon işlemi... 45
Çizelge 5. Gömme materyalinin hazırlanışı. 45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No: **Sayfa No:**

Şekil 1. Postnatal yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim basamakları. 11

Şekil 2. İnsan ve farede steroidogenez süreci. 21

Şekil 3. Doğal GnRH ve üçüncü nesil GnRH antagonisti (Cetrorelix ve Ganirelix) amino asit sekansları 27

Şekil 4. Osteoblastlarda osteokalsin sentezi 32

Şekil 5. Osteokalsinin endokrin fonksiyonları 33

Şekil 6. Testiste osteokalsin aracılı testosteron üretimi. 33

Şekil 7. Postnatal dönemde sıçanların LH, Testosteron (T) ve INSL3 konsantrasyonları. 38

Şekil 8. Grup 1 deneklerine ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik görünümü. 48

Şekil 9. Tek doz EDS uygulamasından 4 gün sonra sakrifiye edilen deneklere ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik görünümü. 49

Şekil 10. Grup 2 deneklerine ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik görünümü. 51

Şekil 11. 3βHSD immünreaktivitesi. 52

Şekil 12. INSL3 immünreaktivitesi. 52

Şekil 13. GPRC6A immünreaktivitesi. 53

Şekil 14. Grup 1 3βHSD immünreaktivitesi. 54

Şekil 15. Grup 1 INSL3 immünreaktivitesi. 55

Şekil 16. Grup 1 GPRC6A immünreaktivitesi. 56

Şekil 17. EDS enjeksiyonu sonrasında 4. gün sakrifiye ettiğimiz deneklere ait testis doku kesitlerinde 3βHSD, INSL3**,** GPRC6A immünreaktivitesi 57

Şekil 18. Grup 2 3βHSD immünreaktivitesi. 58

Şekil 19. Grup 2 INSL3 immünreaktivitesi. 59

Şekil 20. Grup 2 GPRC6A immünreaktivitesi. 60

Şekil 21. Grup 1 ve Grup 2 deneklerinin testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinin 3βHSD INSL3 ve GPRC6A immünreaktivite skorlarının istatistiksel değerlendirmesi. 62

Şekil 22. Grup 1 ve Grup 2 deneklerinin testis doku kesitlerinde 3βHSD pozitif Leydig hücre sayısının istatistiksel değerlendirmesi 63

Şekil 23. Grup 1A testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. 64

Şekil 24. Grup 1B testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. 66

Şekil 25. Grup 1C testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. 68

Şekil 26. Grup 1D testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü.. 70

Şekil 27. Tek doz EDS uygulamasından 4 gün sonra sakrifiye edilen deneklere ait testis doku kesitlerinin elektron mikroskobik görünümü.. 71

Şekil 28. Grup 2A testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü.. 73

Şekil 29. Grup 2B testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü.....74
Şekil 30. Grup 2C testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü.....76
Şekil 31. Grup 2D testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. 78
Şekil 32. Tek doz EDS uygulamasından 4 gün sonra sakrifiye edilen deneklerin serum testosteron, LH ve ucOC değerlerinin istatistiksel değerlendirmesi. 79
Şekil 33. Grup 1 ve Grup 2 deneklerinin serum testosteron, LH ve ucOC seviyelerinin istatistiksel değerlendirmesi.....80

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

HPG : Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal Aks
OC : Osteokalsin
INSL3 : İnsülin Benzeri Faktör-3
LH : Lüteinizan Hormon
FSH : Follikül Stimülan Hormon
AR : Androjen Reseptörü
hCG : İnsan Koryonik Gonadotropin
EDS : Etan Dimetan Sülfonat
SRY : Sex-determining Region Y
SF1 : Steroidojenik Faktör-1
WT1 : Wilms Tümor-1
GATA-4 : GATA Binding Protein-4
DHH : Desert Hedgehog
PDGFα : Platelet Kökenli Büyüme Faktörü-Alfa
PDGFRα : Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü-Alfa
Arx : X-Linked Aristaless-Related Homebox Gene
COUPTFII : Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II
3βHSD : 3-Beta Hidroksisteroid Dehidrogenaz
17βHSD : 17-Beta Hidroksisteroid Dehidrogenaz
LHR : Lüteinizan Hormon Reseptörü
IGF-1 : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
StAR : Steroidojenik Akut Regülatör Protein
LİFR : Lökemi İnhibitör Faktör Reseptörü
SER : Agranüler Endoplazmik Retikülüm
GER : Granüler Endoplazmik Retikülüm
VCAM-1 : Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
PTC1 : Patched-1
FGF-9 : Fibroblast Büyüme Faktörü-9
TGFβ-1 : Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta-1

AMH : Antimüllerian Hormon

TNF-α : Tümör Nekroz Faktör-Alfa

IL-1 : İnterlökin-1

IL-6 : İnterlökin-6

IL-1β : İnterlökin 1-Beta

GPRC6A : G Protein-Coupled Receptor 6a

CREB : cAMP Response Element Binding Protein

NOS : Nitrik Oksit Sentaz

Mfn 2 : Mitofusin-2

ATP : Adenozin Trifosfat

PK-A : Protein Kinaz-A

TSPO : Translokatör Protein

PBR : Periferal Tip Benzodiazepine Reseptör

DHEA : Dehidroepiandrostenedion

SHBG : Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin

OPG : Osteoprotegerin

GnRH : Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

Gla : Gamma Karboksiglutamik Asit

BGLAP : Kemik Gla protein

VDRE : Vitamin D Response Element

cOC : Karboksile Osteokalsin

ucOC : Ankarboksile Osteokalsin

ER-α : Östrojen Reseptörü-Alfa

ER-β : Östrojen Reseptörü-Beta

RLN : Relaksin

RLF : Relaksin Benzeri Faktör

Ley-IL : Leydig İnsülin Benzeri Peptid

RXFP2 : Relaksin Ailesi Peptid Reseptörü-2

GREAT : G-protein Coupled Receptor Affecting Testis Descent

MPW : Maskülinizasyon Programlama Penceresi

ÖZET

Yetişkin Leydig Hücrelerinin Farklanmaları Sırasında Osteokalsinin Testosteron ve INSL3 Sentezine Etkisinin Araştırılması

Testosteron, üreme sistemi başta olmak üzere çeşitli organ ve dokuların fonksiyonlarında rol oynayan önemli bir steroid hormondur. Testosteronun insan hayatı boyunca iskelet gelişimi ve kemik sağlığı için gerekli olduğu bilinmektedir. Kemik metabolizmasında kritik role sahip bir diğer hormon olan İnsülin Benzeri Faktör-3 (INSL3), testosteron gibi prenatal ve postnatal dönemde Leydig hücrelerinde üretilir. INSL3 ekspresyonunun, Leydig hücrelerinin gelişim sürecini ve fonksiyon kapasitelerini yansıttığı bilinmektedir. Ancak literatürde testisteki sentezi ve regülasyonuna ilişkin henüz yeterli kanıt bulunmamaktadır. Kemik yapımından sorumlu osteoblastlardan salınan Osteokalsin (OC) de pankreasta B hücre proliferasyonu ve insülin sekresyonunu uyarması dışında, Hipotalamo-Hipofiziyer-Gonad (HPG) aksından bağımsız olarak, testiste Leydig hücrelerinde testosteron üretimini indüklemektedir. Fetal ve yetişkinlik döneminde 2 farklı jenerasyondan gelişen Leydig hücreleri, proliferasyon ve farklanmalarını pubertede tamamlarlar. Çok sayıda çalışmada postnatal normal gelişim süreci dışında, Etan Dimetan Sülfonat (EDS) uygulaması sonrasında yetişkin Leydig hücre popülasyonunun elimine edildiği ve tekrar prolifere oldukları rapor edilmiştir. Literatürde kemik ve testis arasındaki ilişkiyi destekleyen birçok çalışma bulunmasına rağmen, OC'in Leydig hücre gelişimine ve bu süreçte testosteron ve/veya INSL3 sentezi üzerine olası etkileriyle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada yetişkin Leydig hücrelerinin farklanmaları sırasında, testosteron ve INSL3 sentezinin OC aracılı regülasyonun incelenmesi ve OC'in olası etkilerinin Lüteinizan Hormon (LH) ile karşılaştırılması amaçlandı.

Otuz iki adet prepubertal sıçan ile EDS enjeksiyonu yapılan 40 adet yetişkin sıçandan oluşan 2 ana grup oluşturuldu. Her bir grup kendi içinde 4 alt gruba ayrıldı. Postnatal 35-63. günler ile EDS uygulamasını takip eden 35.-63. günler arasında, bu alt gruplara Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) antagonisti ve/veya OC uygulamaları yapıldı. Yetişkin Leydig hücrelerinin gelişimini tamamladıkları 63. günün sonunda, sakrifiye edilen deneklerden elde edilen testis doku örnekleri, ışık ve elektron mikroskobik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelendi.

Yalnızca GnRH antagonisti uygulanan gruplara ait testis doku kesitlerinde, ışık ve elektron mikroskobik düzeyde seminiferöz tübüller ve Leydig hücrelerinde belirgin dejenerasyon, 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A ekspresyonları ile Leydig hücre sayısı ve serum LH, testosteron, ucOC (Ankarboksile Osteokalsin) seviyelerinde belirgin bir azalma izlendi. GnRH antagonisti ile osteokalsin uygulanan grupların testis doku kesitlerinde ise, ışık ve elektron mikroskobik düzeyde kısmen bir düzelmenin olduğu, 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A ekspresyonlarında ve serum testosteron seviyesinde kısmi bir artışın gerçekleştiği tespit edildi. Yalnızca osteokalsin uygulanan gruplara ait testis doku kesitlerinin ışık ve elektron mikroskobik bulgularının kontrol gruplarına benzediği görüldü. Leydig hücre sayısında anlamlı bir farklılık görülmezken, INSL3 ve GPRC6A

ekspresyonlarında ve serum testosteron, ucOC seviyelerinde anlamlı bir artışın varlığı dikkati çekti.

Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde; yetişkin Leydig hücrelerinin normal postnatal gelişim süreci ve EDS uygulaması sonrası rejenerasyonları sırasında, yalnızca osteokalsin uygulamasının, Leydig hücre sayısında anlamlı bir farklılık oluşturmadığı, ancak mevcut Leydig hücrelerinin fonksiyonunu artırıcı yönde etki ederek, testosteron seviyesini yükselttiği belirlendi. Osteokalsin-testosteron ve osteokalsin-INSL3 arasındaki pozitif ilişkinin, in vivo koşullarda LH'dan tamamen bağımsız olmadığı sonucuna varıldı.

<u>Anahtar Kelimeler:</u> Leydig hücresi, EDS, Osteokalsin, Testosteron, INSL3

ABSTRACT

Effects of Osteocalcin on Synthesis of Testosteron and INSL3 During Adult Leydig Cell Differentation

Testosterone is an important steroid hormone that plays a role in the functions of various organs and tissues, especially the reproductive system. Testosterone is known to be essential for skeletal development and bone health throughout human life. Insulin Like Factor-3 (INSL3) is an another hormone that plays a critical role in bone metabolism, produced by prenatal and postnatal Leydig cells such as testosterone. It is known that INSL3 expression reflects the development process and functional capacities of Leydig cells. However, there is not enough evidence in the literature about its synthesis and regulation in the testis. Osteocalcin (OC) released from osteoblasts responsible for stimulating pancreatic B cell proliferation and insulin secretion, induces testosterone production in Leydig cells independent from HPG (Hypothalamo-Pituitary-Gonad) except for bone formation. Leydig cells that develop from 2 different generations during fetal and adulthood, complete their proliferation and differentiation mainly in puberty. In many studies, it has been reported that the adult Leydig cell population is eliminated and regenerated by Ethane Dimethane Sulphonate (EDS) administration, except for the postnatal normal developmental process. Although there are many studies supporting the relationship between bone and testis in the literature, any studies have been encountered about the possible effects of OC on testosterone and/or INSL3 synthesis during Leydig cell development. In this study, it was aimed to investigate OC-mediated regulation of testosterone and INSL3 synthesis and compare the possible effects of OC and LH (Luteinizing Hormone) during differentiation of adult Leydig cells.

Rats were divided into 2 groups: 32 prepubertal rats and 40 adult EDS injected rats. Each group was divided into 4 subgroups. Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) antagonist and/or OC were applied to these subgroups between prepubertal 35-63 days and between 35-63 days following EDS administration. At the end of the 63th day when adult Leydig cells completed their development, testicular tissue samples obtained from the sacrificed rats were examined by light and electron microscopic, immunohistochemical and biochemical methods.

Significant degeneration in seminiferous tubules and Leydig cells in light microscopic and electron microscopic levels, down-regulation in 3βHSD, INSL3 and GPRC6A expressions, reduction in Leydig cell counts and serum LH, testosterone, ucOC levels were observed in testicular tissue sections of GnRH antagonist treated groups. Slight up-regulation in 3βHSD, INSL3 and GPRC6A expressions, increase in serum testosterone levels with a partial improvement in light and electron microscopic levels were observed in the testis tissue sections of the groups treated with GnRH antagonist and osteocalcin. Light and electron microscopic findings of testicular tissue sections in osteocalcin-treated groups were similar to control groups. While there was no significant difference in the number of Leydig cells, the presence of a significant increase in INSL3 and GPRC6A expressions, serum testosterone and ucOC levels were remarked.

When all the findings are evaluated together; it was determined that the

application of osteocalcin did not make a significant difference in the number of Leydig cells, but increases the level of testosterone by improving the function of existing adult Leydig cells during normal postnatal developmental process and post-EDS regeneration. This positive association between osteocalcin-testosterone and osteocalcin-INSL3 was concluded to be independent from LH in vivo conditions.

Keywords: **Leydig cell, EDS, Osteocalcin, Testosterone, INSL3**

1. GİRİŞ

Organizmada homeostazis; farklı organ ve dokular arasındaki karşılıklı uyum ve işbirliği ile düzenlenmektedir. Kemik kütlesi, enerji metabolizması ve üreme fonksiyonları arasında da homeostatik bir denge söz konusudur. Genetik, fizyolojik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı bu dinamik yapıda meydana gelen herhangi bir aksaklık durumunda, infertilite başta olmak üzere, pek çok sistemik bozukluğun ortaya çıktığı bilinmektedir.

Modern dünyanın primer sorunlarından biri olan infertilite, %50 oranında erkek kökenli problemlerden kaynaklanır (1,2,3). Erkek infertilite nedenlerinin %40-50'sinde, herhangi bir spesifik etiyolojik faktör bulunamazken, geri kalan infertilite nedenleri arasında, HPG aksında ve erkek genital organlarında fonksiyon bozuklukları yer almaktadır (2,3,4,5). Erkek fertilitesi için normal bir spermatogenez sürecine ek olarak, başarılı bir epididimal sperm maturasyonu, depolanması ve taşınması dışında, aksesuar bezlerin desteği ile sağlıklı işleyen bir HPG aksı gereklidir (2). Spermatogenezin ve erkek üreme sisteminin düzenlenmesinde rol oynayan esas faktör ise testosterondur. Testiste Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosteron, çeşitli organ ve dokuların fonksiyonlarında rol oynayan önemli bir steroid hormondur. Testosteron eksikliğinde; kas hacminde ve kemik mineral yoğunluğunda azalma, yağ kütlesinde artış, hipertansiyon, insülin direnci ve depresyon gözlenir. Tüm bu semptomlar arasında en belirgin görüleni ise seksüel fonksiyon bozuklukları olup, erkeklerin hayat kalitesini etkilemektedir. Bu nedenle klinikte, yaşlanma veya çeşitli nedenlerle gelişen hipogonadizme karşı yaygın olarak testosteron replasman tedavisi uygulanmaktadır. Ancak son 10 yılda yapılan çalışmalarda, artan ekzojen testosteron kullanımı sonucu, böbrek fonksiyon bozuklukları ve kardiyovasküler yan etkilerin ortaya çıktığı rapor edilmiştir (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

Seks steroid hormonlarının, yetişkin hayatı boyunca üreme fonksiyonları dışında, iskelet gelişimi ve kemik sağlığı için gerekli olduğu, pek çok çalışmada gösterilmiştir (9, 12, 13). Bu durum, kemiğin de steroid hormonların sentez ve sekresyonlarını regüle ettiğine ilişkin hipotezlerin kurulmasına sebep olmuştur. Kemik yapımından sorumlu osteoblastlar tarafından üretilen ve multifonksiyonel bir hormon olan osteokalsinin, LH'dan bağımsız olarak, testiste testosteron üretimini artırarak erkek

fertilitesini düzenlediği ve germ hücre apopitozunu engellediği, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda ileri sürülmüştür (14, 15). Ayrıca OC'in pankreasta B hücre proliferasyonu ve insülin sekresyonunu uyardığı, karaciğer, kas ve beyaz yağ dokusunda insülin duyarlılığı oluşturduğu rapor edilmiştir (16, 17, 18).

Kemik metabolizmasında kritik role sahip bir başka hormon ise INSL3'tür. INSL3; testosteron gibi prenatal ve postnatal dönemde Leydig hücreleri tarafından üretilmektedir. Yetişkinlik döneminde uzun süreli LH sekresyonları ile regüle olduğu bilinen INSL3'ün, Leydig hücre gelişiminin ve fonksiyonlarının bir belirteci olarak görev gördüğü de rapor edilmiştir (19, 20, 21). Bununla birlikte INSL3'ün testisteki sentezi ve düzenlenmesi günümüzde hala tam olarak aydınlatılamamıştır.

Testosteron ve INSL3 sentezinden sorumlu Leydig hücreleri; fetal Leydig hücreleri ve yetişkin Leydig hücreleri olmak üzere 2 farklı hücre popülasyonundan gelişmektedir. Fetal Leydig hücreleri; fetal ve neonatal yaşam boyunca gözlenirken, yetişkin Leydig hücreleri, postnatal 7. günden başlayıp puberteye kadar devam eden, steroidojenik enzimleri ve mitotik aktiviteleri birbirinden farklı, 4 belirgin hücresel aşamada gelişimlerini tamamlar. Bu aşamalar; stem Leydig hücreleri, progenitor Leydig hücreleri, immatür Leydig hücreleri ve yetişkin Leydig hücreleridir. Yapılan çalışmalarda, postpubertal dönemde EDS uygulaması ile yetişkin Leydig hücre popülasyonunun elimine edildiği ve ardından stem Leydig hücreden başlamak üzere, 7-10 hafta içinde tekrar prolifere oldukları rapor edilmiştir. Bu nedenle, yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim süreçlerinin incelenebilmesinde en uygun modelin, EDS uygulanan hayvan modelleri olduğu belirtilmiştir (22, 23, 24, 25).

Son yıllarda kök hücre teknolojisi ve rejeneratif tıp alanındaki ileri araştırmalar sonucunda, testiküler hücre tipleri ve bunların orijinleri belirlenmiş ve testis fonksiyon bozukluklarının tedavisinde yeni terapötik stratejilerle infertil ve subfertil erkeklerde fertilitenin gelişmesi sağlanmıştır (1). Stem Leydig hücrelerinden yetişkin Leydig hücrelerinin farklanmasını sağlayan parakrin faktörlerin ve sinyal yolaklarının ortaya konulması, herhangi bir sebeple azalan Leydig hücre sayısı ve bozulan Leydig hücre fonksiyonlarının tedavisinde, farmakolojik ve/veya beslenme ile ilgili yeni yaklaşımların geliştirilmesini sağlamıştır (1). Yapılan deneysel çalışmalarda, Leydig hücre sayı ve fonksiyonlarını artırmaya yönelik OC aracılı yeni sinyal yolaklarının ortaya çıkarılması ile OC'in erkek fertilitesini düzenlemede yeni bir terapötik ajan

olabileceği düşünülmüştür (14,15). Literatürde Leydig hücrelerinin gelişim sürecinde OC, testosteron ve INSL3 arasındaki ilişkiyi ortaya koyan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Sunulan bu çalışmada, normal gelişim sürecinde ve postpubertal EDS uygulaması sonrasında OC'in, yetişkin Leydig hücrelerinde testosteron ve INSL3 sentezine etkilerini ışık ve elektron mikroskobik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi ile OC'in bu olası etkilerinin LH ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Leydig Hücreleri

İlk kez 1850 yılında Franz von Leydig tarafından seminiferöz tübüller arasındaki hücre kümeleri şeklinde tanımlanan Leydig hücreleri; esas olarak 1854 yılında Rudolph Albert Kölliker tarafından yuvarlak şekilleri ve sitoplazmalarındaki vakuoller, yağ ve pigment granülleri ile karakterize edilmişlerdir (1,10). 1903 yılında ise Bouin ve Ancel tarafından spermatogenezde ve sekonder seks karakterlerinin oluşumunda görev aldıkları ve testiküler hormonları sentezledikleri rapor edilmiştir (10).

Belirgin bir çekirdek ve 1-2 çekirdekçik içeren, büyük poligonal şekilli ve yaklaşık olarak 15 µm çapında eozinofilik hücreler olan Leydig hücreleri; düzensiz hücre toplulukları şeklinde, seminiferöz tübüllerin etrafındaki interstisyal alanda yerleşim gösterirler. Total testiküler hacmin yaklaşık %12-15'ini kaplayan interstisyal alan; Leydig hücreleri dışında, kan damarları, lenfatikler, sinir lifleri, bağ dokusu elemanları ve makrofajları içerir (1, 27, 28). Yetişkin sıçan testisinde yaklaşık $50X10^6$ adet Leydig hücresi bulunurken, yetişkin insan testisinde bu sayı, $200X10^6$'ya kadar ulaşmakta ve interstisyal alanın yaklaşık %10-20'sini oluşturmaktadır (1, 29). Steroid hormon sentezleyen birçok hücre gibi Leydig hücreleri de, sitoplazmalarında yaygın lipid damlacıkları, karakteristik tübüler kristalı mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş agranüler endoplazmik retikülümlere sahiptir. İnsan Leydig hücre sitoplazmasında spesifik olarak çubuk şekilli olan ve fonksiyonları henüz bilinmeyen, Reinke kristalleri olarak adlandırılan inklüzyonlar da bulunur (1, 27, 28).

Yapılan fonksiyonel ve morfolojik çalışmalarda, testiste testosteron ve diğer steroid hormonların üretiminden sorumlu olan Leydig hücrelerinin, fetal hayattan yetişkinliğe kadar, 2 ayrı hücre hattı olan fetal ve yetişkin Leydig hücre popülasyonundan geliştiği gösterilmiştir (30, 31, 32, 33). Bunun yanında, insanlarda neonatal dönemde infantil (neonatal) Leydig hücreleri olarak adlandırılan, farklı bir Leydig hücre popülasyonunun daha bulunduğu da rapor edilmiştir (30, 34, 35, 36). Fetal Leydig hücreleri, androjen üreterek fetusun maskulinizasyonunda rol oynarken, yetişkin Leydig hücreleri tarafından sentezlenen androjen; spermatogenez, cinsel dürtüler ve erkek sağlığı için oldukça önemlidir (30, 31, 32, 33).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda Leydig hücrelerinin kökeni henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Literatürde Fetal ve yetişkin Leydig hücre popülasyonlarının ortak öncül (prokürsör) hücrelerden geliştiğine dair çok sayıda hipotez mevcuttur. Fetal Leydig hücrelerinin doğumdan sonra gerilediği ve onlarla ortak prokürsör hücrelerden farklanan yetişkin Leydig hücrelerinin ise puberteye kadar sessizliğini koruduğu bilinmektedir. Buna paralel olarak androjen sentezinin doğum sonrası azaldığı ve çocukluk dönemindeki uzun steroidojenik sessizlikten sonra, pubertede yetişkin Leydig hücrelerinin farklanmasının tamamlanması ile yetişkin hayatta gereken androjen üretiminin sağlandığı bildirilmiştir (30, 35, 37, 38, 39).

2.1.1. Fetal Leydig Hücreleri

Fetal Leydig hücrelerinin gelişimleri; farklanma, maturasyon ve involusyon olmak üzere 3 basamakta gerçekleşir. Farklanma süreçleri, uzun yıllardır tartışma konusu olmakla birlikte, son araştırmalarda 4 farklı orijinden geliştikleri rapor edilmiştir (40). Bu çalışmalarda fetal Leydig hücrelerinin, adrenogonadal primordiyum (41), nöral krest (42), mezonefrik hücreler (40, 43) veya kölomik epitelden (43,44) köken aldıkları bildirilmiştir (45).

Mezonefroza komşu kölomik epitelin prolifere olması ile gelişen primordial gonadların testis yönünde farklanmaları; Y kromozomunda bulunan SRY (Sex-determining Region Y) geninin ekspresyonu ile başlar. Bu aşamada primordial gonadlar; primordial germ hücreleri dışında somatik progenitor hücreleri de içermektedir. Steroidojenik Faktör-1 (SF1), Wilms Tümör-1 (WT1) ve GATA Binding Protein 4 (GATA-4) eksprese eden somatik progenitor hücreler; Sertoli hücreleri ve fetal Leydig hücrelerinin kökenini oluşturur (37, 41, 46, 47, 48, 49). Tüm steroidojenik dokuların farklanması için gerekli olan SF1; fetal Leydig hücrelerinin gelişim ve dağılımları ile birlikte, hücrelerdeki biyosentetik enzimlerin ekspresyonlarını da kontrol etmektedir (41, 49).

Fetal Leydig hücreleri, sıçanlarda E14,5. günde ve insanlarda testiküler kordonların oluşumunu takiben gebeliğin 6-7. haftalarında ortaya çıkarlar (30, 39, 50). Meydana gelmeleri, Sertoli hücreleri tarafından üretilen Desert Hedgehog (DHH) ve Platelet Kökenli Büyüme Faktörü-Alfa (PDGFα)'ya bağlıdır. DHH veya Platelet Kökenli Büyüme Faktörü Reseptörü-Alfa (PDGFRα)-/- embriyolarla yapılan

çalışmalarda, fetal Leydig hücrelerinde azalma ve anormal testiküler kord organizasyonu rapor edilmiştir (51, 52, 53). Fetal Leydig hücrelerinin farklanmalarını regüle eden bir diğer sinyal molekülü olan (Arx (X-linked Aristaless-Related Homebox Gene) eksikliğinde de benzer şekilde, fetal Leydig hücre sayısında azalma kaydedilmiştir (54). COUPTFII (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II) ise fetal Leydig hücrelerinde, SF1 bağımlı steroidojenik gen ekspresyonlarını baskılamaktadır. Etkisi ortadan kalktığında, fetal Leydig hücrelerinin fonksiyonel maturasyonunun gerçekleştiği ve fetal maskulinizasyon için gereken testosteronun üretildiği belirlenmiştir (55, 56).

Testisler, adenohipofizden salınan bir gonadotropin olan LH'un kontrolü altında işlev görürler. Yetişkin Leydig hücre popülasyonunun normal fonksiyonları için LH şarttır, ancak fetal Leydig hücreleri Lüteinizan Hormon Reseptörü (LHR) eksprese etmelerine rağmen, gelişimleri ve steroidojenik aktiviteleri için LH'a ihtiyaç duymazlar (33, 57). Yapılan çalışmalarda prenatal dönemde LHR-/- fareler ile normal fareler arasında, fetal Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron ve testiküler ağırlık arasında bir fark bulunamamıştır (58, 59). Ayrıca LHR-/- fetal farelerde, intrauterin seks farklanmasının LH'dan bağımsız gerçekleştiği, postnatal süreçte ise bu farelerde testis gelişimi, testis inişi, dış genitaller ile aksesuar bezlerin maturasyonunun bloke olduğu ve testosteron seviyesinin azaldığı rapor edilmiştir. Böylelikle fetal Leydig hücre gelişimini etkilemeyen LH'un, postnatal dönemde yetişkin Leydig hücre hattının gelişiminde ve steroidogenez sürecinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (32, 58, 59).

Sıçanlarda LH, ilk kez E17,5. günde, fetal Leydig hücrelerinin farklanmalarını takip eden 3-4. günde plazmada belirlenir ve E19,5. güne kadar oldukça düşük seviyelerde kalır ve ardından artışa geçer (60). Testosteron üretimi ise, E15,5. günde başlar ve doğumdan hemen önce İnsan Koryonik Gonadotropin (hCG) etkisinde steroidojenik aktivite pik yapar (33, 55, 60, 61, 62). İnsanlarda ise fetal Leydig hücrelerinin farklanmalarına paralel olarak, ilk kez gebeliğin 6-7. haftasında gerçekleşen testosteron ve diğer androjenlerin sentezi 12-14. haftalarda en yüksek seviyesine ulaşır. Gebeliğin 12-20. haftaları arasında erkek fetustaki testosteron seviyesi, dişi fetustakinin 3-8 katıdır (30, 50, 55, 62). Fetal hayatta üretilen testosteron ve diğer androjenler; nöroendokrin fonksiyonlara ek olarak, epididimis, vaz deferens ve seminal vezikül, penis ve skrotum gelişimini de uyarmaktadır (39, 63). Testosteron

üretimi dışında, fetal Leydig hücreleri, erkek iç ve dış genitallerinin gelişimi ve testisin skrotuma iniş için gerekli olan INSL3'ün sentezini de gerçekleştirir (33, 64, 65). Testislerin inişi 2 fazda gerçekleşir; INSL3, ilk faz olan transabdominal fazda rol oynarken, androjenler ikinci faz olan inguinoskrotal faz için gereklidir (64). Bu süreçte meydana gelen anormalliklerin, psödohermafrodism ile sonuçlandığı bildirilmiştir (66).

İnsanlarda gestasyonun 13-16. haftalarında (sıçanlarda E19,5. günde) fetal Leydig hücreleri maksimum sayıları olan $48X10^6$'ya ulaşırlar. Ancak 14-18. haftalarda involusyona girerler ve doğumda yaklaşık $18X10^6$ adet kalırlar (1, 2, 32, 39). Fetal Leydig hücrelerinin gelişim kaderlerine ilişkin çok sayıda teori bulunmaktadır. Yapılan morfolojik, ultrastrüktürel ve kantitatif analizler sonucunda, bazı kaynaklarda postnatal hayatta yine fetal Leydig hücreleri şeklinde devam ettikleri, ancak testosteron üretimine belirgin bir katkı sağlamadıkları rapor edilirken (67, 68), diğer kaynaklarda ise, doğumdan 2-4 hafta sonra dejenere oldukları ve sayıca gerileyerek yerlerini yetişkin Leydig hücre hattına bıraktıkları rapor edilmiştir (40, 45, 69, 70, 71).

2.1.2. Yetişkin Leydig Hücreleri

İnsanlarda doğumdan birkaç ay sonra farklanma sürecine giren yetişkin Leydig hücre hattı, kemirgenlerde doğumdan hemen sonra gelişmeye başlar ve pubertede farklanmasını tamamlar. Kemirgen hayvanlarda yetişkin Leydig hücreleri, steroidojenik enzim ve mitotik aktiviteleri birbirinden farklı, 4 belirgin hücresel aşamada farklanmaktadır (32, 33, 39, 72, 73) (Şekil 1). Bunlar;

1. Stem (Kök) Leydig hücreleri,
2. Progenitör (Öncül) Leydig hücreleri,
3. İmmatur (Olgun olmayan) Leydig hücreleri
4. Yetişkin Leydig hücreleridir.

2.1.2.1. Stem (Kök) Leydig Hücreleri:

Leydig hücrelerinin postnatal gelişimi stem Leydig hücreleri ile başlar. Postnatal 7-14. günlerde peritübüler doku ve perivasküler bölgede yerleşim gösteren, fibroblast benzeri, iğ şekilli mezenşimal hücrelerdir (32, 33, 72, 74, 75). Bu hücreler, in vivo ortamda, kendini yenileme ve farklanma özellikleri dışında, transplante edildiklerinde

interstisyumda kolonize olabilmekte ve in vitro koşullarda da farklanabilmektedirler (75, 76, 77). Bu hücrelerin kökenleri literatürde halen tartışma konusudur. Birçok morfolojik çalışmada, stem Leydig hücrelerinin, seminiferöz tübüllerin peritübüler dokularının interstisyumla sınır oluşturan dış hattında yer alan mezenşimal hücrelerden geliştikleri bildirilirken (39, 74, 75, 78), bazı kaynaklarda testiküler kan damarlarının vasküler düz kasları ve perisitlerden köken aldıkları rapor edilmiştir (39, 75, 79). Leydig hücrelerine özgü markırlardan 3-Beta Hidroksi Steroid Dehidrogenaz (3βHSD) ile LHR eksprese etmeyen stem Leydig hücrelerinin, farklanmalarının başlaması için LH sinyalizasyonuna ihtiyaç yoktur (36, 80, 81). Ancak tiroid hormonu, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1) ve LH içeren mediuma alındıklarında bu hücrelerin prolifere olarak, Steroidojenik Akut Regülatör Protein (StAR) ve LHR pozitif hücreler haline geldikleri ve testosteron ürettikleri bildirilmiştir (72). Ayrıca stem Leydig hücreleri; PDGFRα, GATA-4, c-kit reseptör ve Lökemi İnhibitör Faktör Reseptörü (LIFR) pozitiftirler (33, 72, 76, 77, 80). Bu interstisyal hücrelerin kültür ortamında fenotiplerini farklanmadan 6 ay boyunca korudukları gösterilmiştir (72). Yapılan çalışmalarda stem Leydig hücrelerinin, Leydig hücre hattına ait diğer hücrelere oranla, kemik iliği stem hücrelerine gen ekspresyonları bakımından daha fazla benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir. Ancak kemik iliği stem hücreleriyle kıyaslandığında, ekstrasellüler matriks ve adhezyon molekülleri, Notch sinyalizasyon ve steroidogenez genlerinin ekspresyonlarının, stem Leydig hücrelerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (77). Yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim süreci sırasında, stem Leydig hücreleri postnatal 21. günde, morfolojik olarak benzerlik gösterdikleri, progenitör Leydig hücrelerine farklanırlar (33, 72, 75, 76) (Şekil 1).

2.1.2.2. Progenitör (Öncül) Leydig Hücreleri:

Yüksek proliferasyon yeteneğine sahip, oldukça küçük, iğ şekilli, fibroblast benzeri hücrelerdir. Sıçanlarda, postnatal 21-28. günlerde seminiferöz tübül dış hattında ve perivasküler alanlarda gelişim gösterirler. İnsanda bu hücrelerin 3 yaşından önce ortaya çıktıkları gösterilmiştir (32, 33, 72, 74, 75). Enzim aktivite analizleri ve immünohistokimyasal metodlar kullanılarak stem Leydig hücreleriyle karşılaştırıldığında, progenitör Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında daha az miktarda Agranüler Endoplazmik Retikülüm (SER) içerdikleri ve birçok steroidojenik enzim ile

birlikte, LHR ve Androjen Reseptörü (AR) eksprese ettikleri gösterilmiştir (33, 75 80, 82). Progenitör Leydig hücrelerinde LHR ekspresyonundan önce, steroidojenik enzim ekspresyonunun gelişmesi, farklanma sürecinin başında, Leydig hücrelerinde steroidogenezin LH'dan bağımsız gerçekleştiğini göstermektedir (36, 78, 81). PDGFRα, LIFR ve c-kit ekspresyonu ise yüksek seviyelerde devam etmektedir (33, 72, 80). Yapılan çalışmalarda, hipofizektomi sonrası yüksek dozda LH (83) veya LH analoğu olan hCG (84) uygulamasının, prepubertal sıçanlarda stem Leydig hücrelerden progenitör Leydig hücrelerinin proliferasyon ve farklanmasını uyardığı rapor edilmiştir. Progenitör Leydig hücreleri, 5α-redüktaz içermeleri nedeniyle, diğer Leydig hücrelerine oranla, testosterondan daha fazla androsteron üretirler (82). Hücreler postnatal 35-56. günlerde genişleyip yuvarlaklaşırlar ve proliferatif kapasitelerini azaltarak, immatür Leydig hücrelerine farklanırlar (32, 33, 72, 74, 75) (Şekil 1).

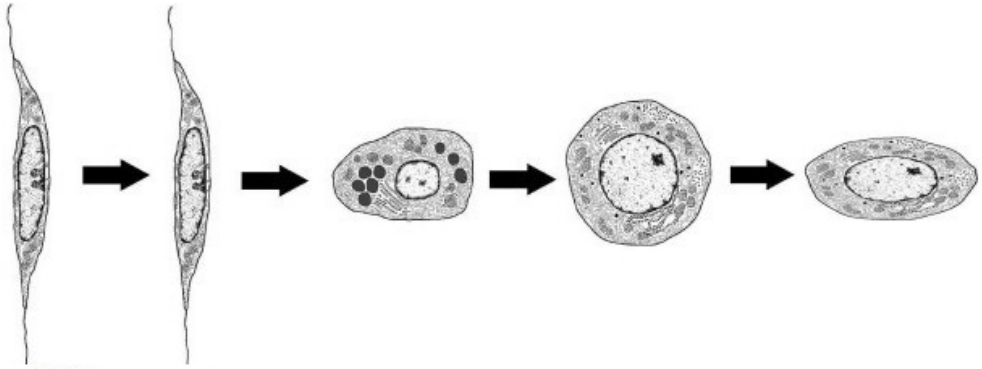
2.1.2.3. İmmatur (Olgun olmayan) Leydig Hücreleri:

Bu hücreler sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacıkları ve yaygın SER sisternaları ile karakterize, büyük ve yuvarlak şekilli hücrelerdir (32, 33, 72, 74, 75). Sıçanlarda postnatal 35-56. günlerde, insanlarda ise prepubertal 3-8 yaşlarında ortaya çıkarlar. Bu dönemde her bir testiste yaklaşık 13-14 milyon immatür Leydig hücresi bulunmaktadır. Proliferasyon kapasiteleri progenitör Leydig hücrelerinden düşüktür. Progenitör Leydig hücrelerine oranla, daha iyi gelişmiş SER içerirler. Androjen metabolize edici enzim aktiviteleri (3αHSD, 5α-redüktaz) yetişkin Leydig hücrelerinden daha fazladır (33, 71, 75, 76, 80, 85). Androjen metabolize edici enzimlerin varlığı nedeniyle, sentezlenen major steroid hormon testosteron değildir. İmmatur Leydig hücrelerinin sentezlediği major steroidler; 5α-androstan-3α,17β-diol'dür (71, 75). Yüksek metabolize edici enzim aktivitelerine paralel olarak, steroidogenez kapasiteleri de yüksek olan immatür Leydig hücreleri, postnatal 56. günde, peritübüler ve perivasküler alanlardan interstisyuma geçerler. Son bir bölünme ile sayılarını ikiye katlamalarının ardından, yetişkin Leydig hücrelerini oluştururlar (32, 33, 71, 75, 76, 86) (Şekil 1).

2.1.2.4. Yetişkin Leydig Hücreleri:

Yetişkin Leydig hücreleri, pubertede immatür Leydig hücrelerinden gelişen ve mitotik aktivite göstermeyen oldukça büyük hücrelerdir (32, 33, 72, 74, 75). Sıçanlarda postnatal yaklaşık 56. günde, insanlarda ise 9-11. yaşlarda farklanan yetişkin Leydig hücreleri, postpubertal dönemde testiste baskın hale geçerler. Terminal farklanmasını tamamlayan Leydig hücreleri, daha fazla prolifere olmazlar. Yetişkinlik dönemine gelindiğinde her bir testiste yaklaşık 25 milyon yetişkin Leydig hücresi bulunur ve bu hücreler, günde yaklaşık 10 mg testosteron üretirler (33, 71, 73, 74, 85). İmmatür Leydig hücreleri ile karşılaştırıldığında, yetişkin Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında SER oranı artmış, ancak lipid damlacıklarının sayıları azalmıştır. Seksüel maturasyon sürecinde bütün steroidojenik enzimleri çok yüksek seviyelerde eksprese ettiklerinden dolayı, steroid hormon üretiminde de belirgin bir artış gözlenmiştir (33, 70, 76, 82) (Şekil 1). Fetal Leydig hücreleri gibi farklanmasını tamamlayan yetişkin Leydig hücrelerinde de ana steroid ürün olan testosteronun yanı sıra, INSL3 sentezi de gerçekleşmektedir.

Testosteron, erkek üreme fonksiyonlarının devamlılığı ve spermatogenez için esastır (33, 75). Yapılan çalışmalarda 90 günlük sıçanların yetişkin Leydig hücrelerinde testosteron üretiminin, 21 günlük progenitör Leydig hücrelerinde üretilenden 150 kat, 35 günlük sıçanların immatür Leydig hücrelerinde üretilen miktardan ise 5 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (71, 86). Testosteron üreterek, puberteyi düzenleyen ve erkek fenotipinin devamlılığını sağlayan yetişkin Leydig hücreleri; INSL3 sentezleyerek, germ hücre canlılığında ve kemik metabolizmasında da rol almaktadır (87). Bu nedenle yetişkin Leydig hücrelerinin tanımlanmasında klasik olarak 3βHSD ve LHR dışında, INSL3 ekspresyonu da kullanılmaktadır (36).



	Stem Leydig Hücre	Progenitor Leydig Hücre	İmmatur Leydig Hücre	Yetişkin Leydig Hücre	Yaşlı Leydig Hücre
Mitotik Aktivite	Düşük	Yüksek	Bir kere	-	-
Morfoloji	İğ şeklinde	İğ şeklinde	Yuvarlak, Büyük lipid damlacıklı	Yuvarlak, Küçük lipid damlacıklı	Yuvarlar, Küçük lipid damlacıklı
Agranuler ER	Düşük	Düşük	Yüksek	En yüksek	Yüksek
Testosteron	-	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
Yaş	7 gün	21 gün	35 gün	56 gün	20 ay
LHR	-	Düşük	Orta	Yüksek	Orta
AR	-	Yüksek	Yüksek	Düşük	-

Şekil 1. Postnatal yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim basamakları (33).

2.1.3. Leydig Hücre Fonksiyonlarının Düzenlenmesi

Yüksek adaptasyon ve farklanma kabiliyetine sahip yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim süreçleri; endokrin ve parakrin faktörlerin kontrolü altında olup, farklı basamaklarda farklı morfolojik değişimler sergilerler. Fetal Leydig hücrelerinden farklı olarak, pubertal ve postpubertal dönemde, yetişkin Leydig hücrelerinin maturasyon ve fonksiyonlarını düzenleyen en önemli anahtar düzenleyicilerden birisi LH'dur. Testiste gametogenez dışında, steroidogenez sürecinde de rol oynayan LH; Leydig hücre membranındaki LHR'ne bağlanarak steroidogenez için gereken sinyal yolağını başlatır (1, 88). LH bu aşamada, steroid hormon üretim kapasitesini artırmak için gereken SER, mitokondriyon ve peroksizom gibi organellerin fonksiyon görmesi için şarttır (36, 81). Leydig hücre hattında ilk LHR ekspresyonu, postnatal 21-28. günlerde, progenitör Leydig hücrelerinin farklanmasıyla, steroidojenik enzim ekspresyonlarını takiben gerçekleşmektedir. (36, 78, 81). Aynı dönemde LH seviyesinin düşük olması, yetişkin Leydig hücrelerinin LH'dan bağımsız olarak farklanmaya başladıklarını göstermektedir

(36, 80, 81). Nitekim LHR mutasyonuna sahip transgenik farelerde de, neonatal dönemde testis gelişiminin, fetal Leydig hücre sayısının ve testosteron seviyesinin normal olması, fetal Leydig hücrelerinin tamamen gonadotropinlerden bağımsız geliştiğinin bir göstergesidir. Aynı çalışmada postnatal süreçte hipogonadizme bağlı olarak aksesuar genital organların gelişiminde ve spermatogenezde aksaklığın meydana geldiği rapor edilmiştir (57, 59). LH ve Follikül Stimülan Hormon (FSH)'un baskılanması da, benzer şekilde, yetişkin erkeklerde testosteron seviyesinde azalmaya ve spermatojenik gerilemeye neden olmuştur (89). Ancak gonadotropin baskılanması yapılan farelere ekzojen testosteron verilmesi sonucunda, normal spermatogenezin geliştiği gözlenmiştir (90). Hipogonadal fareler (91) ve hipofizektomi yapılan maymunlarda (92) da, ekzojen androjen uygulamasının, hCG, LH ve FSH seviyelerini artırdığı, Leydig hücrelerini stimüle ederek testosteron sentezini uyardığı ve spermatogenezi desteklediği gösterilmiştir (93, 94).

Fetal Leydig hücreleri ile yetişkin Leydig hücrelerinin karşılaştırıldığı çalışmalarda; 3βHSD, 17-β-Hidroksi Steroid Dehidrogenaz (17βHSD), prostaglandin sentetaz, östrojen sülfotransferaz ve Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1) ekspresyonlarının yalnızca yetişkin Leydig hücrelerinde gözlendiği, fetal Leydig hücre popülasyonunda eksprese olmadıkları gösterilmiştir. Gonadotropin baskılanması yapılan yetişkin sıçanlarda bu markırların ekspresyonu, Leydig hücrelerinin farklanmalarının başlangıcında LH'a ihtiyaç duymadığının bir diğer göstergesi şeklinde değerlendirilmiştir (81, 95).

Leydig hücrelerinin farklanma basamaklarının tümünde, Sertoli hücreleri tarafından uyarılan iki sinyalizasyon sistemi olan, DHH ve PDGFα devreye girmektedir. Sertoli hücreleri tarafından üretilen bu iki ligand, Leydig hücrelerinde bulunan Patched-1 (PTC1) ve PDGFRα olmak üzere 2 spesifik reseptöre bağlanır. DHH-/- ve PDGFα-/- farelerle yapılan çalışmalarda, prekürsör proliferasyonu bozulduğu için yetişkin Leydig hücre gelişiminin aksadığı ve dış genital organlarda feminizasyon ile karakterize psödohermafroditizmin geliştiği rapor edilmiştir (52, 53, 96, 97).

Büyüme faktörleri ve sitokinler de yetişkin Leydig hücrelerinde steroid sentezinde otokrin/parakrin etkilere sahiptir. IGF-1 ve Fibroblast Büyüme Faktörü-9 (FGF-9) steroidogenezi uyaran büyüme faktörleriyken, Transforming Growth Factor Beta-1 (TGFβ-1), Antimüllerian Hormon (AMH), Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF-α),

İnterlökin-1 (IL-1) ve İnterlökin-6 (IL-6) steroid sentezini inhibe eden sitokinlerdir (98, 99).

Leydig hücrelerinin farklanmalarını düzenleyen önemli transkripsiyon faktörlerinden biri de COUPTFII'dir. Farelerde erken embriyonik dönemde COUPTFII eksikliği sonucu, anjiyogenez ve kardiyovasküler defektlere bağlı ölümler gerçekleşmiştir. Geç embriyonik dönemdeki COUPTFII eksikliğinin progenitör Leydig hücre gelişiminde gecikmeye neden olduğu, yetişkinlik dönemindeki eksikliğinin ise, Leydig hücre fonksiyonlarını etkilemediği ve herhangi bir üreme sorununa da neden olmadığı rapor edilmiştir (56).

Bu sinyal molekülleri dışında kemik tarafından salınan OC de Leydig hücrelerindeki spesifik reseptörü GPRC6A (G Protein-Coupled Receptor 6A)'ya bağlanarak steroidogenezi stimüle etmektedir. OC; CREB (cAMP Response Element Binding Protein) transkripsiyon faktörü aracılığıyla Leydig hücrelerinde testosteron biyosentezinde görev alan birçok genin ekspresyonunda rol oynar (15). OC veya GPRC6A-/- farelerde artan LH seviyesine rağmen, steroidogenez inhibisyonunun ve feminizasyonun gerçekleştiği bildirilmiştir (14, 15). Ayrıca insanlarla yapılan çalışmalarda da, OC gen mutasyonlarının, primer testiküler bozukluklarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir (14).

HPG aksından bağımsız olarak, Leydig hücrelerinde testosteron sentezini düzenleyen bir diğer yol ise, beyindeki paraventriküler çekirdekler ile testis arasındaki multisinaptik nöronal yolaktır. Yapılan deneysel çalışmalarda, intraserebroventriküler olarak IL-1β, TNF-α veya IL-6 proinflamatuvar sitokinlerinin enjeksiyonu yapılmış ve hipotalamus ve testis arasındaki bağlantı inhibe edilerek, LH salınımı durdurulmuş ve testosteron sentezinde hızlı bir azalmanın meydana geldiği gösterilmiştir (100, 101).

Androjenler, Leydig hücre fonksiyonu ve maturasyonunun düzenlenmesinde rol almaktadır. Fetal Leydig hücrelerinin farklanma ve fonksiyonları için AR'ne ihtiyaç duyulmazken, stem Leydig hücreleri dışında, diğer tüm yetişkin Leydig hücre hatlarının gelişim basamaklarında Leydig hücre çekirdeklerinde AR ekspresyonu gözlenmektedir. Ancak immatür Leydig hücrelerinde yüksek olan bu ekspresyon, yetişkin Leydig hücrelerinde düşüktür (Şekil 1). Androjenler, immatür Leydig hücrelerinde androjen reseptörlerini maksimum düzeyde uyarırken, yetişkin Leydig hücrelerinde çok etkili değildirler. AR-/- farelerle yapılan çalışmalarda, fetal Leydig

hücre fonksiyonlarının normal olduğu, ancak ilk 20 gün içinde yetişkin Leydig hücre hattına ait hücrelerin %30, yetişkinlikte ise %60 oranında azaldığı rapor edilmiştir. Ayrıca anti-androjen tedavilerin de, yetişkin Leydig hücrelerinde hipertrofi ile birlikte testosteron ve steroidojenik enzim seviyelerinde azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. (102, 103, 104, 105).

Günümüze kadar, seminiferöz tübülleri saran peritübüler hücrelerin en önemli fonksiyonlarının, spermlerin rete testise taşınması sırasında, tübül kontraksiyonunu sağlamak olduğu düşünülmekteydi. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda, peritübüler hücrelerin de erkek fertilitesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (106). Peritübüler dokunun iç tabakası; müsküler karaktere sahip olup desmin eksprese eden miyoid hücrelerden oluşurken, dış tabakası; bağ dokusu karakterindedir ve vimentin eksprese etmektedir (107). Yapılan çalışmalarda, normalde AR eksprese eden peritübüler dokunun iç tabakasındaki bu miyoid hücrelerin AR yokluğunda, yetişkin Leydig hücre sayısını etkilemediği, ancak fonksiyonlarını bozduğu gösterilmiştir. Bu durum peritübüler miyoid hücrelerin, androjen sinyalizasyonu aracılığıyla, yetişkin Leydig hücre fonksiyonlarında rol oynadığını göstermektedir (108).

Erkek üreme sisteminin fonksiyon ve gelişimi açısından, androjenler ve östrojenler arasındaki denge oldukça önemlidir. Özellikle erkek maskülinizasyon programlama penceresi (Masculinisation Programming Window=MPW) döneminde, bu dengenin bozulması erkek üreme sisteminin gelişimini negatif yönde etkiler. Memeli testislerinde aromataz enzimi, androjenleri östrojenlere dönüştürmektedir. Aşırı aromataz ekspresyonu gösteren modifiye farelerde ve infertil erkeklerle yapılan çalışmalarda, aşırı östrojen sinyalizasyonunun, makrofajları Leydig hücrelerini yok etmeleri yönünde uyardığı rapor edilmiştir (109,110).

Leydig hücre fonksiyonlarını düzenleyen bir diğer faktör ise kisspeptin'dir. Kisspeptin; arkuat ve anteroventral periventriküler nükleuslarda yer alan reseptörü olan Gpr54 aracılığıyla GnRH salınımını uyararak, LH ve testosteron salınımını artırır ve seksüel davranışları düzenler. Yapılan araştırmalarda, Gpr54 delesyonuna sahip mutant farelerde, gonadotropin ve steroid hormon seviyesinde azalmanın hipogonadizme ve dolayısıyla da infertiliteye neden olduğu gösterilmiştir (111, 112). Bunların yanında, L-Arginin'in, Nitrik Oksit Sentaz (NOS) tarafından okside olmasıyla oluşan nitrik oksitin, enflamasyon sırasında, Leydig hücreleri ve makrofajlar arasındaki parakrin

sinyalizasyon sonucu, steroidogenezin inhibe olmasına ve testosteron üretiminin engellenmesine neden olduğu da rapor edilmiştir (113).

Peptid yapısında bir hormon olan INSL3, hem fetal, hem de yetişkin hayatta Leydig hücrelerinde sentezlenmektedir. Embriyonik gelişim sürecinde fetal Leydig hücreleri tarafından salınan INSL3, testislerin inişini kontrol eder. Yetişkin Leydig hücrelerince sentezlenen INSL3'ün ise Leydig hücreleri ile germ hücreleri arasındaki etkileşimde rol oynadığı düşünülmektedir (114, 115). Klinefelter sendromlu ve şiddetli hipospermatogenezis nedeniyle infertil olan erkeklerde, dolaşımda INSL3 konsantrasyonunun azaldığı bildirilmiştir (116). Benzer şekilde, 35-80 yaş arası erkeklerde de, yaşa bağlı Leydig hücre fonksiyon kaybına paralel olarak, periferal kanda INSL3 seviyesinin azaldığı rapor edilmiştir (117). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda, Leydig hücre fonksiyon bozuklukları için INSL3'ün bir markır niteliği taşıdığı belirlenmiştir (87, 116, 117).

Tiroid hormonunun, Sertoli hücrelerinin proliferasyon ve farklanmasındaki rolü birçok çalışmada gösterilmesine rağmen, Leydig hücre gelişimine etkisiyle ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Tiroid hormonu; mezenşimal hücre prekürsörlerinin, Leydig hücre prekürsörlerine farklanmasını tetiklemektedir. Neonatal dönemde gözlenen hipotiroidizmin, Leydig hücre farklanmasını durdurduğu ve interstisyumda mezenşimal hücre prekürsörlerinin birikimine neden olduğu, hipertirodizmin ise tam tersi olarak, Leydig hücre farklanmasını stimüle ettiği rapor edilmiştir. (36, 118).

Ghrelin, insanda mide, hipotalamus ve testis dokularında saptanan bir endojenöz büyüme hormonudur. Ghrelin reseptörünün, testiste özellikle pakiten spermatositler dışında, Sertoli ve Leydig hücrelerinde lokalize olduğu immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Ghrelin'in normal gelişim sürecinde, Leydig hücre farklanma indikatörü olduğu ve Ghrelin ekspresyon kaybında, Leydig hücre tümörü oluşumunun uyarıldığı bildirilmiştir (119).

Yapılan çalışmalarda Leydig hücrelerinde steroidogenezisin, mitokondriyal füzyon ve fizyon basamakları sırasında, organel seviyesinde düzenlendiği rapor edilmiştir. Mitokondriyal füzyon sırasında 2 adet dynamin benzeri GTPaz olan Mitofusin 1 ve 2 görev alır. Dış mitokondriyal membranda yer alan bu proteinler mitokondriyon-mitokondriyon ve mitokondriyon-ER etkileşimini sağlar. Mitokondriyal füzyonu düzenleyen füzyon proteini Mitofusin-2 (Mfn-2) eksikliğinde, steroidrogenez

süreci bozulmaktadır (120). Mitokondriyal fizyon için dynamin ilişkili protein-1 (Drp-1) gerekmektedir. Mitokondriyonların eşit şekilde bölünmesi olayı olan mitokondriyal fizyon sırasında mitokondriyonlarda yeniden lokalize olan StAR proteini, steroidogenezisi düzenler. Bunların yanında, endoplazmik retikülüm ve mitokondriyon arasındaki fiziksel temas bölgesi olan, mitokondriyon ilişkili membran yapısı da, endoplazmik retikülüm ve mitokondriyon arasında substrat geçişine izin verdiği için önemlidir (120,121).

2.2. Etan Dimetan Sülfonat (EDS)

Bir alkilleyici sülfonik asit esteri olan EDS'nin; spesifik olarak yetişkin Leydig hücrelerini yok ederek, androjen desteğini kesme yoluyla spermatogenez sürecini bozduğu ve geçici infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (122, 123). EDS ile orijinal Leydig hücre popülasyonunun elimine edilmesinin ardından, 7 hafta içinde yeni Leydig hücre popülasyonu rejenere olmaktadır. Normal koşullarda, yetişkin Leydig hücreleri puberte sonunda terminal farklanmalarını tamamlarlar ve daha fazla prolifere olmazlar, stabil olarak kalırlar. Bu nedenle, postpubertal dönemde, stem Leydig hücrelerinin gelişimini incelemek için en uygun modelin, EDS uygulanan hayvan modelleri olduğu düşünülmektedir (22, 23, 24, 25).

Yapılan çalışmalarda yetişkin sıçanlarda tek doz EDS uygulamasını takiben 3-4 gün içinde, yetişkin Leydig hücrelerinin hızla yok olduğu, testosteron üretiminin durduğu, testis, epididimis, prostat bezi ve seminal vezikül ağırlığının azaldığı gösterilmiştir. Bununla birlikte Sertoli hücrelerinde AR ekspresyonu, Leydig hücre markırı INSL3 ekspresyonu ve FSH-LH seviyelerinin indirgendiği rapor edilmiştir. Ardından 7-10 hafta içinde stem Leydig hücrelerden başlamak üzere yeni Leydig hücre popülasyonunun tekrar normal gelişim basamaklarına göre oluşmasıyla, yetişkin Leydig hücre sayısı, testosteron seviyesi ve diğer parametreler enjeksiyon öncesindeki durumuna gelmektedir (22, 23, 24, 25, 123, 124). Leydig hücreleri elimine olduktan 1 hafta sonra, seminiferöz tübüllerin duvarında ve damarların çevresinde iğ şeklinde stem Leydig hücreleri prolifere olmaya başlar. Stem Leydig hücreleri, daha sonra 3βHSD eksprese eden progenitör Leydig hücrelerine farklanırlar. EDS uygulamasından 4-5 hafta sonra ise perivasküler ve peritübüler alanlarda, 5α-redüktaz enzim aktivitesi yüksek olan immatür Leydig hücre kümeleri oluşmaya başlar. Yaklaşık 6-7 hafta sonra

immatür Leydig hücrelerinin, yetişkin Leydig hücrelerine farklanmasıyla, EDS nedeniyle elimine olan yetişkin Leydig hücrelerinin yerini, yeni yetişkin Leydig hücreleri almış olur (125, 126, 127).

Yapılan çalışmalarda EDS uygulaması sonrası 3-5 gün içinde testosteron, PDGFRα, IGF-1 ve steroidojenik enzimlerin en düşük seviyelerine indiği ve 8. günden sonra, stem Leydig hücrelerinin prolifere olmasıyla birlikte, tekrar testosteron ve steroidojenik enzim seviyelerinin yükselmeye başladığı rapor edilmiştir. 20. günde ise, EDS öncesi normal seviyelerinin %25'ine ulaştıkları bildirilmiştir (97). Normal postnatal gelişim gösteren Leydig hücreleri ile EDS uygulaması sonrası yeniden rejenere olan Leydig hücreleri karşılaştırıldığında, steroidojenik kapasitelerinin eşit olduğu bildirilmiştir (128). Yaşlı sıçanlarda da, EDS uygulaması sonrası, Leydig hücrelerinin steroidojenik fonksiyon kapasiteleri genç sıçanlarınkine benzer bulunmuştur (129). Bir diğer çalışmada ise, EDS uygulaması sonrasında intersitisyal bölüm ve seminiferöz tübüller ayrı ayrı LH içeren ve içermeyen mediumalara alınmıştır. LH içermeyen intersitisyal bölüm ve tübül kültürleri ile LH içeren interstisyal bölüm kültüründe, testosteron üretiminin gerçekleşmediği rapor edilmiştir. Buna karşın, LH içeren tübül kültüründe, testosteron üretimi gerçekleşmiş ve tübül yüzeyinde 3βHSD pozitif hücreler izlenmiştir. Böylelikle tübül yüzeyindeki hücrelerin, Leydig hücre prokürsörleri olduğu ve proliferasyon için LH'a ihtiyaç duydukları gösterilmiştir (130).

EDS'nin spesifik olarak yetişkin Leydig hücrelerinin ölümüne nasıl neden olduğunun etki mekanizması halen tam olarak bilinmemektedir. EDS uygulaması sonrasında Leydig hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmasında bazı dejeneratif değişiklikler gerçekleşir. SER vakuolizasyonu ve Golgi kompleksinde hipertrofi, EDS uygulaması sonrası, yetişkin Leydig hücrelerinde gözlenen başlıca yapısal değişikliklerdir (131). Yapılan çalışmalarda, EDS uygulamasını takip eden ilk 24 saat içinde, hücrede glutatyon seviyesinin yükselmesi ile birlikte kromatin kondensasyonu ve nüklear fragmentasyon sonucunda Leydig hücre apopitozunun gerçekleştiği gösterilmiştir. Bcl-2 ailesi ve kaspazlar, apopitotik sürecin temel mediyatörleridir. Bununla birlikte, EDS uygulaması sonrası Leydig hücre apopitozunda ise Bcl-2 ailesi görev almaz. Bunun yerine Leydig hücrelerinde Fas Ligand-Fas Reseptör aktivasyonu aracılı apopitoz gerçekleşmekte ve Leydig hücre artıkları makrofajlar tarafından yok edilmektedir (132, 133).

Leydig hücreleri haricinde, diğer hücrelerde sitotoksik etkisi minimal düzeyde olan EDS'nin, timus ve adrenal bezlerde geçici involusyon oluşturduğu ve bu organlarda ağırlık azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (122, 134). EDS uygulaması sonrasında, Leydig hücre kaybına bağlı olarak gerçekleşen testosteron eksikliği, androjen bağımlı spermatojenik hücrelerde atrofiye sebep olmakta ve Sertoli hücrelerini de etkilemektedir (97, 135). EDS'nin etki dozu, hayvan türleri arasında farklılık göstermekle birlikte, genel olarak intraperitoneal tek doz 75-100 mg/kg veya intratestiküler 2,5 mg/testis EDS enjeksiyonunun, yetişkin Leydig hücrelerinin elimine edilmesinde etkin olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, sıçanlarda 75-100 mg/kg tek doz intraperitoneal EDS enjeksiyonu yetişkin Leydig hücrelerinin elimine edilmesini sağlarken, aynı doz aralığının hamsterlar için yeterli olmadığı bildirilmiştir (136). Bu nedenle EDS'nin cinsiyet, tür ve yaşa bağımlı toksik etkisiyle ilgili olarak ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

2.3. Steroidogenezis

Hayat boyunca fizyolojik fonksiyonlar ve gelişim süreci için kritik öneme sahip olan steroid hormonlar; başta adrenal bezler ve gonadlar olmak üzere, beyin, deri, plasenta ve beyaz yağ dokusu gibi, çeşitli doku ve organlarda üretilmektedir (63, 137 138). Bütün steroid hormon sentezleyen endokrin organlarda, steroid hormonların üretildiği biyosentetik yol benzer olmasına rağmen, kullanılan enzim sistemleri farklılık gösterir. Steroid hormonlar, steroidojenik hücrelerin sitoplazmasında ve mitokondriyonlarında, "Steroidogenez" adı verilen süreç sonunda sentezlenmektedir. Testosteron da, diğer steroid hormonlar gibi, steroidojenik bir hücre olan Leydig hücrelerinin sitoplazmasında ve mitokondriyonlarında sentezlenir ve depolanmadan salınır (63, 98, 137, 138).

Bütün steroid hormonlar için kolesterol substrat özelliği taşır. Adrenal bezlerde kolesterolden testosteron prokürsörleri DHEA (Dehidroepiandrostenedion) ve androstenedion sentezlenirken, Leydig hücrelerinde kolesterolden direkt olarak testosteron sentezi gerçekleşmektedir. Steroid hormon üreten tüm hücrelerde bol miktarda bulunan peroksizomlar, kolesterolün biyosentezinde ve metabolizmasında rol oynarlar. Hücrede kolesterol, hücre membranından elde edilebildiği gibi,

sitoplazmadaki asetattan ya yeniden sentezlenir veya HDL-LDL şeklinde dolaşımdan alınır (63, 138).

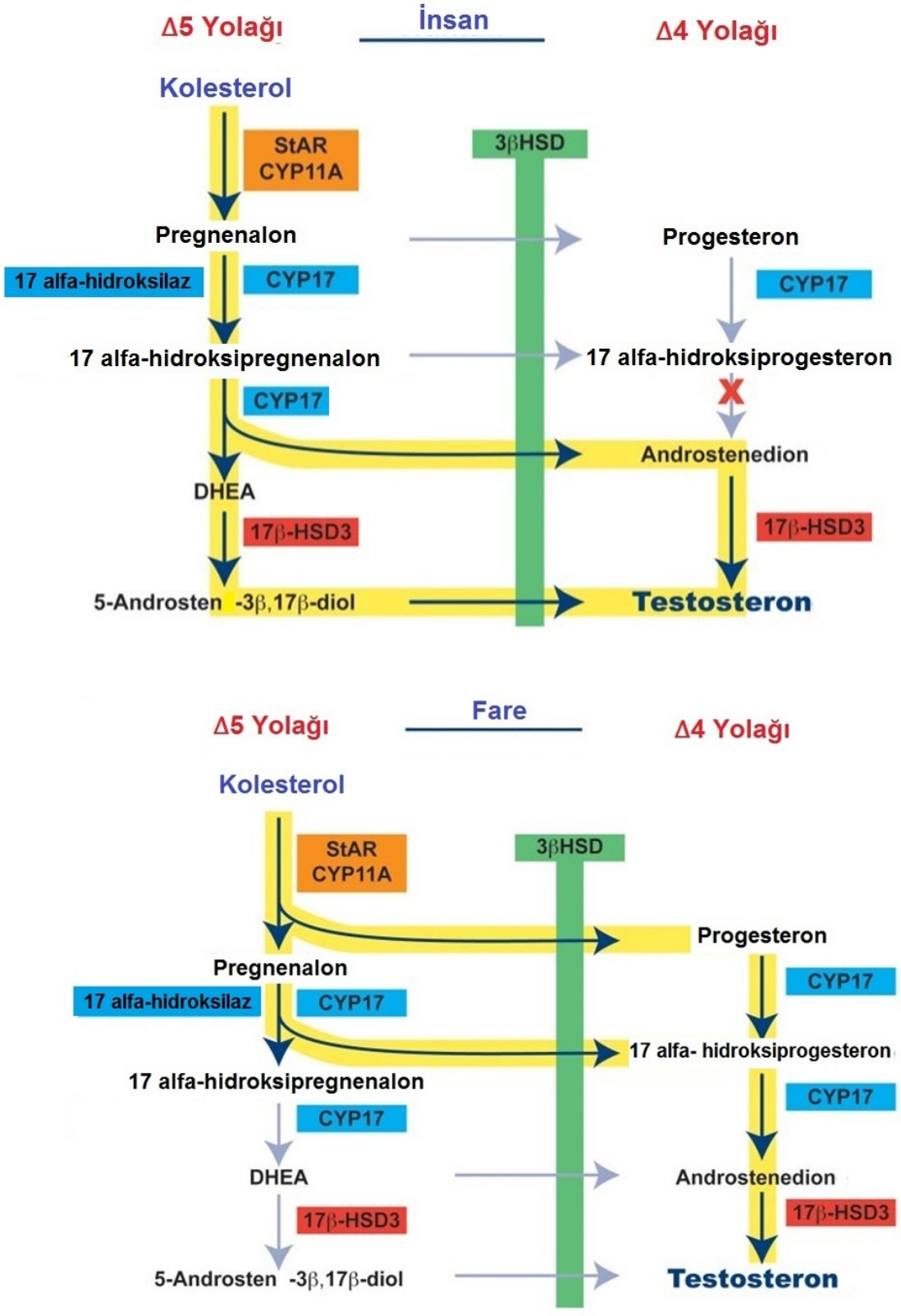
Adenohipofizden salınan LH'un, Leydig hücrelerindeki spesifik reseptörü LHR'ne bağlaması ile stimüle olan adenil siklaz, adenozin trifosfat (ATP)'tan cAMP sentezleyerek, steroidogenezi başlatır. cAMP sentezi ile artan intrasellüler Ca^{2+} girişi, kolesterolün, sitoplazmadan mitokondriyon dış zarına taşınmasını sağlayan Protein Kinaz A (PK-A)'yı aktifleştirir (139). Aktive olan PK-A, ise GATA-4 ve CREB gibi transkripsiyon faktörlerini fosforiller. Mitokondriyonun dış zarı ile iç zarı arasındaki boşluk, suda çözünen moleküllerin geçişine izin veren akuöz bir sıvıyla dolu olup, lipofilik kolesterol geçişini engeller. Kolesterolün mitokondriyonun dış zarından iç zarına taşınması taşıyıcı proteinler olan; Steroidojenik akut regülatör protein (StAR) ve Translokatör protein (TSPO, Periferal Tip Benzodiazepine Reseptör=PBR) aracılığıyla gerçekleşir (11, 63, 140, 141).

StAR; tropik hormonlara cevap olarak sentezlenen, kısa ömürlü bir moleküldür. N ucu, mitokondriyonun dış zarına bağlıdır ve kolesterolün mitokondriyon dış zarından iç zarına taşınmasını sağlar. SF1, testis gelişim sürecinde görev almakla birlikte, StAR aktivasyonu ve steroidojenik enzim ekspresyonlarında rol oynayan önemli bir transkripsiyon faktördür. Yapılan çalışmalarda, SF1 mutasyonuna sahip 46, XY bireylerde, genital organlarda gelişme geriliği, testosteron biyosentezi ve maskülinizasyonda bozukluklar gözlenmiştir (63, 142, 143). Lipoid konjenital adrenal hiperplazi hastalarında da, StAR'ı kodlayan gende mutasyon nedeniyle adrenal ve gonadal steroid sentezinin gerçekleşmediği bildirilmiştir (144). PBR, steroidojenik hücrelerin mitokondriyonlarının dış membranında yer alan ve kolesterol transferinde rol oynayan bir kanal proteinidir. PBR hasarında kolesterol transferinin etkilediği ve steroidogenez sürecin bozulduğu rapor edilmiştir (145). Her iki taşıyıcı proteinin yaşlı Leydig hücrelerindeki azalan ekspresyonları, testosteron seviyesindeki düşüşün sebepleri arasında gösterilmektedir (146).

Kolesterolden testosteron sentezinin geçekleşmesi için çok sayıda enzimin aktivitesine ihtiyaç duyulur. Bu enzimler 2 kategoride sınıflandırılır: CYP11A ve CYP17'nin içinde bulunduğu, sitokrom P450 enzim grubu ile 3βHSD ve 17βHSD'ın içinde bulunduğu, HSD (Hidroksisteroid dehidrogenaz) enzim grubudur. (63, 138). Mitokondriyon iç zar matriksinde bulunan CYP11A enziminin, kolesterol

hidroksilasyonunu katalize etmesiyle, kolesterolün yan zincirindeki 2 C atomu okside olur ve pregnenolon oluşur (63, 140, 147). Pregnenolon, daha sonra mitokondriyondan, diğer enzimatik reaksiyonların gerçekleşeceği SER zarına taşınır. Δ4 ve Δ5 yolakları olmak üzere, 2 farklı yol aracılığıyla, pregnenolondan farklı metabolitlerin sentezi gerçekleştirilir. İnsan ve yüksek primatların Leydig hücrelerinde yaygın olarak kullanılan Δ5 yolağında, CYP17 ile pregnenolondan 17-alfa-hidroksipregnenolon, daha sonra da, DHEA sentezlenir. Δ4 ve Δ5 yolaklarının her ikisinin de bulunduğu sıçanlarda ise insanlardan farklı olarak, Δ4 yolağı tercih edilir. Δ4 yolağında, pregnenolondan direkt olarak CYP17 aracılı 17-alfa-hidroksiprogesteron sentezini takiben, androstenedion oluşur. Her iki yolakta da, steroidogenezin 17βHSD tarafından katalizlenen son basamağında, androstenedion testosterona dönüştürülür (49, 63, 140) (Şekil 2).

Fetal dönemde steroidogenez süreci sonunda sentezlenen testosteron; testislerin inişini ve Wolffian kanalların genital duktuslara farklanmasını uyarırken, 5α-redüktaz aracılığıyla oluşturulan dihidrotestosteron; ürogenital sinüsleri uyarır ve dış genital organlar ile prostatın gelişmesini sağlar. Puberte ve yetişkinlikte de testosteron; sekonder seks karakterlerinin şekillenmesinden ve spermatogenezin devamlılığından sorumludur (35, 148). Organizmada homeostazın düzenlenmesinde rol oynayan steroid hormonlarda yetersizlik durumunda; hormon bağımlı kanserler, otoimmün ve enflamatuvar hastalıklar gibi, çeşitli patolojik süreçlerin ortaya çıktığı rapor edilmiştir (98).



Şekil 2. İnsan ve farede steroidogenez süreci (63).

2.3.1. Testosteron

Testosteron; beyin, karaciğer, over, testis, kemik iliği, deri, kas ve kemik gibi androjen reseptörü içeren çeşitli organ ve dokuların fonksiyonlarında rol oynayan, önemli bir steroid hormondur (1, 6). Erkeklerde fiziksel aktivite ve genel sağlık durumunun devamlılığı için gereken testosteron; hipotalamus, hipofiz ve testis arasındaki negatif geri besleme mekanizmaları ile düzenlenir. Hipotalamustan salınan GnRH ile stimüle olan LH, Leydig hücrelerindeki LHR'ne bağlanarak testosteron sentezini uyarır. Serum testosteron miktarının yaklaşık %95'inin testiste Leydig hücreleri tarafından sentezlenmesi, intratestisküler testosteron seviyesinin, serum testosteron seviyesinden; kemirgenlerde 8-30 kat, insanlarda ise, 20-100 kat daha fazla olmasına neden olmuştur. Normal koşullarda, yetişkin erkeklerde günlük 4-7 mg testosteron sentezlenir ve depolanmadan hızla, plazma aracılığıyla hedef organlara gönderilir. Sirkadiyen ritme bağlı olarak, sabah saatlerinde daha yüksek olan testosteron sentezi, akşam saatlerinde %25 oranında azalır (1, 11, 89, 149).

Steroid hormonlar; hedef organ ve vücut sıvılarında, hepatositler tarafından sentezlenen Seks Hormonu Bağlayıcı Globulin (SHBG) ve albümin gibi bağlayıcı proteinlere bağlı şekilde bulunmaktadır. Dolaşımdaki testosteronun yaklaşık %98'i, bu şekilde, bağlı formda bulunurken, %2'si serbest formdadır ve karaciğerde metabolize olarak dihidrotestosterona dönüştürülür (1).

Biyokimyasal analizler sonucunda, insanda testosteron seviyesinin, gestasyonun 14-18. haftalarından sonra fetal Leydig hücrelerinin involusyonuna bağlı olarak azalmaya başladığı, ancak doğumdan 2-3 ay sonra "minipuberte" olarak bilinen dönemde, infantil Leydig hücrelerinin gelişimine bağlı olarak, tekrar artışa geçtiği rapor edilmiştir (1, 34, 39). Postnatal dönemdeki bu artıştan sonra, gonadotropin süpresyonu nedeniyle, testosteron seviyesi tekrar azalır ve puberteye kadar da, düşük seviyelerde kalır. Uzun bir dinlenme evresinden sonra, puberte ile birlikte, HPG aksı tekrar aktive olur ve LH stimülasyonuna bağlı olarak artan testosteron sentezi, gonadal fonksiyonların düzenlenmesini ve ekstragonadal dokuların olgunlaşmasını sağlar. Yaşlanmaya bağlı olarak testosteron seviyesinde tekrar düşüş gerçekleşir (1, 34, 39, 150).

Normal koşullarda testosteron seviyesi, erkeklerde 40 yaşından sonra her yıl yaklaşık %1,5 oranında azalmaktadır (6, 7). Klinik düzeyde androjen eksikliği, orta ve

ileri yaşa sahip erkeklerin yaklaşık % 6-12'sinde görülmektedir (7, 151). Yaşlanmaya bağlı ortaya çıkan testosteron eksikliğinin nedenleri multifaktoriyeldir. Bu faktörler arasında; HPG aksında bozukluk, Leydig hücre kompozisyonunda ve steroidojenik fonksiyonlarında azalma ile indirekt olarak germ hücre kaybı sayılabilir (152, 153, 154). Yapılan çalışmalarda, yaşlanma nedeniyle bozulan HPG aksında düzensiz GnRH salınımının, hipofiz bezinde GnRH duyarsızlığı oluşturduğu ve bu nedenle de, testosteron sentezinde azalmanın gerçekleştiği rapor edilmiştir (6, 7, 10, 155). Ayrıca, yaşlanma dışında; varikosel, Klinefelter sendromu ve Kriptorşidizm gibi testiküler veya hipofiziyal bozukluklar, kronik hastalıklar ile alkol ve sigara kullanımının da testosteron seviyesinde önemli oranda azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (6, 8). Testosteron eksikliğinde, kas hacminde azalma, yağ kütlesinde artış, osteoporotik kırıklar, saç ve deride değişiklikler, entelektüel davranışlarda bozulma, depresyon ve mortaliteye kadar giden bir süreç izlenmektedir (6, 7, 8, 9, 10, 11). Bunların yanı sıra, testosteron eksikliğinin en önemli bulgusu; ereksiyon yetersizliği, libido azalması, semen hacminde düşme ve düşük serum testosteron seviyesi ile karakterize, seksüel fonksiyon bozukluklarıdır. Buna bağlı olarak meydana gelen hipogonadizm; infertilite ile birlikte, obezite, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyon gibi birçok metabolik sendromun gelişmesine de neden olmaktadır (6, 7, 8, 10). Klinikte hipogonadizm tedavisinde yaygın olarak kullanılan testosteron replasman tedavisinin, uzun vadede; uyku apnesi, kardiyovasküler hastalık, böbrek yetmezliği, testiküler atrofi ve infertilite gibi yan etkilere sebep olabileceği rapor edilmiştir (9, 11, 12).

Hipogonadizm; Leydig hücreleri ve/veya Sertoli hücrelerinde fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak gerçekleşen testosteron ve/veya sperm üretiminde azalma ile karakterize klinik bir tablodur. Testis kökenli olabildiği gibi, hipotalamus veya hipofiz bezinde meydana gelen fonksiyon bozukluklarından da kaynaklanabilmektedir. Primer hipogonadizm, testis fonksiyon bozukluklarına bağlı olarak gerçekleşirken, sekonder (hipogonadotropik) hipogonadizmde LH/FSH eksikliği gözlenir. LH eksikliği sonucu gözlenen hipogonadotropik hipogonadizm tedavisinde ya direkt olarak LH veya hCG ile ya da indirekt olarak klomifen veya aromataz inhibitörleri kullanılarak, LH veya LHR aktivasyonu sonucunda testosteron üretimi gerçekleştirilir (4, 11). Direkt yöntemde, enjeksiyon yoluyla dolaşıma verilen rekombinant LH veya hCG, Leydig hücrelerindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak, testosteron üretimini uyarır. Ancak

LH'un, dolaşımdaki yarılanma ömrünün, hCG'den kısa olması nedeniyle, klinikte hCG kullanımı tercih edilmektedir. İndirekt yöntemde ise, klinikte hipogonadizm tedavisinde de kullanılan klomifen; östrojenin hipotalamustaki spesifik reseptörüne bağlanmasını engelleyerek, HPG aksının negatif geri besleme mekanizmasını inhibe eder. Böylelikle GnRH stimülasyonu, hipofizden LH salınımını artırır ve Leydig hücreleri uyarılır. Alternatif bir diğer yol ise, aromatizasyonun inhibisyonudur. Bu yöntemde, testosteronun östrodiole dönüştürülmesini sağlayan aromataz enziminin bloke edilmesi ile HPG aksının negatif geri besleme mekanizması engellenir ve endojenöz testosteron üretimi gerçekleşir. Direkt ve indirekt yöntemlerin her ikisi de, Leydig hücrelerinde LHR'nü stimüle etmektedir. Ancak, normal veya yüksek LH seviyesine sahip hastalarda stimülasyon artsa da, testosteron üretimi gerçekleşmeyebilir. Çünkü bu hastalarda, hipogonadizmin esas nedeni Leydig hücrelerinin LH'a duyarsız olmalarıdır (11). Klinikte, LH stimülasyonu ile testosteron üretiminde karşılaşılan bu kısıtlamalar, endojenöz testosteron üretimini artıracak alternatif yollar aranmasını zorunlu kılmaktadır.

Yaşlanma, fizyolojik sorunlar veya çevresel toksinler nedeniyle oluşan androjen eksikliği, erkeklerde osteoporoz gelişimine de neden olabilmektedir (156, 157). Benzer şekilde, kadınlarda da menapoz sürecindeki östrojen eksikliğinin osteoporoz ile sonuçlandığı bilinmektedir (158). Androjenler, kemik yıkım hücreleri olan osteoklastların oluşumunu azaltır ve osteoblastlarda Osteoprotegerin (OPG) üretimini de artırarak, kemik rezorbsiyonunu engellemektedir (159, 160). Yapılan çalışmalarda, hipogonadal erkeklerde gözlenen düşük kemik mineral densitesine karşı ekzojen testosteron uygulamalarının, kemik yapım markırlarının ekspresyonunu artırdığı ve kemik yıkım markırlarının ekspresyonunu azaltarak trabeküler yapıyı iyileştirdiği rapor edilmiştir (9, 12, 13,). Androjenlerin, yetişkin hayatı boyunca, üreme fonksiyonları haricinde, antiosteoporotik ve anabolik özelliklerinin varlığı ilk kez Albright ve Reifenstein tarafından 1940'larda ortaya çıkarılmıştır (161). Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, androjenlerin; iskelet gelişimi ve kemik sağlığının devamlılığı için gerekli olduğunun gösterilmesi, kemiğin de steroid hormonların sentez ve sekresyonlarını düzenlediğine ilişkin hipotezlerinin kurulmasına sebep olmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, OC'in Leydig hücrelerinde LHR yerine, GPRC6A'ya bağlanarak CREB fosforilasyonuna neden olduğu ve StAR mRNA ekspresyonunu

artırarak testosteron sentezini gerçekleştirdiği bildirilmiştir. Böylece kemik metabolizması ve testosteron üretimi arasında LH'dan bağımsız, OC aracılı bir ilişkinin var olduğu ortaya çıkarılmıştır (14, 15, 16). Klinikte LH, hCG, klomifen, aromataz inhibitörleri ve ekzojen testosteron uygulamaları nedeniyle karşılaşılan kısıtlamalara karşı, OC uygulamasının alternatif bir yol olabileceği düşünülmektedir (11).

2.4.Gonadotropin Releasing Hormon Antagonisti (GnRH antagonisti)

Yapısal olarak birbirine çok benzeyen ancak farklı doku ve organlarda dağılım gösterip, farklı gen ekspresyonları sergileyen, başlıca iki GnRH formu bulunmaktadır. Memelilerde bulunan bu iki form; GnRH-I ve GnRH-II'dir. GnRH-I, bilinen GnRH'dur ve hipotalamusun arkuat nukleusunda sentezlenip, hipofizyal portal dolaşıma verilerek üreme sistemini düzenler. GnRH-II ise, hipofizde gonadotropin salınımını stimüle etmesi dışında, periferal sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar ve seksüel davranışları uyarmaktadır (1, 150).

GnRH; mevsimsel (baharda artar), sirkadiyen (sabahları artar) ve pulsatil (nabız şeklinde, her 90-120 dakikada artar) olmak üzere 3 farklı şekilde üretilir. On dakikadan az yarılanma ömrüne sahip GnRH'un pulsatil salınımları sonucu, hipofiz bezinde gonadotropin sentezi stimüle olur. Sentez ve salınımı GnRH'un pozitif kontrolünde olan gonadotropinler; aynı zamanda, pozitif ve negatif geri besleme mekanizmaları ile gonadal steroid ve peptid yapıda hormonlar tarafından da düzenlenmektedirler (1, 4, 150). FSH ve plasentadan salınan hCG ile homolog olan LH, anterior hipofizden salınan, glikoprotein yapıda başlıca iki gonadotropik hormondur. Bu aileye üye hormonlar; 92 amino asit rezidüsüne sahip, ortak bir alfa-alt ünit ile hormon spesifik bir beta-alt ünit'in non-kovalent bağlanmasıyla oluşurlar (150). FSH ve LH; gestasyonun 10. haftasında hipofiz bezinde, 12. haftasında ise periferal kanda ölçülebilir. Gonadlardaki reseptörlerine bağlanarak, seksüel maturasyonu başlatırlar ve devamını sağlarlar. Pulsatil salınımları, gonadal fonksiyonların normal şekilde gerçekleşmesi için önemlidir. Sentezlendikten sonra 2-5 gün içinde de peptidazlar tarafından enzimatik yıkıma uğratılırlar. (162, 163).

Testiste FSH'un hedef hücresi Sertoli hücreleri iken, LH'un hedef hücresi Leydig hücreleridir. FSH'un testiküler fonksiyonlar üzerine etkisi henüz tam olarak aydınlatılamasa da, immatür testiste Sertoli hücre proliferasyonunda rol aldığı

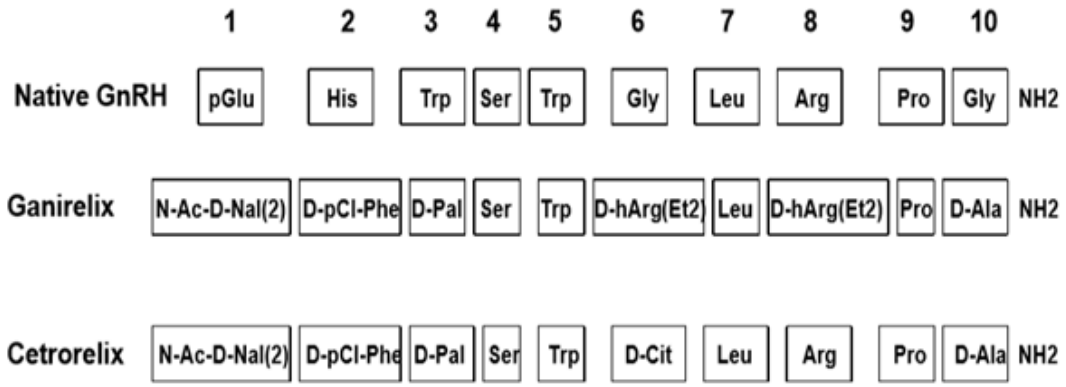
bilinmektedir ve bu bakımından indirekt olarak spermatogenezi etkilediği düşünülmektedir. LH ise Leydig hücrelerinde androjen üretimini stimüle ederek, androjenlerin endokrin (ekstra-testiküler) ve parakrin (spermatojenik) etkilerinin devam etmesini sağlar. Normal testiküler fonksiyonların gerçekleşmesi ve devam etmesi, her iki gonadotropinin intratestiküler aktivitelerine bağlıdır (32, 35, 91, 92, 94 150, 164).

GnRH'ın farklı pozisyonlardaki amino asitlerinin modifikasyonu ile elde edilen GnRH agonistleri, normal GnRH yapısına oranla, GnRH reseptörüne 100-200 kat daha fazla bağlanma kapasitesine sahiptir. Başlangıçta kısa bir gonadotropin stimülasyonuna neden olsalar da, uzun vadede, GnRH reseptöründe gerçekleşen desensitizasyon sonucu, gonadotropin salınımını ve gonadal fonksiyonları baskılarlar. Uygulama sonlandırıldıktan 2 hafta sonra, GnRH seviyesi normale döner. Günlük subkutanöz enjeksiyon yapılabildiği gibi, nasal sprey ya da depot formül şeklinde de aylık olarakta uygulanabilir (162, 165, 168).

GnRH antagonistleri, doğal GnRH'ın 1, 2 veya 3 numaralı pozisyonlarındaki amino asitlerin modifiye edilmesiyle elde edilir. GnRH reseptörüne bağlanarak, doğal GnRH'un hipofiz bezindeki aktivitesini bloke ederler. GnRH agonistlerinden farklı olarak, birkaç saat içinde GnRH salınımı baskılanır. Kronik GnRH antagonisti uygulamaları ile hayvanlarda "medikal hipofizektomi" oluşturulmaktadır. Cerrahi olarak hipofizektomi yapılan hayvanlardan farklı olarak, medikal hipofizektomi yapılan hayvan modellerinde, yalnızca gonadotropin salınımı inhibe olmaktadır (166, 167).

Klinik çalışmalarda, birinci nesil GnRH antagonistlerinin histamin sentezini uyarmaları sonucu alerjik reaksiyonların ortaya çıktığı rapor edilmiştir. Histamin ile ilişkili yan etkiler nedeniyle, GnRH antagonistlerinin 5 ve 6. pozisyonlarındaki amino asitlerin modifikasyonları ile ikinci nesil GnRH antagonistleri geliştirilmiştir. Ancak, ikinci nesil GnRH antagonistlerin uygulamaları sonucunda da; kızarıklık, ödem, şişlik gibi lokal yan etkilere rastlanılmıştır. Bu nedenle, doğal GnRH'un 1, 2, 3, 6 ve 10 numaralı pozisyonlarındaki amino asitlerin ileri modifikasyonları ile; yüksek potansiyelli, uzun süre etkili, çok az lokal yan etkiye sahip ve herhangi bir sistemik yan etkisi bulunmayan, son nesil GnRH antagonistleri üretilmiştir. Cetrorelix ve Ganirelix klinikte yaygın olarak kullanılan, yeni nesil GnRH antagonistlerindendir (Şekil 3). GnRH agonistleri ile karşılaştırıldığında, herhangi bir başlangıç stimülasyonuna neden

olmadan, doz bağımlı olarak, hızlı bir şekilde gonadotropin salınımını bloke etmeleri, tercih sebeplerindendir (162, 165, 168).



Şekil 3. Doğal GnRH ve üçüncü nesil GnRH antagonisti (Cetrorelix ve Ganirelix) amino asit sekansları (162).

2.5. Osteokalsin

Mekanik fonksiyonları dışında, kalsiyum ve fosfat homeostazisinde de görev alan kemik dokusu, aynı zamanda endokrin bir organ olarak da işlev görür (169). Kemikte en çok bulunan non-kollajenöz bir protein olan osteokalsin, kemik yapımından sorumlu osteoblastlar tarafından üretilen, multifonksiyonel bir hormondur ve klinik olarak kemik yapım markırı olarak kullanılır. 1972 yılında tanımlanan osteokalsin, insanlarda "kemik gamma-karboksiglutamik asit (Gla) protein" olarak da isimlendirilmektedir. Gamma-karboksiglutamik asit rezidülerinin bağlandığı alfa heliks konformasyonel düzeninde olan osteokalsin, 5800 Da molekül ağırlığında, 46-50 amino asitten oluşur. Normal koşullarda serumdaki konsantrasyonu 2-12 ng/ml'dir ve bu konsantrasyon 30-60 yıl boyunca stabildir. Gün içinde en yüksek konsantrasyona sabah saatlerinde ulaşan OC, öğle vakti azalmaya başlar ve en düşük seviyesi akşam saatlerinde, uyku esnasında ölçülür (170, 171, 172, 173). OC; osteoblastlar dışında, odontoblastlarda da bulunan kemik Gla protein (Bone Gla Protein-BGLAP) geni tarafından sentezlenmektedir. Çeşitli büyüme faktörleri, hormonlar, sitokinler ve vitaminlerin uyarısıyla sentezlenen osteokalsin, osteoblast farklanmasını ve osteosit maturasyonunu stimüle eder. D vitamini; BGLAP genindeki D vitamini spesifik bölgesi (Vitamin D Response Element-VDRE) aracılığıyla osteokalsin transkripsiyonunu direkt olarak stimüle ederken, K vitamini osteokalsinin karboksilasyonunda rol oynar. BGLAP geni, osteoblast proliferasyonu sırasında inaktif durumda iken, osteoblast farklanma

sürecinde aktif hale geçmektedir (170, 171, 173). D vitamini stimulasyonu ile gerçekleşen preproosteokalsin transkripsiyonunun ardından, proteoliz süreci ile proosteokalsin (75aa) ve prepeptid (23aa) oluşur. Posttranslasyonel olarak K vitamini varlığında, γ-glutamil karboksilaz enzimi tarafından glutamik asitin 17, 21 ve 24 rezidüleri karboksillenir ve karboksillenme seviyesine göre iki pro-OC formu oluşur. Son bir proteolitik sürecin ardından karboksile osteokalsin (cOC) ve ankarboksile osteokalsin (ucOC) olmak üzere, sırasıyla Gla OC ve Glu OC formları meydana gelir (Şekil 4). Her iki osteokalsin formunun osteoblastlardan salınımı kalsiyuma bağlıdır. cOC formu, kalsiyum ve hidroksiapetite bağlanarak kemik matriksinde osteokalsin birikimini sağlarken, ucOC formu hidroksiapetite afinitesi düşük olduğu için dolaşıma geçmektedir (170, 171, 173) (Şekil 4). Kemik matriksinde bulunan cOC, biyolojik olarak inaktifken, aktif form olan ucOC hormon karakterindedir. ucOC için hedef organ ve dokular; pankreas, gonadlar ve yağ dokusu'dur (14, 15, 16, 17, 169). Yapılan analizlerde normalde bireylerdeki OC'in %50'sinin ucOC formda olduğu, K vitamini alımındaki dalgalanmalarla konsantrasyonunun değişebileceği rapor edilmiştir (171, 174). Karboksilasyon süreci; K vitamini bağımlıdır, K vitamini karboksilasyon için gereken glutamat karboksilaz için bir kofaktördür. K vitamini eksikliğinde, ucOC seviyesi artar. Postmenapozal kadınlarda, K vitamini eksikliği, kalça kırıkları ve azalan kemik kütlesi ile ilişkilendirilmiştir (173, 174, 175). Klinikte kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılan warfarin de bir K vitamini antagonistidir ve osteokalsinin karboksile olmasını engelleyerek, cOC formunun azalmasına neden olur (174, 176).

OC'in ucOC formu, pankreasta B hücre proliferasyonu, insulin sekresyonunu ve insülin duyarlılığını uyararak, glukoz metabolizmasında rol oynar (169, 171, 177) (Şekil 5). OC-/- transgenik farelerde, pankreatik B hücre proliferasyonunun azaldığı, glukoz intoleransı ve insülin direncinin geliştiği, yağ kütlesinin arttığı rapor edilmiştir (17). Diğer taraftan doğal fenotipte farelere düşük dozlarda ucOC enjeksiyonu yapıldığı takdirde, B hücre proliferasyonunun ve insülin salınımının arttığı, glukoz toleransının geliştiği ve yüksek dozlarda ise yağ kütlesinin azaldığı bildirilmiştir (174, 178). Ayrıca intraperitoneal rekombinant ucOC enjeksiyonunun yüksek yağlı diet ile beslenen farelerde, glukoz toleransı ve insülin duyarlılığını düzenleyerek, tip 2 diyabet gelişimine engel olduğu rapor edilmiştir (179). Sistemik dolaşıma salınan ucOC, insülin duyarlı dokularda fonksiyon yaparken, insülin de osteokalsin biyoaktivitesinde görev alarak,

kemik modelizasyonu ve enerji metabolizması arasındaki bağlantıyı düzenler. Dolaşımdaki insülin ilk olarak, osteoblast membranındaki insülin reseptörüne bağlanır. İnsülin sinyalizasyonu ile FoxO1 bağımlı OPG üretimi indirgenir. OPG/RANKL oranındaki azalma sonucu osteoklastlar aktive olur ve kemik rezorbsiyonu başlar. Kemik rezorbsiyonu sırasında, kemik ekstrasellüler matriksinin asiditesi yükselir ve asidik pH nedeniyle dekarboksile olan osteokalsin, ucOC formunda sistemik dolaşıma verilir. Bu yolla, osteoklastlar kemik dokunun endokrin fonksiyonuna katkı sağlamış olur (15, 17, 18, 171) (Şekil 5). Yapılan çalışmalarda, oral yolla alınan GlaOC'in mide asiditesinde de dekarboksile olarak serum ucOC seviyesini artırdığı rapor edilmiştir (18, 180).

Osteokalsin, osteoblastlardaki glukoz homeostazını etkileyen tek faktör değildir. Bir tirozin fosfataz olan OST-PTP ve bunun insanlardaki homoloğu PTP1B (PTN1)'yi kodlayan Esp geninin metabolik fonksiyonu, osteokalsinin tam tersidir. Osteoblastlardaki insülin reseptörüne OST-PTP veya PTP1B'nin bağlanması ile inhibe olan insülin sinyalizasyonu, osteoklast aktivitesini engeller ve osteokalsin karboksilasyonu artar. Osteoblastlarda Esp yokluğunda, pankreatik B hücre proliferasyonu ile insülin sentezi ve duyarlılığının arttığı, bu yolla diyabet ve obezitenin engellendiği belirlenmiştir. Ayrıca Esp yokluğunda artan osteokalsin seviyesine paralel olarak, testosteron seviyesi, testis hacmi ve sperm sayısının da arttığı, OC-/- farelerde ise testosteron seviyesinde ve sperm sayısında azalma ile birlikte testis, epididimis ve seminal vezikül ağırlıklarının azaldığı rapor edilmiştir (15, 17, 18, 171).

Osteoblastlar ile insülin arasındaki ilişkinin bir benzeri de, osteoblastlar ile adiponektin arasında vardır. Adipoz dokudan salınan adiponektin; osteoblastlardaki spesifik reseptörüne bağlanarak osteoblast proliferasyonu ve farklanmasını uyarırken, androjenler, adipositlerden her iki osteokalsin formunun da salınımını stimüle ederler (181, 182) (Şekil 5). Obezite ve diyabet gibi metabolik sendroma sahip kişilerde, serum osteokalsin ve adiponektin seviyeleri düşüktür. Obez erkeklerde testosteron seviyesinin, artan glukoz, insülin ve C-peptid konsantrasyonu ile negatif ilişki içinde olması, bu hastalarda düşük androjen seviyesinin, düşük osteokalsin seviyesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Serum adiponektin seviyesi, glisemik kontrolün sağlandığı diyabetik hastalarda kemik yapımının bir belirteci olarak değerlendirilmektedir (177, 182, 183, 184). Kemik ve enerji metabolizması arasında kompleks ilişkinin araştırıldığı

çalışmalarda, adiposit kökenli bir diğer hormon olan leptinin de, merkezi sinir sistemi aracılığıyla apetit oluşumunu inhibe ederek, üreme fonksiyonlarını stimüle ettiği rapor edilmiştir (185). Leptin-/- ve Leptin reseptörü-/- farelerde de sırasıyla obezite ve hipogonadizmin gözlendiği bildirilmiştir (186).

Androjenlerin; genç yetişkinlerde kemik yapımındaki rolü ile yaşlılıkta kemik yıkımına karşı koruyucu etkisi, yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir (16, 156, 158, 160, 184, 187). Etkilerini direkt olarak osteoblastlarda bulunan androjen reseptörüne bağlanarak gösterdikleri gibi, indirekt olarak östrojene aromatize olduktan sonra Östrojen Reseptörü-Alfa (ER-α) ve Östrojen Reseptörü-Beta (ER-β)'ya bağlanarak da gösterebilirler (160). Yapılan çalışmalarda çeşitli nedenlerle hipogonadizm tanısı alan hastalarda, androjen eksikliğine bağlı olarak osteopeni veya osteroporozun geliştiği bildirilmiştir (177, 188, 189).

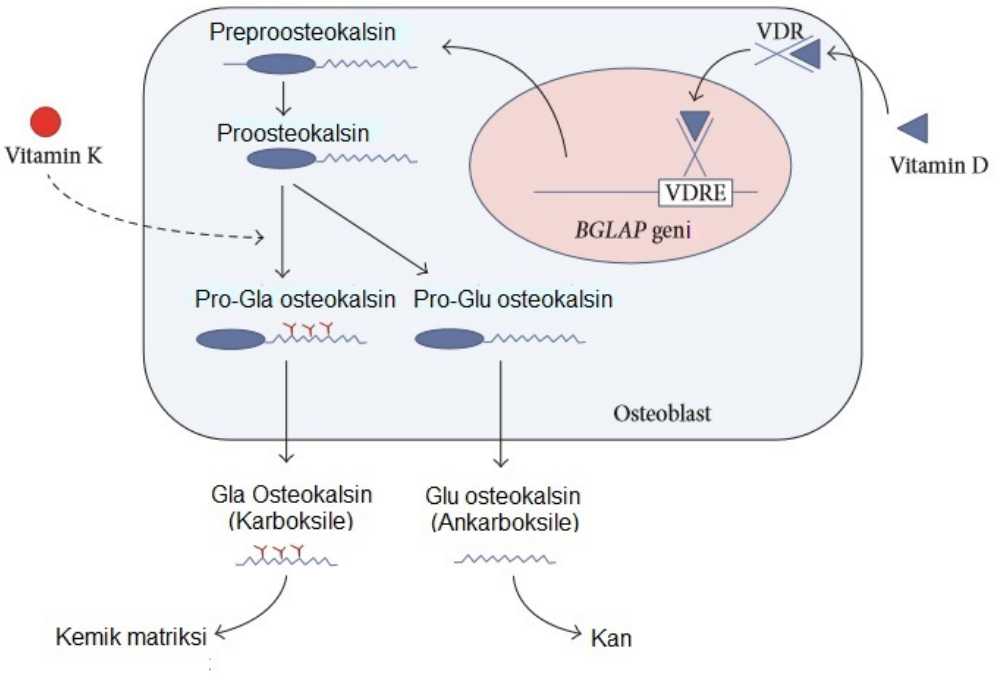
Kas, yağ dokusu, pankreas ve karaciğer gibi çeşitli doku ve organlarda etkisi gösterilen osteokalsinin, son yıllarda yapılan çalışmalarda, erkek üreme sisteminde de önemli rollere sahip olduğu rapor edilmiştir. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla OC'in, steroid hormonların sentez ve sekresyonlarını düzenlediği ortaya konulmuştur (14, 15, 16, 160, 190) (Şekil 5). Qury ve arkadaşlarının OC-/- ve LHR-/- farelerle yaptıkları çalışmalarda, OC-/- farelerde testis, epididimis ve seminal vezikül ağırlıklarının belirgin şekilde azaldığı, Leydig hücre maturasyonunun bozulduğu, sperm sayısı ve testosteron seviyesinin düştüğü, ancak ilginç olarak, LH seviyesinin yüksek olduğu bildirilmiştir. LHR-/- erkek farelerde ise OC seviyesinde artış kaydedilmiştir. Bu bulgular, LH ve OC'in birbirlerini düzenlemedikleri, OC'in, HPG aksından bağımsız olarak Leydig hücrelerinde testosteron sentezini uyardığı şeklinde yorumlanmıştır (14, 15). Ayrıca OC-/- fareler ile Esp-/- fareler karşılaştırıldığında, OC-/- erkek farelerde sperm sayısında %50 oranında azalma, Esp-/- erkek farelerde ise %30 artış kaydedilmiştir. Bununla birlikte, OC-/- dişi farelerde ise, over ağırlığı, uterus morfolojisi, follikül sayısı ve seks steroid seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. OC eksikliğinin dişilerde, erkeklerdeki gibi gonadal anormalliklere neden olmadığı belirlenmiştir (15). OC testiste, testosteron üretimini artırması dışında, erkek fertilitesini düzenlemekte ve germ hücre apopitozunu engellemektedir. OC testisteki bu etkilerini, ankarboksile formu olan ucOC aracılığıyla gerçekleştirir (14,15, 171).

Yapılan çalışmalarda, testosteronla bağlantılı birçok hastalığın osteokalsinle de ilişkili olabileceği ortaya çıkarılmıştır. Obezite veya diyabet gibi herhangi bir metabolik sendroma sahip erkeklerde yapılan çalışmalarda, düşük olan total OC ve ucOC seviyelerinin, LH'dan farklı olarak serbest testosteron ile pozitif ilişki içinde olduğu gösterilmiştir (191, 192, 193). Yaşları 7-21 arasındaki erkeklerle yapılan bir başka çalışmada ise; 11-14 yaşlarındaki erkek çocuklarda puberteye bağlı testosteron artışı, iskelet sistemindeki büyüme nedeniyle, yükselen OC seviyesine paralellik göstermektedir (194). Literatürde, osteokalsin ve testosteron arasındaki pozitif ilişkiyi rapor eden birçok çalışma bulunsa da, ucOC ve cOC seviyeleri ile testosteron arasında zayıf bir ilişkinin varlığını bildiren çalışmalar da yer almaktadır (195, 196, 197).

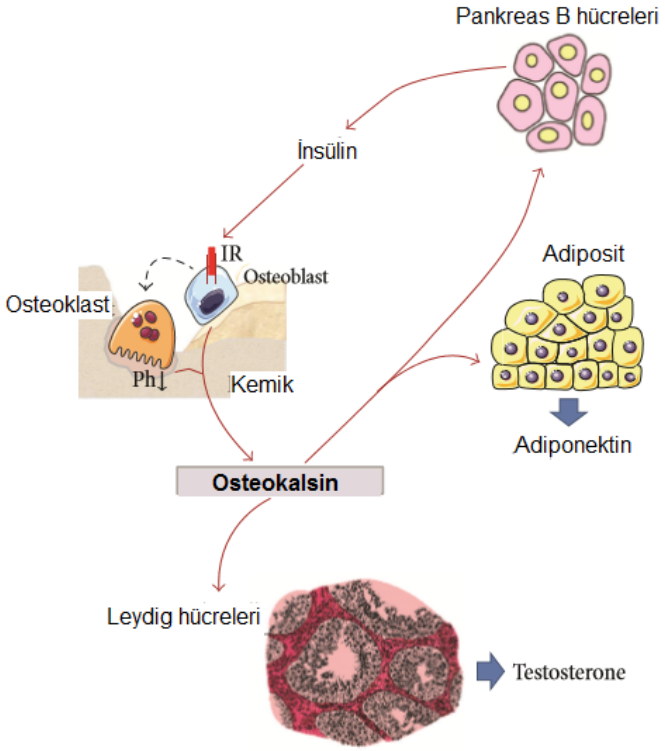
Leydig hücrelerinin osteokalsin aracılı endokrin fonksiyonu, testosteron üretimi dışında, INSL3 sentezi ve vitamin D aktivasyonuyla da ilişkilidir. Testiküler fonksiyon bozukluklarına bağlı testosteron, INSL3 ve vitamin D seviyelerindeki azalmayı takiben, osteoporoz ve osteopeni riskinde artışın gerçekleştiği rapor edilmiştir (198, 199). Bununla birlikte literatürde osteokalsin ve INSL3 seviyesi arasındaki ilişkiyi ortaya koyan, halen yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır.

ucOC'in, Leydig hücrelerindeki spesifik reseptörü, GPCR (G-Protein Coupled Receptor) ailesinin bir üyesidir. 100'den fazla üyeden oluşan bu reseptör ailesindeki 22 reseptör testiste yer alırken, 4 tanesi de Leydig hücrelerinde bulunur. Leydig hücrelerinde yer alan 4 tip GPCR'den en iyi bilineni ise GPRC6A (G-protein coupled receptor-6A)'dır. GPRC6A; beyin, kalp, akciğer, dalak, böbrek, iskelet kası, yağ dokusu ve pankreatik B hücrelerinde eksprese olurken, overlerde eksprese olmaz (190, 200, 201, 202). OC'in, LHR'nü baypas edip, GPRC6A'ya bağlanmasının ardından, cAMP üretimi artar. Oluşan cAMP, testosteron biyosentezinin düzenlenmesini sağlayan ve transkripsiyonel bir faktör olan CREB'i aktive eder. CREB aktivasyonu sonucu steroidojenik enzim proteinlerinin (StAR, CYP11A1, CYP17A1, 3βHSD) ekspresyonu uyarılır ve testosteron sentezi başlar (15, 16, 190, 201) (Şekil 6). GPRC6A, insan prostat kanser hücrelerinde de yüksek seviyelerde eksprese olduğundan, prostat kanseri metastazının tayini açısından da önemli bir parametredir (203). Yapılan çalışmalarda, Leydig hücrelerinde GPRC6A inaktivasyonu sonucu, OC-/- farelerin üreme fenotiplerine benzer şekilde, düşük testosteron seviyesi ile ilişkili olarak, kemik mineralizasyon defektlerine, yağ kütlesi artışına, hiperfosfatemi, hiperkalsuri,

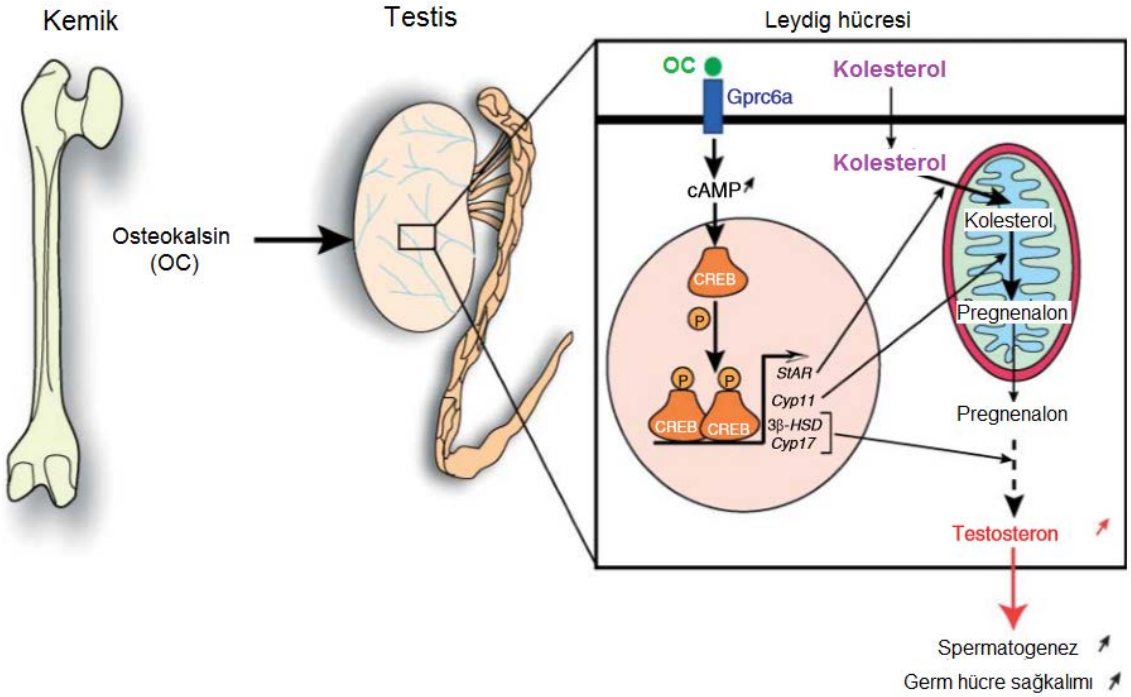
hiperglisemi ile birlikte feminizasyona rastlanıldığı bildirilmiştir (15, 190, 204). GPRC6A aktivasyonu ise pankreatik B hücre proliferasyonu ve insülin duyarlılığınını stimüle ederek, metabolik anormalliklere neden olan yüksek kolesterole engel olmaktadır (205). 59 primer testiküler hasara sahip erkek ile normal karyotipli erkeklerde GPRC6A mutasyonu araştırılmış ve 2 infertil hasta da bu mutasyona rastlanılmıştır. Bulguların hayvan modelleri ile de desteklendiği bu çalışmada, GPRC6A genindeki delesyonun, testosteron seviyesini ve erkek fertilitesini düşürdüğü sonucuna varılmıştır (14, 15). Bu nedenle, özellikle sebebi bilinmeyen testiküler fonksiyon bozukluklarında, OC veya GPRC6A mutasyonlarının da araştırılması gerektiği önerilmektedir. Dolayısıyla, OC, GPRC6A ve testosteron arasındaki ilişkinin tam olarak anlaşılması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 4. Osteoblastlarda osteokalsin sentezi (171).



Şekil 5. Osteokalsinin endokrin fonksiyonları (171).



Şekil 6. Testiste osteokalsin aracılı testosteron üretimi (16).

2.6. INSL3

İlk kez 1990'ların ortalarında tanımlanan INSL3; insülin, IGF-1, IGF-2 ve Relaksin (RLN)'in de dahil olduğu, peptid hormon ailesinin bir üyesidir. Relaksin Benzeri Faktör (RLF) veya Leydig İnsülin Benzeri Peptid (Ley-IL) olarak da isimlendirilen INSL3, birbirlerine sistein köprüleri ile bağlı, A-B heterodimerik zincir konformasyonel düzeninde olup, 6 kDa ağırlığındadır (19, 20, 87, 206, 207). Otokrin ve parakrin etkili sayısız fonksiyona sahip olan INSL3'ün, sıçan, fare, hamster, maymun ve insan testiküler Leydig hücrelerinde yüksek seviyede eksprese olduğu ve Leydig hücreleri için fonksiyon ve farklanma markırı olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (207, 208, 209, 210, 211). INSL3, Leydig hücreleri dışında plasenta, over, tiroid, meme ve prostat bezlerinde de eksprese olmaktadır (211, 212, 213). Overde, korpus luteum ve teka hücrelerinde düşük seviyede INSL3 ekspresyonu gözlenmektedir (214, 215). Ancak Leydig hücrelerinde hem fetal hem de yetişkinlik döneminde yüksek seviyede sentezlenen INSL3, overlerde sadece postnatal hayatta düşük seviyede eksprese olmaktadır (216, 217).

Memelilerde testislerin inişi fonksiyonel olarak iki aşamada gerçekleşmektedir. İniş aşamaları, iki mezenterik ligamentin rehberliğinde gerçekleşir, bu ligamentler; kranial süspansör ligament ve kaudal süspansör ligament olarak bilinen gubernakulumdur. Fetal Leydig hücreleri tarafından sentezlenen INSL3, testislerin skrotuma inişinin ilk fazı olan transabdominal fazda, gubernakulum gelişimini uyarır. Testislerin skrotuma inişinin ikinci fazı olan inguinoskrotal faz ise androjen bağımlıdır. Androjenler, testisin abdominal kaviteden inguinal bölgeye inişinde görev alan, kranial süspensör ligamentin gerilemesinde görev alır. Testislerin inguinal bölgeye transabdominal hareketi, farelerde E15,5-17,5. günlerde başlar. Postnatal 2-3. haftalarda gerçekleşen inguinoskrotal fazda ise gubernakulumdaki kısalmaya bağlı olarak testisler, inguinal bölgeden skrotuma geçmektedir. İnsanlarda transabdominal faz gestasyonun 10-23. haftalarında gerçekleşirken, inguinoskrotal faz gestasyonun 26. haftası başlayıp doğuma yakın 35. haftada sona erer. (21, 218, 219).

Kriptorşidizm; yenidoğanda % 3,4 oranında görülen ve testiküler malignansi riski yüksek infertilite nedenlerinden biridir. Hormonal ve mekanik faktörler dışında, INSL3 mutasyonlarının da kriptorşidizm etiyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir. INSL3'ün seksüel farklanma ve gametogenez sürecindeki rolü ile ilgili araştırmalarda,

INSL3 delesyonu yapılan farelerde, embriyonik dönemde gubernakulumun gelişmemesi nedeniyle testislerin intra-abdominal konumda kaldığı, dolayısıyla bilateral kriptorşidizmin ortaya çıktığı rapor edilmiştir. (216, 219, 220). Diğer taraftan INSL3 geninde mutasyon nedeniyle dişilerde de steroidojenik hücrelerde ve germ hücrelerindeki apopitoza bağlı infertilite problemleri bildirilmiştir (221).

INSL3 ilk olarak, SF1 ekspresyonu ile testislerin farklanmasından sonra, transabdominal faz başlamadan hemen önce, fetusta ve amniyotik sıvıda tespit edilir. Bu süreç farelerde, embriyonik dönemin 12. gününe, insanlarda ise gestasyonun 11-12. haftalarına rastlamaktadır (19, 21). Kemirgenlerde, fetal dönemde yüksek olan INSL3 seviyesi, doğumdan sonra fetal Leydig hücrelerinin involusyonuna paralel olarak azalır ve puberteye kadar düşük seviyelerde kalır. İnsanlarda ise "minipuberte" olarak bilinen, doğumdan hemen sonraki 2-3 aylık dönemde, gonadotropinlerin etkisi altında INSL3 seviyesi kısa süreli bir artış gösterir ve ardından puberteye kadar düşük seviyelerde seyreder. Maksimum seviyeye pubertede ulaşan INSL3'ün, aynı zaman diliminde periferal kanda da benzer konsantrasyonlarda ölçülmesi, INSL3'ün testiste sentezlendikten hemen sonra salındığını göstermektedir. Puberteye geçişle insterstisyal sıvıdaki en yüksek konsantrasyonu olan 400 ng/ml'ye ulaşan INSL3, kan-testis bariyerini geçerek, seminiferöz tübül, rete testis ve epididimise ait luminal sıvıda, 10-20 ng/ml konsantrasyonunda ölçülür (19, 20, 21, 114, 222, 223, 224). Germ hücreleri üzerinde antiapopitotik etki göstererek erkek fenotipinin devamlılığını sağlayan INSL3'ün, yetişkin erkeklerdeki konsantrasyonu, testosteron seviyesinin %1'i oranındadır. Dişilerde ise postnatal 6. günde overlerde başlayan INSL3 ekspresyonu, oosit maturasyonu ve follikül gelişiminde rol oynar. Ancak overlerde, testistekinin 5'te 1'i oranında INSL3 sentezlenmektedir (115, 211, 216, 217). Yetişkin hayatı boyunca Leydig hücre fonksiyonlarında bir değişiklik olmadığı sürece, INSL3 konsantrasyonu sabittir (Şekil 7). Ancak yaşlanmaya bağlı olarak, Leydig hücrelerinde sayı ve fonksiyon kaybı gözlenir ve INSL3 seviyesi azalır. İnsanlarda 40-80 yaş aralığında INSL3 seviyesi 10 yılda bir, Leydig hücre sayı ve fonksiyonunda azalmaya bağlı olarak, %12 azalırken, testosteron seviyesi LH'un kompanse edici etkisi nedeniyle 10 yılda bir %6 oranında azalmaktadır (19, 20, 21, 114, 222, 223, 224).

Yetişkin Leydig hücrelerinde INSL3 sentezi ve sekresyonu, testosteron gibi, hCG/LH kontrolünde olsa da, negatif geri besleme mekanizmaları ile HPG aksını regüle

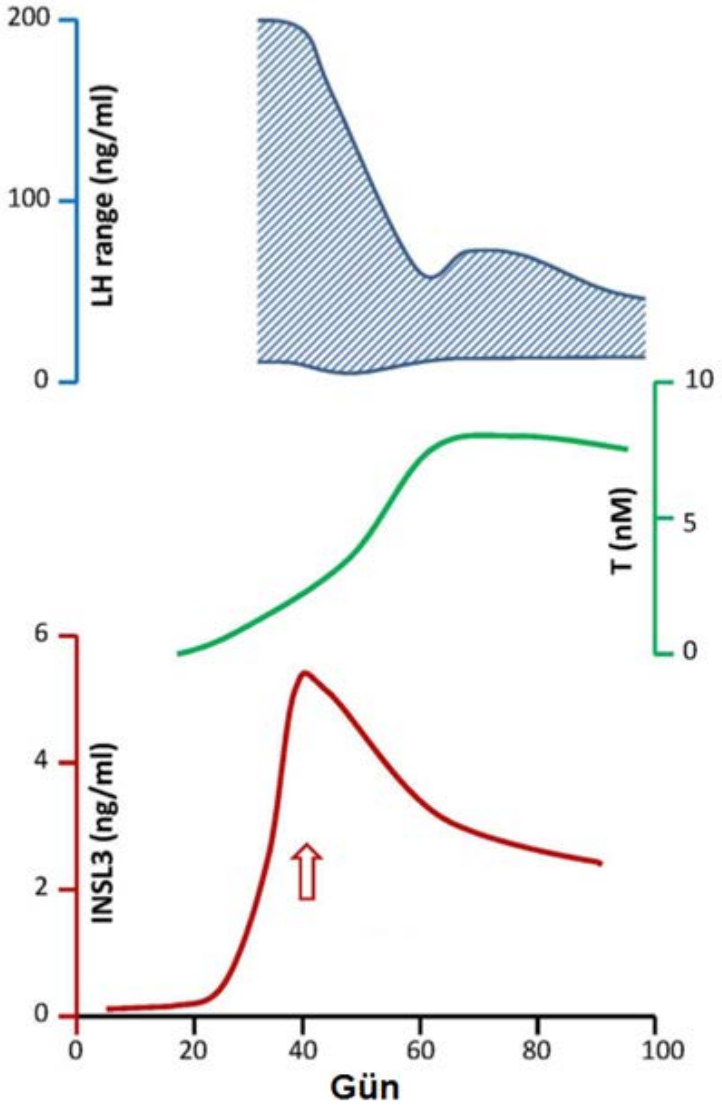
etmez. Fetal Leydig hücrelerinde gözlenen INSL3 ekspresyonu ise tamamen LH'dan bağımsız, hCG'nin stimülatör etkisi altındadır (20, 21, 211, 219, 225). Hipogonadal fareler ve LHR-/- fetal farelerle yapılan çalışmalarda, testis inişinin INSL3 duyarlı transabdominal fazının LH'dan bağımsız olarak normal şekilde gerçekleştiği, ancak testosteron eksikliği sonucu, LH duyarlı inguinoskrotal fazın tamamlanamaması nedeniyle kriptorşidizmin gözlendiği bildirilmiştir (I-26, I-30). Deneklere ekzojen testosteron uygulaması sonrasında, androjen bağımlı inguinoskrotal fazın gerçekleşmesi ile testislerin skrotuma indiği rapor edilmiştir (225).

Fetal ve yetişkinlik döneminde INSL3 ve testosteron seviyeleri, Leydig hücreleri hakkında farklı bilgiler verir. Testosteron; steroidojenik aktiviteleri yansıtırken, INSL3 steroidogenez stimülasyonu ile ilgili olmayıp, Leydig hücrelerinin farklanma markırı olarak görev görmektedir. Yetişkin hayatta INSL3 ve testosteronun her ikisi de LH bağımlı olmasına rağmen, farklı şekilde düzenlenirler. Yapılan deneysel çalışmalarda INSL3 sekresyonunun, testosterondan farklı olarak, kısa süreli steroidojenik LH stimülasyonu ile düzenlenmediği, aksine uzun süreli LH etkisi altında, Leydig hücrelerinin yapı ve fonksiyonlarını etkilediği gösterilmiştir (211, 223, 226). İnsanda hipotalamik-hipogonadizm tanısı konan erkeklerle yapılan çalışmalarda, kısa süreli hCG uygulaması ile steroidogenezisin indüklendiği, ancak düşük olan INSL3 seviyesinin değişmediği ve dolayısıyla Leydig hücre farklanmasının etkilenmediği belirlenmiştir. Leydig hücrelerindeki fonksiyon bozukluklarına testosterondan daha duyarlı olan INSL3'ün, uzun süreli hCG uygulaması sonrasında bile, testosteron gibi eski seviyesine ulaşamadığı dikkati çekmiştir (226, 227). Sağlıklı erkeklerde ise ekzojen testosteron ve GnRH antagonisti uygulamalarından sonra testiste INSL3 ekspresyonunun azaldığı, ancak farklı dozlarda hCG uygulaması ile INSL3 ve testosteron konsantrasyonunun doz bağımlı olarak arttığı belirlenmiştir (228). GnRH antagonisti uygulanan deneklere ekzojen INSL3 verilmesi durumunda ise germ hücre apopitozunun azaldığı gösterilmiştir (229). Ayrıca, intratestiküler INSL3 antagonisti enjeksiyonu sonrasında, germ hücre apopitozuna bağlı testis ağırlığında azalmanın gerçekleştiği rapor edilmiştir (230). Endokrin bozucuların, postnatal normal Leydig hücre gelişimine etkisinin incelendiği çalışmada, gestasyon döneminde dibütilfitalat ve dietilstilbestrol'a maruz bırakılan dişi sıçanlardan elde edilen yavrularda; pubertede gecikme, düşük INSL3

konsantrasyonu ile Leydig hücrelerinin sayı ve fonksiyonlarında azalma bildirilmiştir (21, 231).

INSL3; GPCR ailesi üyesi, Relaksin Ailesi Peptid Reseptörü-2 (RXFP2) veya LGR8 olarak bilinen ve son yıllarda GREAT (G-Protein Coupled Receptor Affecting Testis Descent) şeklinde kısaltılan, spesifik reseptörüne bağlanır. RXFP2; Leydig hücreleri dışında, testis ve ovaryumdaki mayotik-postmayotik germ hücreleri, beyin, böbrek, uterus, tiroid, kemik, kemik iliği, gubernakulum, epididimis, vaz deferens, seminal vezikül, kas ve periferik kan hücrelerinde de tanımlanmıştır (87, 115). Bunların yanında, osteoblastlarda da testis ile aynı seviyede RXFP2 eksprese olmaktadır. İnsanlarla yapılan bir çalışmada, RXFP2 mutasyonu bulunan 25 genç erkekten 16'sında kemik yoğunluğunda belirgin bir azalma kaydedilmiş olup, osteoporoz riskindeki bu artış RXFP2 mutasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca osteoblast primer hücre kültüründe INSL3'ün, doz ve zaman bağımlı olarak, osteoblast proliferasyonunu artırdığı gözlenmiştir (232). Osteoblast fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev alan INSL3 ve RXFP2'de meydana gelen herhangi bir fonksiyon kaybı, genç ve orta yaşlı erkeklerde gözlenen osteoporozun olası nedenleri arasında kabul edilmektedir (222, 232). Klinefelter sendromlu hastalarla yapılan bir çalışmada da, düşük olan INSL3 seviyesi kemik mineral yoğunluğundaki azalma ile ilişkilendirilerek, INSL3 ve osteokalsin arasındaki pozitif ilişki gösterilmiştir. Araştırmacılar aynı çalışmada testosteron tedavisi uygulanan Klinefelter sendromlu erkeklerde INSL3 seviyesinin, testosteron tedavisi uygulanmayan Klinefelter sendromlu erkeklerden daha düşük olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun nedeninin, ekzojen testosteron tedavisi nedeniyle azalan LH seviyesi olduğu kabul edilmiştir (233).

INSL3; puberte, yaşlanma ve endokrin bozucuların da dahil olduğu, genetik ve çevresel faktörler nedeniyle değişen, Leydig hücre farklanma ve proliferasyon dinamiğinin bir belirtecidir. Bütün bu çalışmalara rağmen, INSL3'ün testisteki düzenlenmesi ile ilgili olarak ileri araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 7. Postnatal dönemde sıçanların LH, Testosteron (T) ve INSL3 konsantrasyonları (19).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Düzeneği

Çalışmamızda, prepubertal ve postpubertal dönemlerinde toplam 72 adet Sprague Dawley türü erkek sıçan, Grup 1 ve Grup 2 olmak üzere 2 ana gruba ayrıldı. Her grupta yer alan deneklerden de kendi içinde 4 alt grup oluşturuldu. Deney hayvanları, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde ortalama 22^0C sıcaklıkta, paslanmaz tel kapaklı plastik kafeslerde, 12 saat ışık, 12 saat karanlık olacak şekilde, normal laboratuvar koşullarında yaşatıldı. Deneklere *ad libitum* olarak hazır pellet yem ve çeşme suyu verildi.

GRUP 1: Prepubertal dönemde normal yetişkin Leydig hücrelerinin gelişimi: 50IU hCG ve 30IU PMSG enjeksiyonu ile ovulasyon indüksiyonu (235) yapılan 18 yetişkin dişi sıçan, her bir kafeste 3 dişi 1 erkek sıçan olacak şekilde 6 ayrı kafese ayrıldı. 48 saat sonunda vitellin tıkaç oluşumu gözlenen 15 dişi sıçan, 21 günlük gebelik sürelerinin tamamlanması için ayrı ayrı kafeslere alındı. 21 günün sonunda gerçekleşen doğumun ardından yavrular 35 günlük olana kadar herhangi bir uygulama yapılmaksızın anneleri ile aynı kafeslerde yaşatıldı. Postnatal 35. günde toplamda doğan 67 yavrudan erkek olan 32 tanesi, uygulama süreci için herbir kafeste 8 erkek sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup 1A: Kontrol grubu (n=8).

Herhangi bir işlem uygulanmadı (Tablo 1).

Grup 1B: GnRH antagonisti uygulanan grup (n=8).

Postnatal 35-63. günler arasında deneklere 450 µg/kg/gün subkutanöz Cetrorelix enjeksiyonu (234) yapıldı (Tablo 1).

Grup 1C: GnRH antagonisti ve OC uygulanan grup (n=8).

Postnatal 35-63. günler arasında deneklere 450 µg/kg/gün subkutanöz Cetrorelix enjeksiyonu (234) ile 10 µg/kg/gün OC gavaj (180) yöntemiyle uygulandı (Tablo1).

Grup 1D: OC uygulanan grup (n=8).

Postnatal 35-63. günler arasında deneklere gavaj yöntemi ile yalnızca 10 µg/kg/gün OC (180) verildi (Tablo 1).

Çizelge 1. Prepubertal dönem için uygulama tablosu.

Sakrifikasyon zamanı	Grup 1A (Kontrol)	Grup 1B (GnRH antagonisti)	Grup 1C (GnRH antagonisti + OC)	Grup 1D (OC)
63. gün	n=8	n=8	n=8	n=8

GRUP 2: EDS uygulanan hayvan modellerinde yetişkin Leydig hücrelerinin gelişimi: Postpubertal dönemdeki 40 adet yetişkin erkek sıçan 4 gruba ayrıldı.

Grup 2A: EDS uygulanan grup (n=16).

Deneklere tek doz 75 mg/kg intraperitonel EDS enjeksiyonu yapıldı. EDS uygulamasından 4 gün sonra bu grupta yer alan 8 adet sıçan sakrifiye edilerek, EDS'nin Leydig hücrelerini elimine edip etmediği araştırıldı. Geride kalan 8 adet sıçan ise tek doz EDS dışında herhangi bir uygulama yapılamaksızın 63 gün yaşatıldı (Tablo 2).

Grup 2B: EDS ve GnRH antagonisti uygulanan grup (n=8).

Deneklere, tek doz 75 mg/kg EDS enjeksiyonundan sonra, 35.-63. günler arasında, 450 µg/kg/gün subkutanöz Cetrorelix enjeksiyonu (234) yapılldı (Tablo 2).

Grup 2C: EDS, GnRH antagonisti ve OC uygulanan grup (n=8).

Deneklere, tek doz 75 mg/kg EDS enjeksiyonundan sonra, 35.-63. günler arasında, 450 µg/kg/gün subkutanöz Cetrorelix enjeksiyonu (234) ile 10 µg/kg/gün OC gavaj uygulaması (180) yapıldı (Tablo 2).

Grup 2D: EDS ve OC uygulanan grup (n=8).

Deneklere, tek doz 75 mg/kg EDS enjeksiyonundan sonra, 35-63. günler arasında, gavaj yöntemi ile 10 µg/kg/gün OC (180) verildi (Tablo 2).

,

Çizelge 2. Postpubertal dönem için uygulama tablosu.

Sakrifikasyon zamanı	Grup 2A (Tek doz EDS)	Grup 2B (Tek doz EDS + GnRH antagonist)	Grup 2C (Tek doz EDS + GnRH antagonist + OC)	Grup 2D (Tek doz EDS + OC)
63. gün	n=16	n=8	n=8	n=8

Postnatal normal gelişim sürecinin ve postpubertal EDS uygulamasının 63. gününde, tüm deneklerde yetişkin Leydig hücrelerinin farklanmaları tamamlanmış olacağından, deneklerin sakrifikasyon zamanı olarak 63. gün seçildi (32, 33, 71,72, 75).

Sakrifiye edilen deney hayvanlarından elde edilen testis doku örnekleri, ışık mikroskobik inceleme için Bouin solüsyonuna, elektron mikroskobik inceleme için %5'lik gluteraldehit solüsyonuna ve immünohistokimyasal tetkikler için %4'lük paraformaldehit içerisine alındı ve Anabilim Dalımız Laboratuvarlarında rutin takipleri yapıldı. Elde edilen doku bloklarından ışık ve elektron mikroskobik kesitler alındı. Hemotoksilen-Eozin dışında, 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A için immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirildi. LH, serum testosteron ve ucOC seviyeleri, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda analiz edildi. Elde edilen veriler uygun istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi.

3.2. Kullanılan kimyasallar

Çalışmamızda GnRH antagonisti olarak daha az yan etkilere sahip Cetrorelix acetate (Sigma C5249, USA) tercih edilmiştir. Deneklere oral yolla osteokalsin (Gla-OC) proteini (Fitzgerald 30R-3286, USA) uygulanmıştır. Postpubertal deneklerde yetişkin Leydig hücre eliminasyonunda kullanılan EDS, Jackson and Jackson'ın (1984) (236) belirttiği şekliyle Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde sentezletilmiştir. EDS'nin 75 mg'ı önce 0,5 ml Dimetilsülfoksit (DMSO)'de çözdürülmüş, ardından 1,5 ml distile su eklenerek elde edilen 2 ml hacmindeki EDS solüsyonu, kg başına 2 ml olacak şeklinde sıçanlara intraperitonel olarak enjekte edilmiştir.

3.3. Işık Mikroskobi Yöntemleri

Bouin solüsyonunda 8 saatlik tespitten sonra testis doku örnekleri, 6 saat boyunca %50'lik alkolde bekletildikten sonra %70'lik alkole alındı. Daha sonra dokuların Leica TP 1020 (Leica Biosystems, Germany) ototeknikon cihazı ile Tablo 3'de belirtilen rutin doku takipleri yapıldı.

Çizelge 3. Işık mikroskobik doku takip işlemi.

Oda sıcaklığında	Formalin	30 dakika
Oda sıcaklığında	%70'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%80'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%90'lik etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol+Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Doku takibi bittikten sonra parafin bloklar haline getirilen testis doku örneklerinden 5 μm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandıktan sonra Olympus BX53 (Tokyo, Japonya) ışık mikroskobunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.4. İmmünohistokimya Yöntemleri

Yetişkin Leydig hücrelerini belirlemek için yaygın olarak kullanılan en önemli markır 3βHSD'dir (36, 80, 81). INSL3 ise yetişkin Leydig hücre aktivitesinin bir göstergesidir (19, 20, 21). GPRC6A; testiste osteokalsin reseptörü olarak fonksiyon görmektedir (14,15). 63. günde sakrifiye edilen sıçanlarda 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A immününreaktivite incelemeleri için testis doku örnekleri %4'lük paraformaldehit içerisine alınarak, oda ısısında 24 saat süreyle tespit edildi. Leica TP 1020 ototeknikon

cihazı ile rutin doku takipleri yapıldıktan sonra parafine gömülen doku örneklerinden, polilizin kaplı lamlara 4 µm kalınlığında parafin kesitler alındı. Kesitler ilk olarak fön makinesi ile kurutularak 15 dakika buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkarılan kesitler tekrar fönle kurutuldu ve ardından 60^{o}C'de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Daha sonra oda ısındaki ksilol içerisinde 3 dakika daha bekletilen testis doku kesitleri, derecesi giderek azalan alkol serileri ile hidrate edildi. Distile suyun ardından sitrat solüsyonu (pH: 6) içerisine alınan kesitler 95^{o}C'lik su banyosunda, 30 dakika bekletilerek antijenlerin açığa çıkması sağlandı. Ardından oda ısısında 45 dk soğutulan kesitler, distile suda yıkanarak endojen peroksitlerin bloklanması için %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) içerisine alındı ve 15 dakika kadar bekletildikten sonra, distile su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice kurulandıktan sonra üzerine nonspesifik bağlanmayı engellemek için blocking solüsyonu (ab93705, abcam, USA) damlatıldı ve oda ısısında 20 dakika bekletildi. Ardından kesitler distile su ve fosfat tamponundan geçirildi ve dokuların etrafı kurutma kağıdı ile kurulandı. 1/2000 oranında sulandırılan Anti-HSD3B1 (ab150384, abcam), 1/2000 oranında sulandırılan Anti-INSL3 (ab65981, abcam) ve 1/1000 oranında sulandırılan GPRC6A (NLS2576, Novus) primer antikorları damlatıldı. Primer antikor damlatılan tüm kesitler +4^{o}C'de, nemli ortamda 1 gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikorlar yerine, dilüsyon solusyonu damlatıldı. Ertesi gün oda ısısına alınan kesitler 1 saat daha primer antikor ile muamele edildi. 1 saatin sonunda distile su ve PBS'den geçirilen kesitlerin etrafı kurulandı. Üzerlerine Biotin (ab93705, abcam, USA) damlatılarak 15 dk bekletildi. 15 dk sonra distile su ve PBS ile yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Avidin (ab93705, abcam, USA) damlatılarak, 20 dakika oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitlerin üzerine, aminoetilkarbozol (AEC, ab93705, abcam, USA) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi, çeşme suyu ile yıkandı ve doku kesitleri zıt boyama için hematoksilen solüsyonunda 30 saniye boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı. Olimpus BX53 ışık mikroskobu (Japan) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.4.1. İmmunohistokimyasal Skorlama Yöntemi

Testis doku örneklerinde 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A ekspresyonlarının yaygınlık ve şiddetini semi-kantitatif olarak değerlendirmek amacıyla "Histoskor (H-skor) Sistemi" kullanıldı. Bu amaçla her bir testiste x40'lık objektifte rastgele seçilen 10 alanda immünpozitif hücre yüzdesiyle birlikte dört farklı boyanma yoğunluklarının çarpımları toplanarak her grup için bir H-skor elde edildi (237).

Boyanma derecesi = 0 (Boyanma yok)
= 1 (Zayıf boyanma)
= 2 (Orta derecede boyanma)
= 3 (Şiddetli boyanma) şeklinde değerlendirildi.

H-skor değerini hesaplamak için "ΣPi(I + 1)" formülü kullanıldı.
I: Intensity (Yoğunluk)
PC: Percentage of stained cells for each intensity (Her derecede boyanan hücre yüzdesi)

Gruplara ait her bir testiste x40'lık objektifte rastgele seçilen 10 alanda boyanma farklılığı gözetmeksizin Leydig hücre markırı 3βHSD pozitif hücre sayısı hesaplandı (238).

3.5. Elektron mikroskobi Yöntemleri

Elektron mikroskobik doku analizi için Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış, % 5'lik glutaraldehit solüsyonuna alınan testis doku örnekleri, 1 saatin sonunda 1 mm^3'lük parçalara ayrıldı. Ayrılan doku parçaları tekrar %5'lik glutaraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat süresince tespit edildi. Böylece dokular toplam olarak 4 saat süreyle tespit edilmiş oldu. Birinci tespit işleminden sonra dokular Millionig fosfat tamponunda 2 kez 10'ar dakika süreyle yıkandı. Ardından Millionig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik osmium tetraoksit solüsyonu ile 2 saatlik ikinci defa tespit işlemine tabi tutuldu. İkinci tespitten sonra dokular tekrar Millionig fosfat tamponu ile 2 kez 10'ar dakika süreyle yıkandı. Daha sonra dokular, Tablo 4'de belirtilen sıraya göre derecesi giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.

Çizelge 4. Elektron mikroskobik doku takibinde dehidratasyon, şeffaflandırma ve immersiyon işlemi.

%50'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%70'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%86'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%96'lik etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C'de	15 dakika
%100'lük etil alkol	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen Oksit+ Gömme materyali	Oda sıcaklığında	30 dakika
Propilen Oksit+ Gömme materyali	Oda sıcaklığında	30 dakika

Bu işlemlerden sonra doku parçaları Tablo 5'te belirtilen şekilde hazırlanan rezin içerisine alındı ve 1 gece boyunca rotatorda döndürülerek karıştırıldı, böylece rezinin doku parçaları içerisine daha iyi nüfuz etmesi sağlandı.

Çizelge 5. Gömme materyalinin hazırlanışı.

Araldehit (CY 212)	20 ml
Sertleştirici (HY 964)	20 ml
Hızlandırıcı (DY 064)	0,6 ml
Plastikleştirici-Dibütil Fitalat	1ml

Ertesi gün rotatordan alınan doku parçaları, taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak beem kapsüllere gömüldü ve 60°C etüvde 48 saat polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Ultracut S ultramikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı ve doku bloklarında uygun alanların seçimi yapıldı. Belirlenen alanlardan ultramikrotom ile 50 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridler üzerinde toplanarak %70'lik etil alkolde hazırlanan doymuş uranil asetat ile

Reynolds'un kurşun nitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japonya) ile incelendi ve mikrograflar elde edildi

3.6. Biyokimyasal Analiz

Tüm deney gruplarından alınan intrakardiak kan örnekleri 3000 devirde 20 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma kısmı ayrıldı. Serum kısmı epandorf tüplerde -20^{o}C'de bekletildi. Serum örneklerinin LH, testosteron, ve Glu-OC seviyeleri; LH (CSB-E12654r, Cusabio), testosteron (CSB-E05100r, Cusabio) ve Glu-OC (E-EL-R2477, Elabscience) ELISA kitleri kullanılarak, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından manuel olarak ölçüldü ve Epoch Elisa Reader cihazı ile sonuçlar okundu.

3.7. İstatiksel analiz

İmmünohistokimyasal skorlamaların ve biyokimyasal verilerin değerlendirmesinde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. USA) Programı kullanıldı. Verilerin normal dağılımlı olup olmadıkları "D'Agostino&Pearson omnibüs normality test" ile değerlendirildi. İmmünreaktivite skorları ile Leydig hücre sayısı ve biyokimyasal verilerin, kontrol grupları ile arasındaki farklılıkları değerlendirmek için "Mann Whitney U testi" kullanıldı. EDS uygulaması sonrasında 4. gün sakrifiye edilen deneklerin biyokimyasal verilerini kontrol grubu ile kıyaslamada ise Unpaired t-testi uygulandı. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskobik Bulgular

4.1.1. Grup 1A: Kontrol grubu

Postnatal 63. güne kadar normal laboratuvar şartlarında yaşatılan kontrol grubu deneklere ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde, testis parankimasının, dıştan fibroelastik bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea ile sarılı olduğu ve çok sayıda seminiferöz tübüller ile interstisyumdan oluştuğu görüldü. Membrana propria ile desteklenmiş seminiferöz tübüller, spermatojenik hücreler ve Sertoli hücreleriyle döşeliydi. Seminiferöz tübül epiteli bazal lamina üzerine oturan spermatogonyumlar, geniş sitoplazmalı oval çekirdeğe sahip primer spermatositler ve lümene yakın yerleşim gösteren küçük spermatidlerden oluşmaktaydı. Uzun, iğ şekilli çekirdekleri ile karakterize spermatozoonlar, seminiferöz tübül lümeninde yer almaktaydı. Üçgen ya da oval şekilli çekirdeğe sahip Sertoli hücreleri bazalden lümene kadar uzanmaktaydı. Gevşek bağ dokusu yapısında olan interstisyum, kan ve lenf damarları dışında, gelişimini tamamlamış düzensiz poligonal şekilli, eozinofilik sitoplazmalı, kromatinden fakir büyük bir çekirdeğe sahip yetişkin Leydig hücrelerini içermekteydi (Şekil 8A).

4.1.2. Grup 1B: GnRH antagonisti uygulanan grup

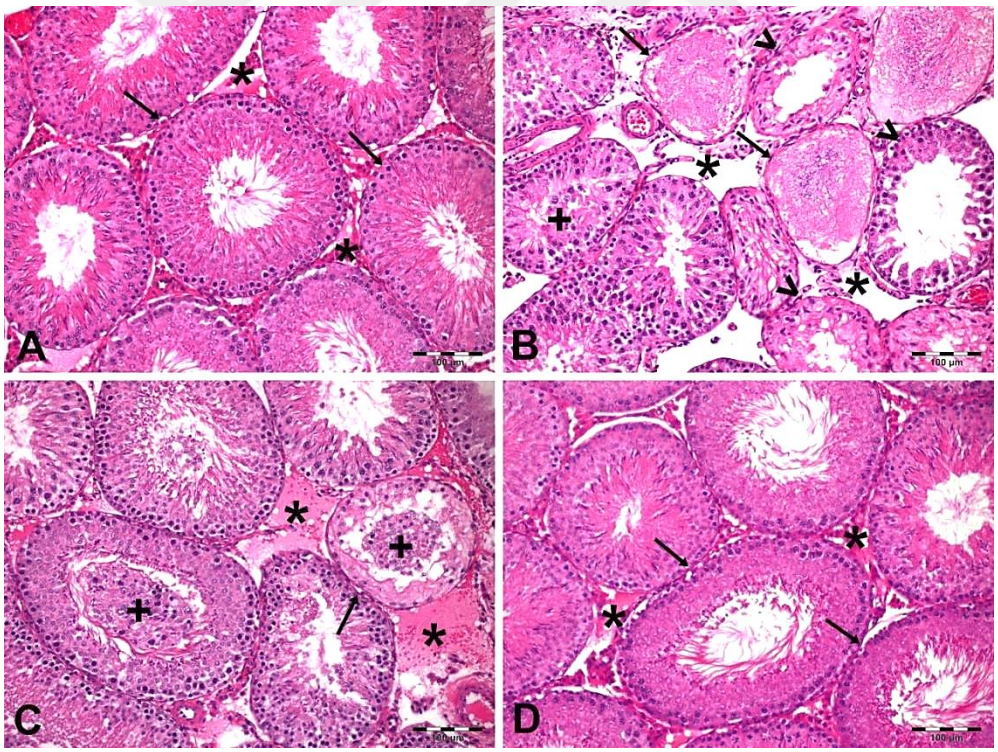
Postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti uygulanan deneklere ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde, çok sayıda seminiferöz tübülde spermatojenik arrest sonucu seminiferöz tübül epitelinin tamamen döküldüğü ve bazı tübüllerin vakuolize görünüm aldığı görüldü. Ayrıca seminiferöz tübül epitelinde dökülmeye bağlı olarak, birçok tübülün lümeninde immatur spermatojenik hücre birikimine rastlanıldı. Membrana propriada kalınlaşma ve düzensizlik dikkati çekti. Tübüllerdeki büzüşme ve Leydig hücre sayısının, atrofi nedeniyle azalmasına bağlı olarak, insterstisyal alanda genişleme ve ödem gözlendi (Şekil 8B).

4.1.3. Grup 1C: GnRH antagonisti ve Osteokalsin uygulanan grup

Postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklerin testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde, nispeten daha az sayıda tübülde dökülmeye bağlı vakuolize görünüm izlendi. Ancak tübül lümenlerinde immatur spermatojenik hücre birikimi ile birlikte interstisyal alanda Leydig hücre sayısında azalmanın ve ödemin devam ettiği dikkati çekti (Şekil 8C).

4.1.4. Grup 1D: Osteokalsin uygulanan grup

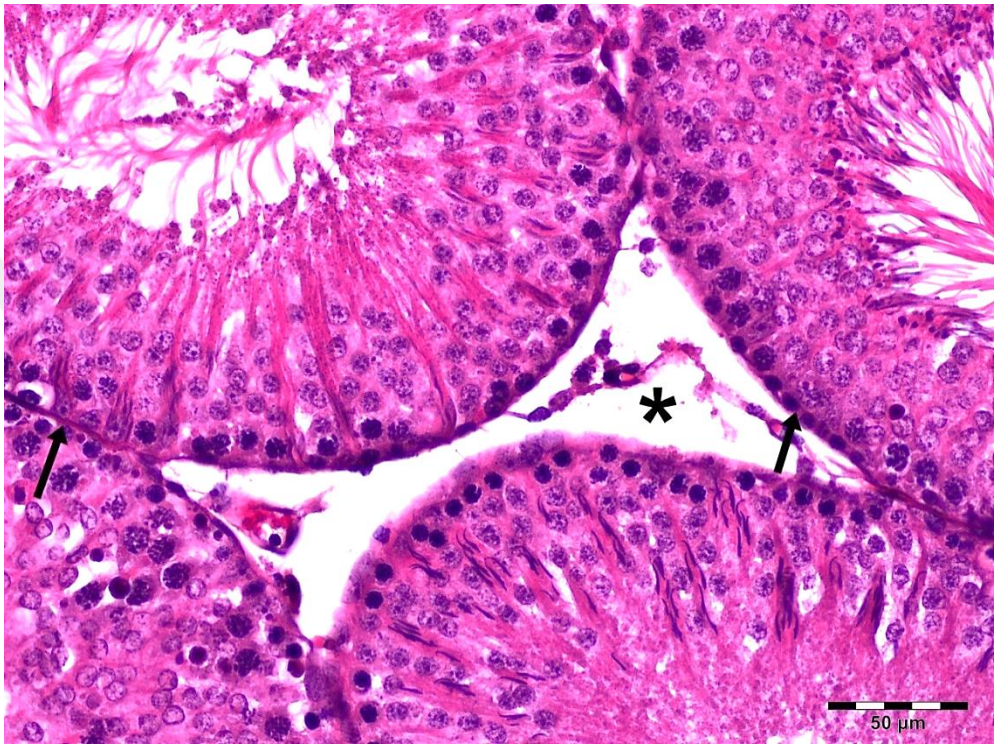
Postnatal 35-63. günler arasında yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerin testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde seminiferöz tübüllerin ve insterstisyumun kontrol grubuna benzer görünümde olduğu görüldü. İnterstisyal alanda yer alan Leydig hücrelerinin yapı ve dağılım yönlerinden normal olduğu izlendi (Şekil 8D).



Şekil 8. Grup 1 deneklerine ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik görünümü. **A)** Grup 1A'da normal görünümlü seminiferöz tübüller (oklar) ve interstisyal alan (*) izlenmektedir. H&E. Bar: 100 µm. **B)** Grup 1B'de seminiferöz tübül epitelinde vakuolize görünüm (ok başları), tübül lümenlerinde immatur hücre birikimi (+), içleri boşalmış seminiferöz tübüller (oklar) ve insterstisyal ödem (*) görülmektedir. H&E. Bar: 100 µm. **C)** Grup 1C'de seminiferöz tübüllerde vakuolizasyon (oklar), tübül lümenlerinde immatur hücre birikimi (+) ve insterstisyal ödem (*) devam etmektedir. H&E. Bar: 100 µm. **D)** Grup 1D'de seminiferöz tübüller (oklar) ve insterstisyal alan (*) normal görünümdedir. H&E. Bar: 100 µm.

4.1.5. EDS ile indüklenmiş Leydig hücre hasarı grubu

Tek doz EDS uygulaması sonrası 4. gün sakrifiye edilen deneklerin testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde, seminiferöz tübül yapılarının bütünlüğünü koruduğu, insterstisyal alanda Leydig hücrelerinin bulunmadığı, ancak diğer bağ dokusu hücrelerinin yer aldıkları belirlendi (Şekil 9).



Şekil 9. Tek doz EDS uygulamasından 4 gün sonra sakrifiye edilen deneklere ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik görünümü. Normal görünümlü seminiferöz tübüller (oklar) ve yetişkin Leydig hücrelerinden yoksun interstisyal alan (*) izlenmektedir. H&E. Bar: 50 µm.

4.1.6. Grup 2A: Kontrol grubu

Tek doz EDS uygulamasından sonra, 63 gün boyunca normal laboratuvar şartlarında yaşatılan deneklere ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde, seminiferöz tübüller ve interstisyumun dıştan tunika albuginea ile sarılı oldukları görüldü. Spermatojenik hücreler ve Sertoli hücreleri ile döşeli seminiferöz tübüller membrana propria ile çevrelenmişti. Spermatogonyumlarla birlikte bazal lamina üzerine oturan Sertoli hücrelerinin sitoplazması, bazalden lümene kadar uzanmaktaydı. Primer spermatositler oval bir çekirdeğe ve geniş sitoplazmaya sahipti. Koyu boyanan küçük bir çekirdeğe sahip spermatidler ise lümene yakın yerleşim göstermekteydi. Uzun iğ şekilli çekirdekleri ile karakterize spermatozoonlar,

seminiferöz tübül lümeninde yer almaktaydı. İnterstisyumda gelişimini tamamlamış, düzensiz poligonal şekilli, eozinofilik sitoplazmaya sahip yetişkin Leydig hücreleri, kromatinden fakir büyük bir çekirdek ile karakterize idi. Gevşek bağ dokusu yapısında olan interstisyum, ayrıca bağ dokusu hücreleri ile kan ve lenf damarlarından zengindi. (Şekil 10A).

4.1.7. Grup 2B: GnRH antagonisti uygulanan grup

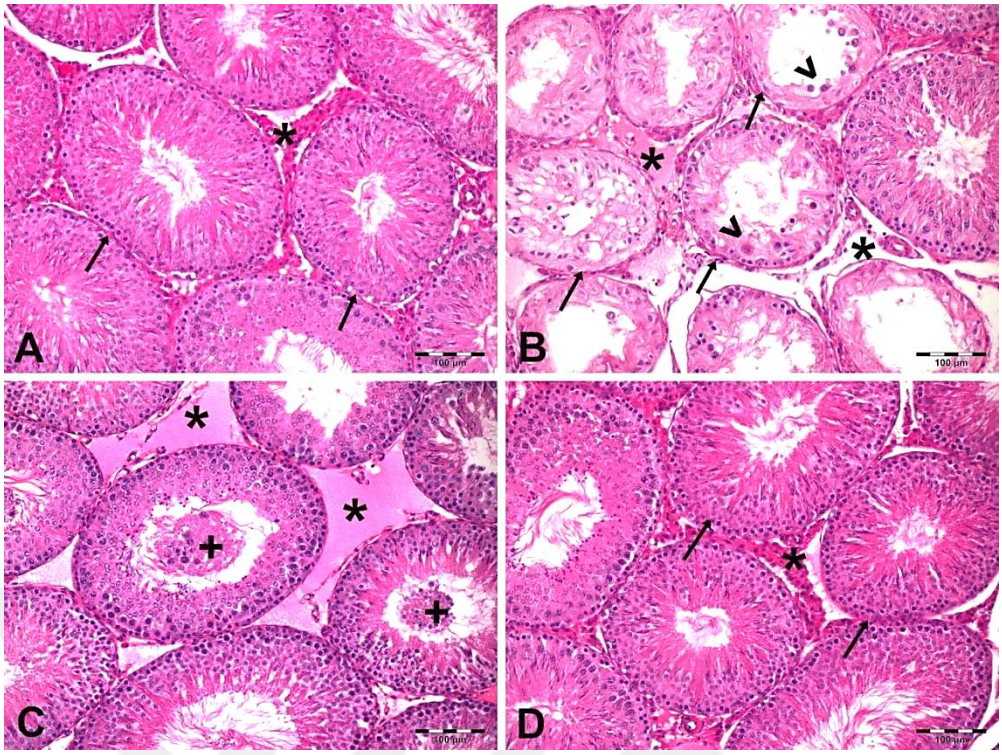
Tek doz EDS uygulamasından sonra 35-63. günler arasında GnRH antagonisti uygulanan deneklere ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde, çok sayıda seminiferöz tübülde ve interstisyumda önemli dejeneratif değişiklikler gözlendi. Seminiferöz tübül epitelinde vakuolizasyon ile birlikte hyalinizasyon izlendi. Ayrıca bazı seminiferöz tübüllerin epitelinde dökülmeye bağlı olarak epitel kalınlığında azalma görüldü. Spermatojenik arrest nedeniyle birçok seminiferöz tübül epitelinde çok çekirdekli dev spermatojenik hücrelere rastlanıldı. Membrana proprianın kalın ve düzensiz bir hal aldığı görüldü. Ayrıca tübüllerde büzüşmeye bağlı olarak interstisyal alanda geniş boşlukların varlığı izlendi. İnsterstisyal alanın esas hücreleri olan Leydig hücrelerinin, atrofi nedeniyle sayıca azaldıkları dikkati çekti (Şekil 10B).

4.1.8. Grup 2C: GnRH antagonisti ve Osteokalsin uygulanan grup

Tek doz EDS uygulamasından sonra 35-63. günler arasında GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklere ait testis doku kestlerinin ışık mikroskobik incelemesinde, birçok seminiferöz tübülün normal görünümde olmasına rağmen, bazı tübüllerde spermatojenik arrest nedeniyle immatur hücre birikimlerine rastlanıldı. Membrana propria nispeten normal görünümdeydi. İnsterstisyal alanda ise ödemle birlikte Leydig hücre sayısında azalma sonucu oluşan geniş boşluklar dikkati çekti (Şekil 10C).

4.1.9. Grup 2D: Osteokalsin uygulanan grup

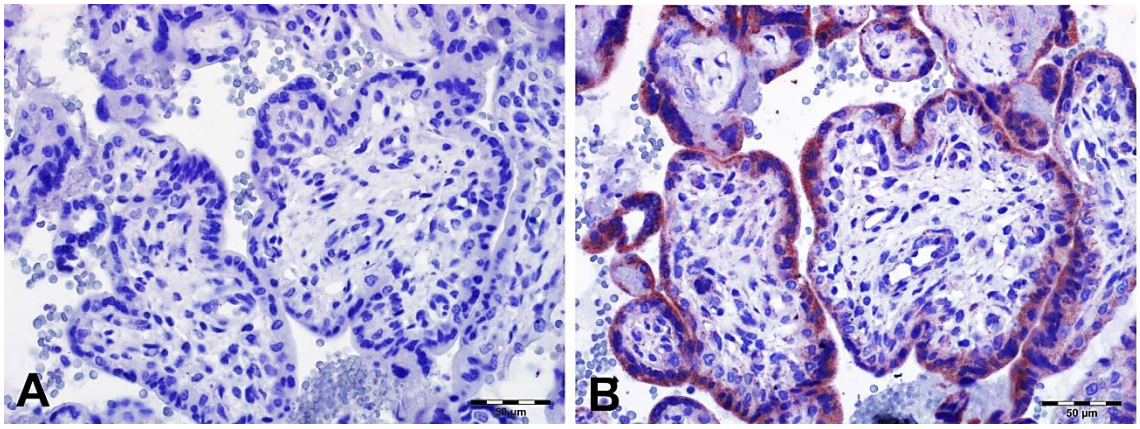
Tek doz EDS uygulamasından sonra 35-63. günler arasında yalnızca osteokalsin uygulanan deneklere ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik incelemesinde, seminiferöz tübüller ve insterstisyumun normal görünümde olduğu izlendi. Leydig hücrelerinin yapı ve dağılımlarının kontrol grubuna benzediği görüldü (Şekil 10D).



Şekil 10. Grup 2 deneklerine ait testis doku kesitlerinin ışık mikroskobik görünümü. **A)** Grup 2A'da seminiferöz tübüller (oklar) ve interstisyal alan (*) normal görünümdedir. H&E. Bar: 100 µm. **B)** Grup 2B'de seminiferöz tübül epitelinde vakuolizasyon (oklar) ve çok çekirdekli dev spermatojenik hücreler (ok başları) ile insterstisyal alanda ödem (*) görülmektedir. H&E. Bar: 100 µm. **C)** Grup 2C'de bazı seminiferöz tübül lümenlerinde immatur hücre birikiminin (+) ve insterstisyal ödemin (*) devam ettiği dikkati çekti. H&E. Bar: 100 µm. **D)** Grup 2D'de normal görünümlü seminiferöz tübüller (oklar) ve insterstisyal alan (*) izlenmektedir. H&E. Bar: 100 µm.

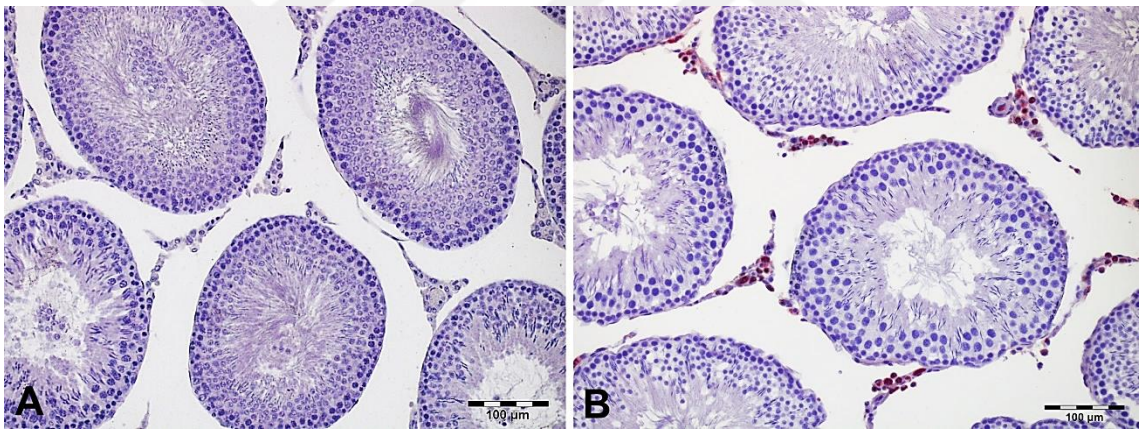
4.2. İmmunohistokimya Bulguları

İnsan plasentasında 3βHSD immünreaktivitesinin gösterildiği pozitif kontrol kesitleri ile primer antikor damlatılmayan negatif kontrol kesitleri görülmektedir (Şekil 11).



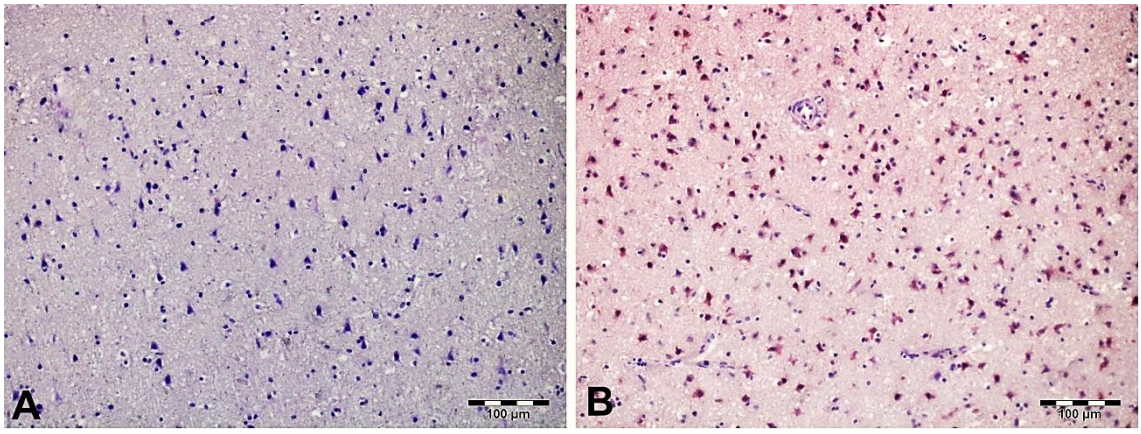
Şekil 11. 3βHSD immünreaktivitesi. **A)** Negatif kontrol. İnsan plasentasına ait doku kesitinde 3βHSD immünreaktivitesi görülmemektedir. Bar: 50 µm. **B)** Pozitif kontrol. İnsan plasentasında özellikle sinsityotrofoblast tabakasında 3βHSD immünreaktivitesi görülmektedir. Bar: 50 µm.

Testis doku örneklerinde INSL3 immünreaktivitesinin gösterildiği pozitif kontrol ve primer damlatılmayan negatif kontrol kesitleri görülmektedir (Şekil 12).



Şekil 12. INSL3 immünreaktivitesi. **A)** Negatif kontrol. Testis doku kesitinde INSL3 immünreaktivitesi görülmemektedir. Bar: 100 µm. **B)** Pozitif kontrol. Testis doku kesitinde Leydig hücrelerinde INSL3 immünreaktivitesi görülmektedir. Bar: 100 µm.

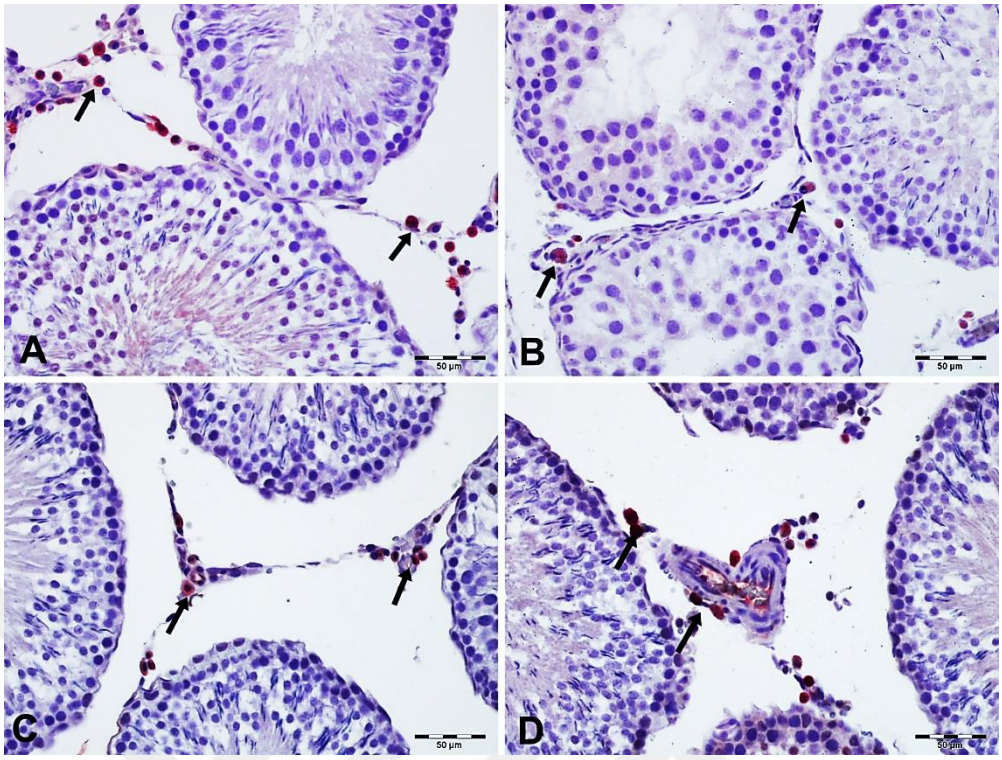
Beyin dokusunda GPRC6A immünreaktivitesinin gösterildiği pozitif kontrol kesitleri ile primer antikor damlatılmayan negatif kontrol kesitleri görülmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. GPRC6A immünreaktivitesi. **A)** Negatif kontrol. Beyin dokusu kesitinde GPRC6A immünreaktivitesi görülmemektedir. Bar: 100 µm. **B)** Pozitif kontrol. Beyin dokusu kesitinde özellikle nöronlarda GPRC6A immünreaktivitesi görülmektedir. Bar: 100 µm.

4.2.1. Grup 1 3βHSD İmmünohistokimyasal Bulgular

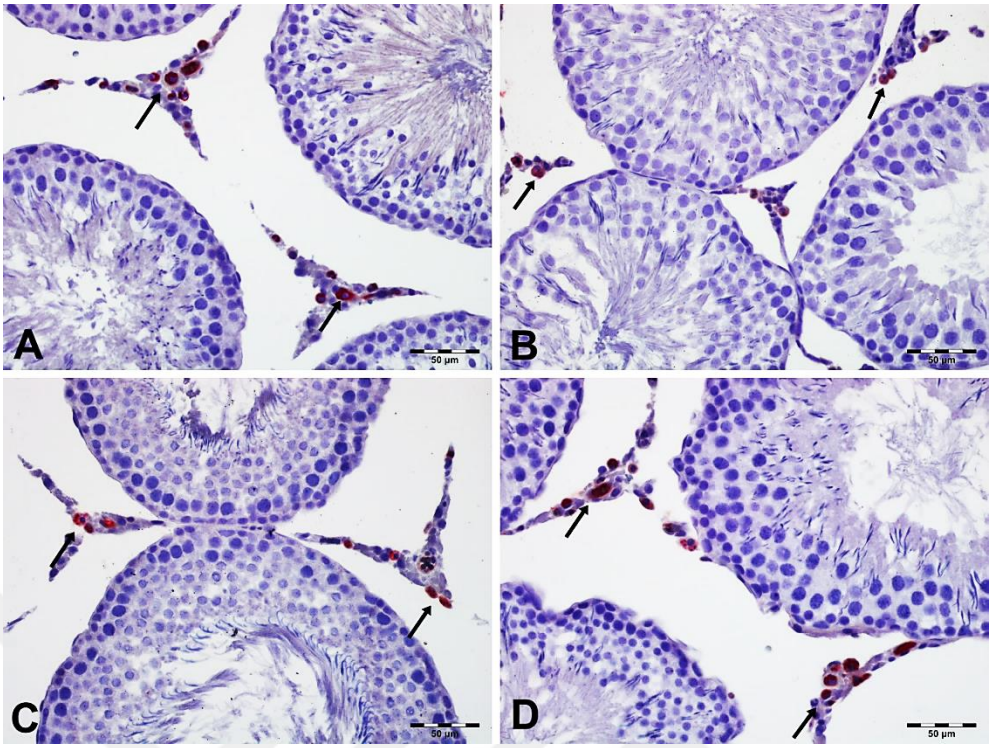
Postnatal 63. güne kadar herhangi bir uygulama yapılmadan sakrifiye edilen kontrol grubu deneklerine (Grup 1A) ait testis doku kesitlerinin insterstisyumunda yer alan yetişkin Leydig hücrelerinde, Leydig hücre markırı olan 3βHSD ekspresyonunun yoğun olduğu gözlendi (Şekil 14A). Ancak postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti uygulanan (Grup 1B) deneklere ait testis doku kesitlerinde ise 3βHSD ekspresyonunun belirgin olarak azaldığı dikkati çekti (Şekil 14B). Postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan (Grup 1C) deneklerin testis doku kesitlerinde, osteokalsinin 3βHSD immünreaktivitesini, Grup 1B deneklerininkine kıyasla bir miktar arttırdığı görüldü (Şekil 14C). Postnatal 35-63. günler arasında yalnızca osteokalsin uygulaması yapılan deneklere ait (Grup 1D) testis doku kesitlerinin immünohistokimyasal incelemesinde de interstisyumunda yer alan yetişkin Leydig hücrelerinde 3βHSD ekspresyonunun kontrol grubuna (Grup 1A) benzer olduğu dikkati çekti (Şekil 14D).



Şekil 14. Grup 1 3βHSD immünreaktivitesi. **A)** Grup 1A testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde yüksek 3βHSD ekspresyonu izlenmektedir. Bar: 50 µm. **B)** Grup 1B testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde 3βHSD ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Bar: 50 µm. **C)** Grup 1C testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde 3βHSD ekspresyonunda bir miktar artış görülmektedir. Bar: 50 µm. **D)** Grup 1D testis doku kesitlerine ait Leydig hücrelerinde yoğun 3βHSD ekspresyonu izlenmektedir. Bar: 50 µm.

4.2.2. Grup 1 INSL3 İmmünohistokimyasal Bulguları

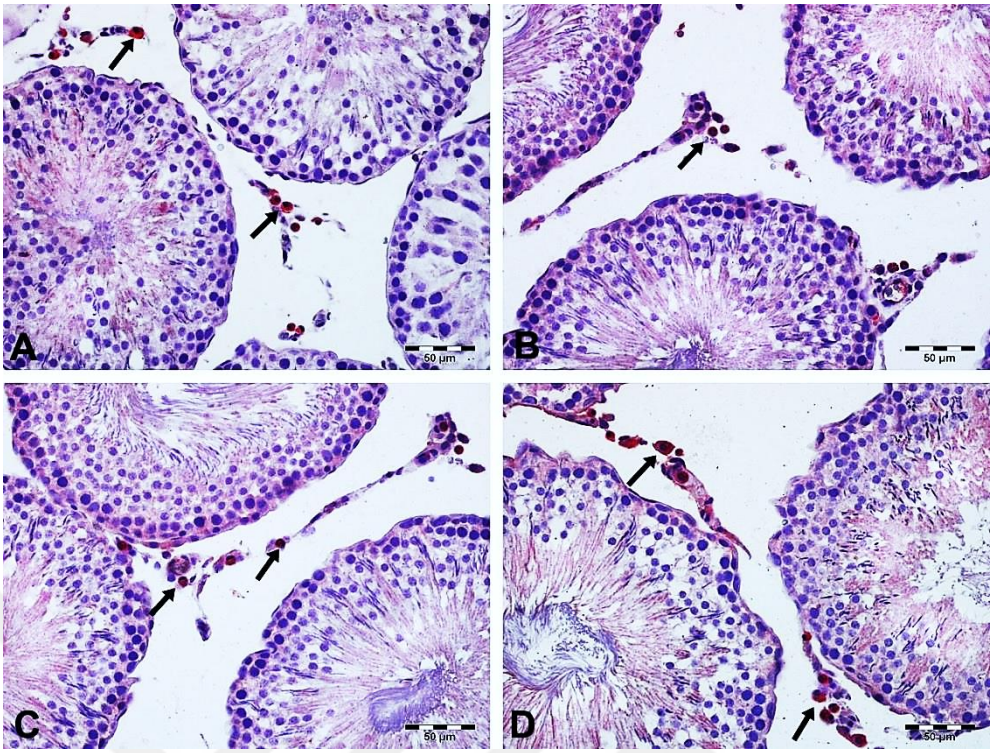
Postnatal 63. gün sakrifiye edilen kontrol grubu deneklerine ait (Grup 1A) testis doku kesitlerinin immünohistokimyasal incelemesinde, yetişkin Leydig hücreleri için fonksiyon belirteci olan INSL3 ekspresyonunun oldukça yoğun olduğu görüldü (Şekil 15A). Postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti uygulanan (Grup 1B) deneklerin testis doku kesitlerinde ise INSL3 ekspresyonunun azaldığı (Şekil 15B), benzer şekilde, postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan (Grup 1C) deneklerde de, Leydig hücre fonksiyon bozukluğunun devam etmesi nedeniyle, INSL3 ekspresyonunda azalmanın sürdüğü dikkati çekti (Şekil 15C). Postnatal 35-63. günler arasında yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerde (Grup 1D) ise, osteokalsin etkisinde, INSL3 ekspresyonunun da arttığı gözlendi (Şekil 15D).



Şekil 15. Grup 1 INSL3 immünreaktivitesi. **A)** Grup 1A testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde INSL3 ekspresyonunun yoğun olduğu görülmektedir. Bar: 50 µm. **B)** Grup 1B testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinin INSL3 ekspresyonunda azalma izlenmektedir. Bar: 50 µm. **C)** Grup 1C testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde INSL3 ekspresyonunda azalmanın devam ettiği dikkati çekmektedir. Bar: 50 µm. **D)** Grup 1D testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde yüksek INSL3 ekspresyonu izlenmektedir. Bar: 50 µm.

4.2.3. Grup 1 GPRC6A İmmünohistokimyasal Bulguları

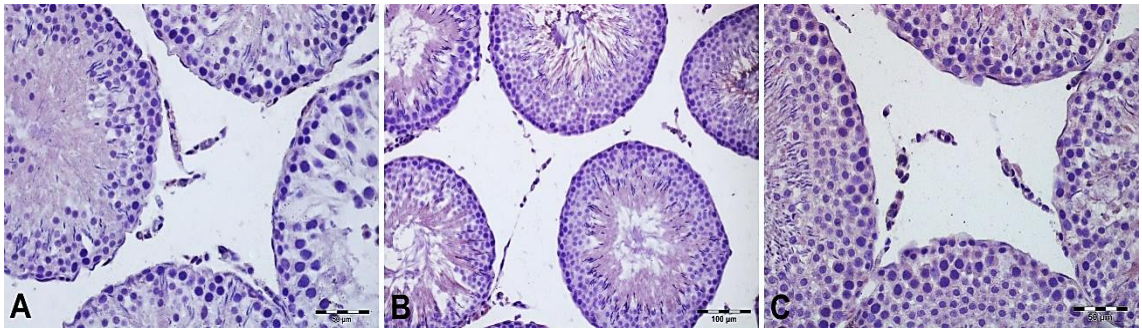
Postnatal 63. günde hiçbir bir uygulama yapılmadan sakrifiye edilen kontrol grubu deneklerine ait (Grup 1A) testis doku kesitlerinin immünohistokimyasal incelemesinde, insterstisyumda yer alan yetişkin Leydig hücrelerinde yoğun osteokalsin reseptörü GPRC6A ekspresyonu izlendi (Şekil 16A). Postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti uygulanan deneklerde (Grup 1B) ise, Leydig hücre sayısında azalmaya bağlı olarak, GPRC6A ekspresyonunun azaldığı görüldü (Şekil 16B). Postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklerin (Grup 1C) testis doku kesitlerinde GPRC6A ekspresyonunun, çok az miktarda artış gösterdiği izlendi (Şekil 16C). Buna karşın postnatal 35-63. günler arasında yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerde (Grup 1D) ise Grup 1A ile karşılaştırıldığında, GPRC6A ekspresyonunda belirgin artış dikkati çekti (Şekil 16D).



Şekil 16. Grup 1 GPRC6A immünreaktivitesi. **A)** Grup 1A testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde yüksek GPRC6A ekspresyonu görülmektedir. Bar: 50 µm. **B)** Grup 1B testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinin GPRC6A ekspresyonunun azaldığı dikkati çekmektedir. Bar: 50 µm. **C)** Grup 1C testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde GPRC6A ekspresyonunda azalmanın devam ettiği görülmektedir. Bar: 50 µm. **D)** Grup 1D testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde GPRC6A ekspresyonunun yoğun olduğu görülmektedir. Bar: 50 µm.

4.2.4. EDS ile indüklenmiş Leydig hücre hasarı grubu

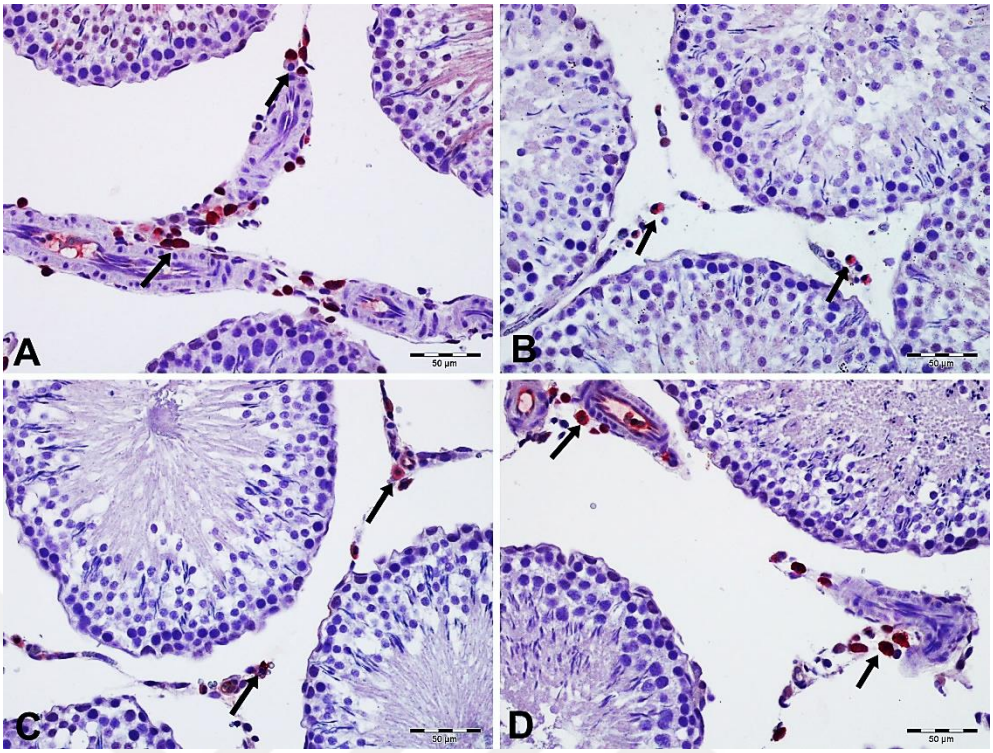
Tek doz EDS uygulaması ile yetişkin Leydig hücrelerinin elimine edilip edilmediğinin gösterilebilmesi amacıyla EDS sonrası 4. gün sakrifiye edilen deneklerin testis doku kesitlerinde; 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A ekspresyonu görülmedi. İnterstisyumda herhangi bir ekspresyonun gözlenmemesi, EDS'nin etkin şekilde Leydig hücrelerini elimine ettiği şeklinde yorumlandı (Şekil 17).



Şekil 17. EDS enjeksiyonu sonrasında 4. gün sakrifiye ettiğimiz deneklere ait testis doku kesitlerinde **A)** 3βHSD **B)** INSL3 **C)** GPRC6A immünreaktivitesi görülmemektedir. Bar: 50 µm.

4.2.5. Grup 2 3βHSD İmmünohistokimyasal Bulgular

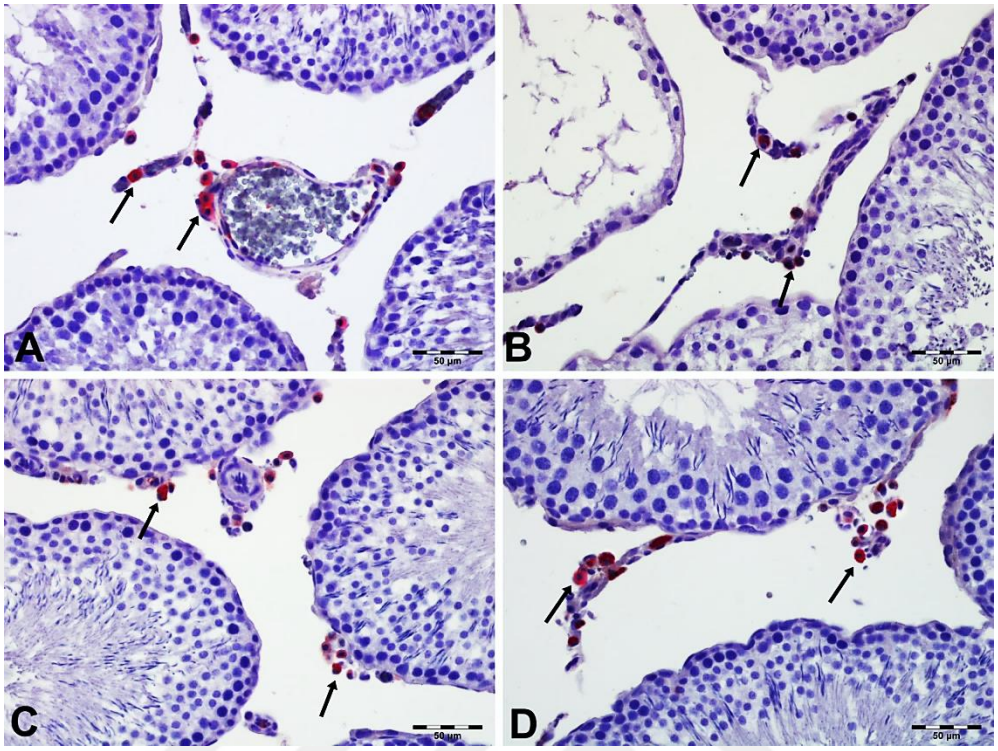
Tek doz EDS uygulaması sonrası herhangi bir uygulama yapılmadan 63. günde sakrifiye edilen kontrol grubu deneklerin (Grup 2A), testis doku kesitlerinin immünohistokimyasal incelemesinde, interstisyumda rejenerasyonunu tamamlayan, yeni yetişkin Leydig hücre popülasyonunda Leydig hücre markırı 3βHSD ekspresyonu yoğun olarak izlendi (Şekil 18A). Tek doz EDS enjeksiyonu sonrasında 35-63. günler arasında GnRH antagonisti uygulanan deneklere ait (Grup 2B) testis doku kesitlerinde ise 3βHSD ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı gözlendi (Şekil 18B). Tek doz EDS enjeksiyonu sonrasında 35-63. günler arasında GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklerin (Grup 2C) testis doku kesitlerinde, yeni yetişkin Leydig hücre popülasyonunda GnRH antagonisti nedeniyle azalan 3βHSD ekspresyonunun, osteokalsine bağlı olarak belirgin bir artış sergilemediği dikkati çekti (Şekil 18C). Ancak tek doz EDS enjeksiyonu sonrasında 35-63. günler arasında, yalnızca osteokalsin uygulaması yapılan deneklerin (Grup 2D) testis doku kesitlerinde ise, 3βHSD ekspresyonunun Grup 2A'ya benzer olduğu görüldü (Şekil 18D).



Şekil 18. Grup 2 3βHSD immünreaktivitesi. **A)** Grup 2A testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde 3βHSD ekspresyonunun yüksek olduğu görülmektedir. Bar: 50 µm. **B)** Grup 2B testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde 3βHSD ekspresyonunda azalma izlenmektedir. Bar: 50 µm. **C)** Grup 2C testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde 3βHSD ekspresyonunda azalma devam etmektedir. Bar: 50 µm. **D)** Grup 2D testis doku kesitlerine ait Leydig hücrelerinde yoğun 3βHSD ekspresyonu izlenmektedir. Bar: 50 µm.

4.2.6. Grup 2 INSL3 İmmünohistokimyasal Bulgular

Tek doz EDS uygulamasından sonra, 63. günde sakrifiye edilen kontrol grubu deneklerin (Grup 2A), testis doku kesitlerinin immünohistokimyasal incelemesinde, rejenere olan yetişkin Leydig hücrelerinde yoğun INSL3 ekspresyonu gözlendi (Şekil 19A). Tek doz EDS uygulaması sonrasında, 35-63. günler arasında GnRH antagonisti uygulanan (Grup 2B) deneklere ait testis doku kesitlerinde ise, Leydig hücrelerinin sayı ve fonksiyonlarında azalmaya bağlı olarak, INSL3 ekspresyonunun belirgin şekilde azaldığı görüldü (Şekil 19B). Tek doz EDS uygulamasından sonra, 35-63. günler arasında GnRH anatagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklerde (Grup 2C), osteokalsine rağmen, INSL3 ekspresyonunda belirgin bir artışın gerçekleşmediği dikkati çekti (Şekil 19C). Tek doz EDS uygulamasından sonra 35-63. günler arasında, yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerin (Grup 2D) testis doku kesitlerinin immünohistokimyasal incelemesinde ise yetişkin Leydig hücrelerinde INSL3 ekspresyonunun Grup 2A'ya oranla belirgin olarak arttığı gözlendi (Şekil 19D).

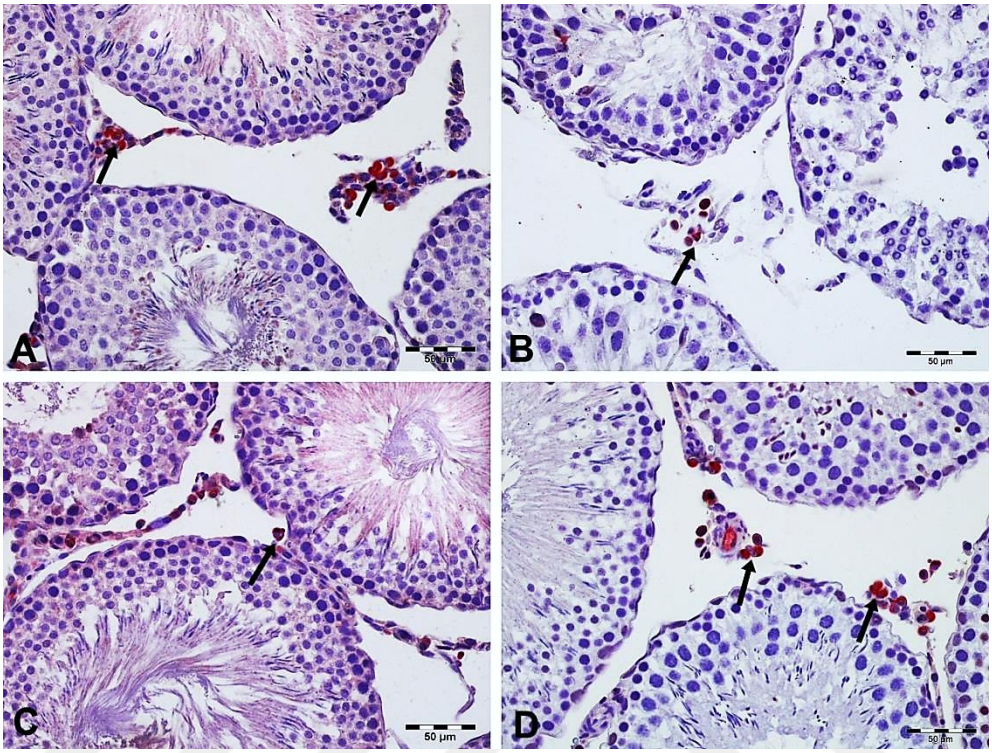


Şekil 19. Grup 2 INSL3 immünreaktivitesi. **A)** Grup 2A testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde yoğun INSL3 ekspresyonu izlenmektedir. Bar: 50 µm. **B)** Grup 2B testis doku kesitlerinde Leydig hücreleride INSL3 ekspresyonunun azaldığı görülmektedir. Bar: 50 µm. **C)** Grup 2C testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde INSL3 ekspresyonunda azalma devam etmektedir. Bar: 50 µm. **D)** Grup 2D testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde INSL3 ekspresyonunun yüksek olduğu izlenmektedir. Bar: 50 µm.

4.2.7. Grup 2 GPRC6A İmmünohistokimyasal Bulgular

Tek doz EDS uygulaması sonrası herhangi bir uygulama yapılmaksızın 63. günde sakrifiye edilen kontrol grubu deneklerinin (Grup 2A), testis doku kesitlerinin immünohistokimyasal incelemesinde, terminal farklanmasını tamamlamış olan, yeni yetişkin Leydig hücre popülasyonunda, yoğun GPRC6A ekspresyonu gözlendi (Şekil 20A). Tek doz EDS enjeksiyonu sonrası 35-63. günler arasında GnRH antagonisti uygulanan deneklerin (Grup 2B) testis doku kesitlerinde, Leydig hücre sayısında azalmaya bağlı olarak, GPRC6A ekspresyonununda belirgin bir azalma izlendi (Şekil 20B). Tek doz EDS enjeksiyonundan sonra 35-63. günler arasında, GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulaması yapılan deneklerin (Grup 2C) testis doku kesitlerinde, rejenere olan yeni yetişkin Leydig hücrelerinin GPRC6A ekspresyonunda belirgin bir artışın olmadığı görüldü (Şekil 20C). Tek doz EDS enjeksiyonunu takiben 35-63. günler arasında yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerin (Grup 2D) testis

doku kesitlerinin incelenmesinde, Leydig hücrelerinde yoğun GPRC6A ekspresyonunun varlığı dikkati çekti (Şekil 20D).

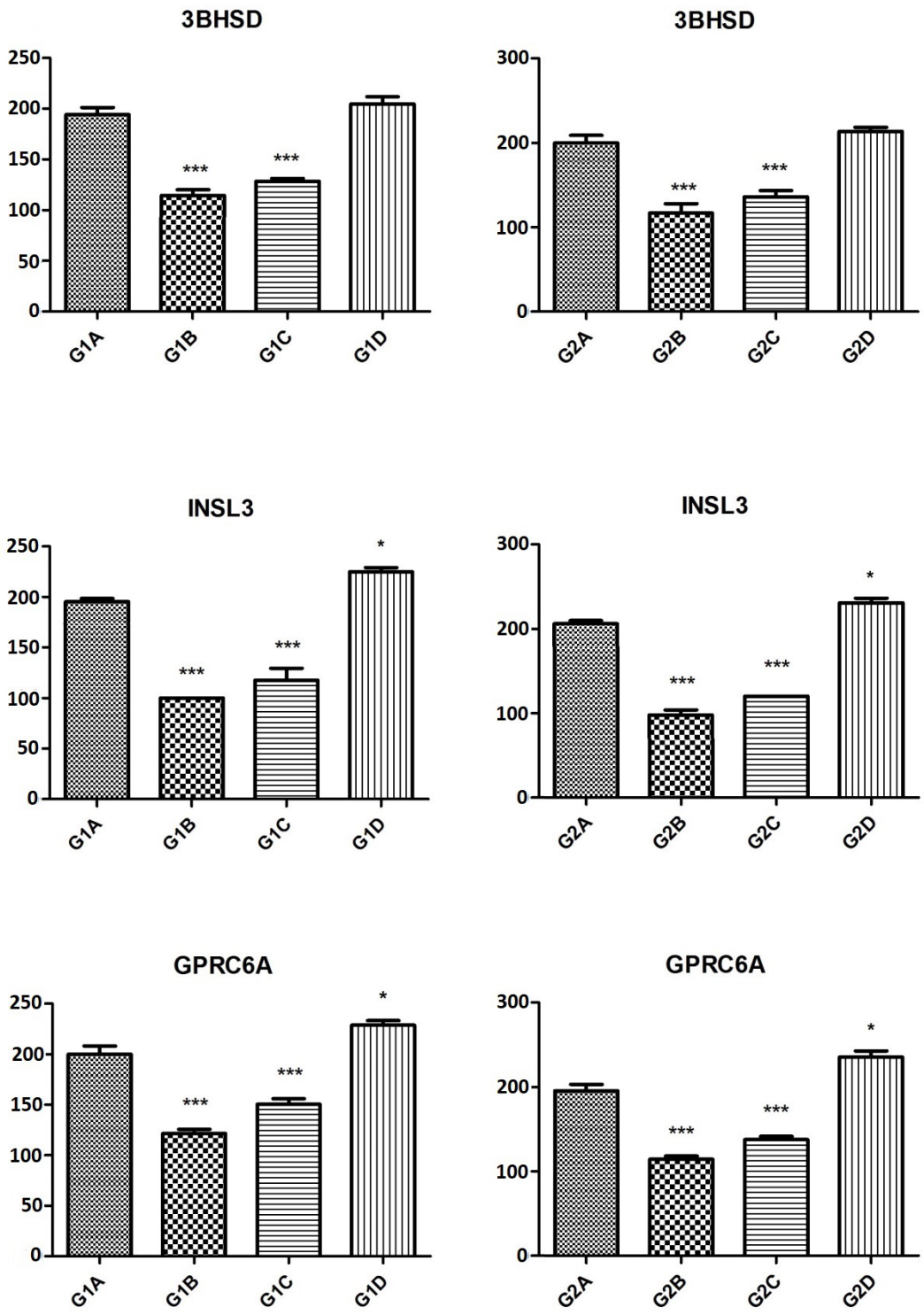


Şekil 20. Grup 2 GPRC6A immünreaktivitesi. **A)** Grup 2A testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde GPRC6A ekspresyonu yoğun olarak görülmektedir. Bar: 50 µm. **B)** Grup 2B testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde GPRC6A ekspresyonunun azaldığı izlenmektedir. Bar: 50 µm. **C)** Grup 2C testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde GPRC6A ekspresyonunda azalma devam etmektedir. Bar: 50 µm. **D)** Grup 2D testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinde GPRC6A ekspresyonunun yüksek olduğu görülmektedir. Bar: 50 µm.

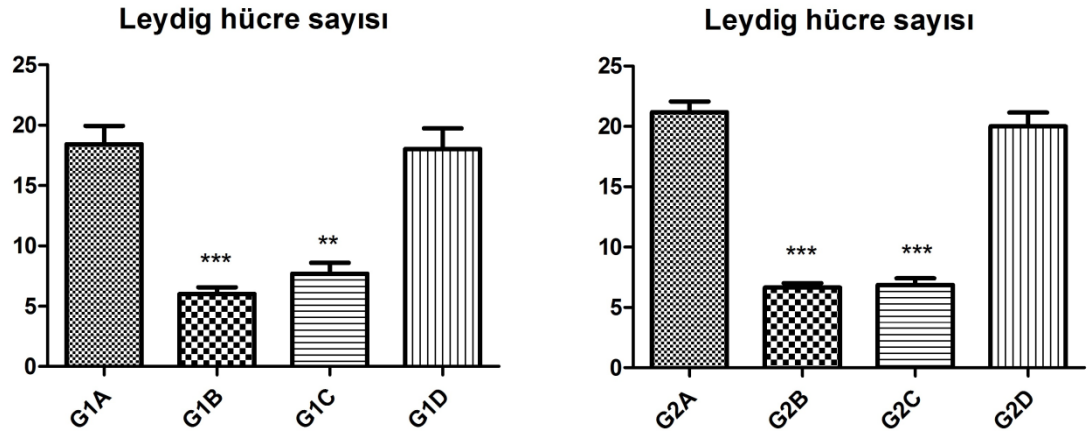
4.2.8. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal skorlama sonuçlarına göre GnRH antagonisti ve GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin verilen Grup 1B, Grup 1C, Grup 2B ve Grup 2C deneklerinin testis doku kesitlerinde, 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A immünreaktiviteleri kontrol gruplarından (Grup 1A ve Grup 2A) anlamlı olarak düşük bulundu. Grup 1B ve Grup 1C ile Grup 2B ve Grup 2C kendi içinde değerlendirildiğinde, GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklere (Grup 1C ve Grup 2C) ait testis doku kesitlerinin 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A immünohistokimyasal skorlama sonuçları, yalnızca GnRH antagonisti verilen deneklerinkine (Grup 1B ve Grup 2B) göre, anlamlı olmasa da, bir miktar yüksekti. Ancak yalnızca osteokalsin uygulaması yapılan denekler de (Grup 1D ve Grup 2D) 3βHSD immünohistokimyasal skorlama sonuçları,

kontrol gruplarına göre anlamlı bir farklılık göstermezken, aynı grupların, INSL3 ve GPRC6A immünreaktivite skorlarında, kontrol grubuna oranla, anlamlı bir artışın varlığı dikkati çekti (Şekil 21). 3βHSD pozitif Leydig hücre sayıları karşılaştırıldığında, yalnızca GnRH antagonisti verilen deneklerde (Grup 1B ve Grup 2B) Leydig hücre sayısının anlamlı şekilde azaldığı, GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklerde (Grup 1C ve Grup 2C) ise Leydig hücre sayısında hafif bir atışın gerçekleştiği görüldü. Yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerin (Grup 1D ve Grup 2D) testis doku kesitlerinde 3βHSD pozitif Leydig hücre sayılarının kontrol gruplarına göre anlamlı bir farklılık göstermediği dikkati çekti (Şekil 22).



Şekil 21. Grup 1 ve Grup 2 deneklerinin testis doku kesitlerinde Leydig hücrelerinin 3βHSD INSL3 ve GPRC6A immünreaktivite skorlarının istatistiksel değerlendirmesi. ***p< 0,0001, **p<0,001, *p<0,01.



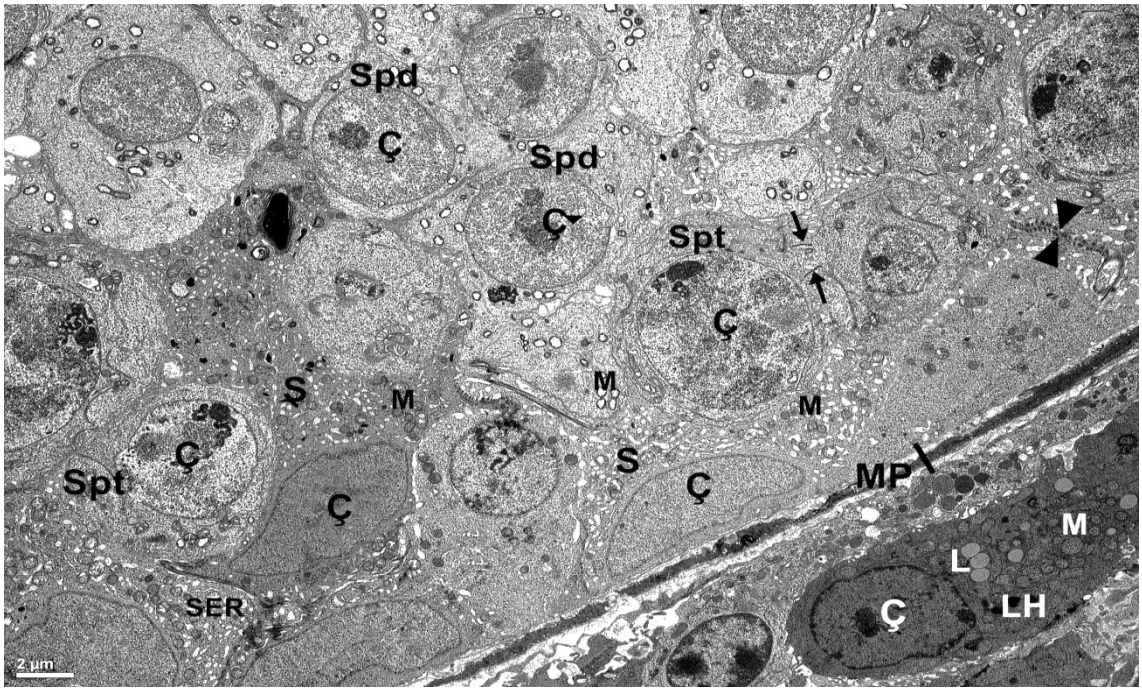
Şekil 22. Grup 1 ve Grup 2 deneklerinin testis doku kesitlerinde 3βHSD pozitif Leydig hücre sayısının istatistiksel değerlendirmesi. ***p< 0,0001, **p<0,001, *p<0,01.

4.3. Elektron Mikroskobik Bulgular

4.3.1. Grup 1A: Kontrol grubu

Postnatal 63. güne kadar normal laboratuvar şartlarında yaşatılan kontrol grubu deneklerine ait testis doku örneklerinin membrana propria ile desteklenen seminiferöz tübülleri ve interstisyumu, ince yapı düzeyinde değerlendirildi. Bazal lamina, miyoid hücreler ve kollajen liflerden oluşan membrana proprianın düzenli bir yapı sergilediği görüldü. Normal elektron densiteye sahip miyoid hücrelerin çekirdekleri yassı şekilli olup periferal kromatin içermekteydi. Sitoplazmalarında ise az sayıda mitokondriyon ve mikropinositotik veziküller bulunmaktaydı. Sferikal ve merkezi yerleşimli olan bir çekirdeğe sahip spermatogonyumların, bazal lamina üzerine oturduğu gözlendi. Primer spermatositler, oval bir çekirdeğe ve geniş sitoplazmaya sahip olmalarıyla ayırt edildi. Sekonder spermatositlerin üzerinde, lümene yakın konumda, spermatidler bulunmaktaydı. Uzun iğ şekilli çekirdekleri ile karakterize edilen spermatozoonlar seminiferöz tübül lümeninde izlendi. Spermatojenik hücreler arasında sitoplazmik köprüler görüldü. Üçgen ya da oval şekilli, indentasyonlu çekirdeğe ve bir çekirdekçiğe sahip olan Sertoli hücreleri, bazalden lümene kadar uzanmaktaydı. Sertoli hücrelerin sitoplazmasında çok iyi gelişmiş SER, belirgin Golgi kompleksi ve az gelişmiş granüler endoplazmik retikülüm (GER) ve lizozozomlar gözlendi. Lipid damlacıkları yönünden zengin olan bu hücreler, ayrıca tübüler tip mitokondriyonlara da sahipti. Komşu Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri yer almaktaydı. İnterstisyumda, düzensiz, poligonal şekilli Leydig hücreleri, büyük eksantrik ve kromatinden fakir çekirdek

içermekteydi. Sitoplazmada gelişmiş SER sisternaları, tübüler krista içeren mitokondriyonlar, lizozomlar ve lipid damlacıkları belirgin olarak izlenmekteydi Gevşek bağ dokusu yapısında olan interstisyum, kan ve lenf damarlarından zengindi. (Şekil 23).

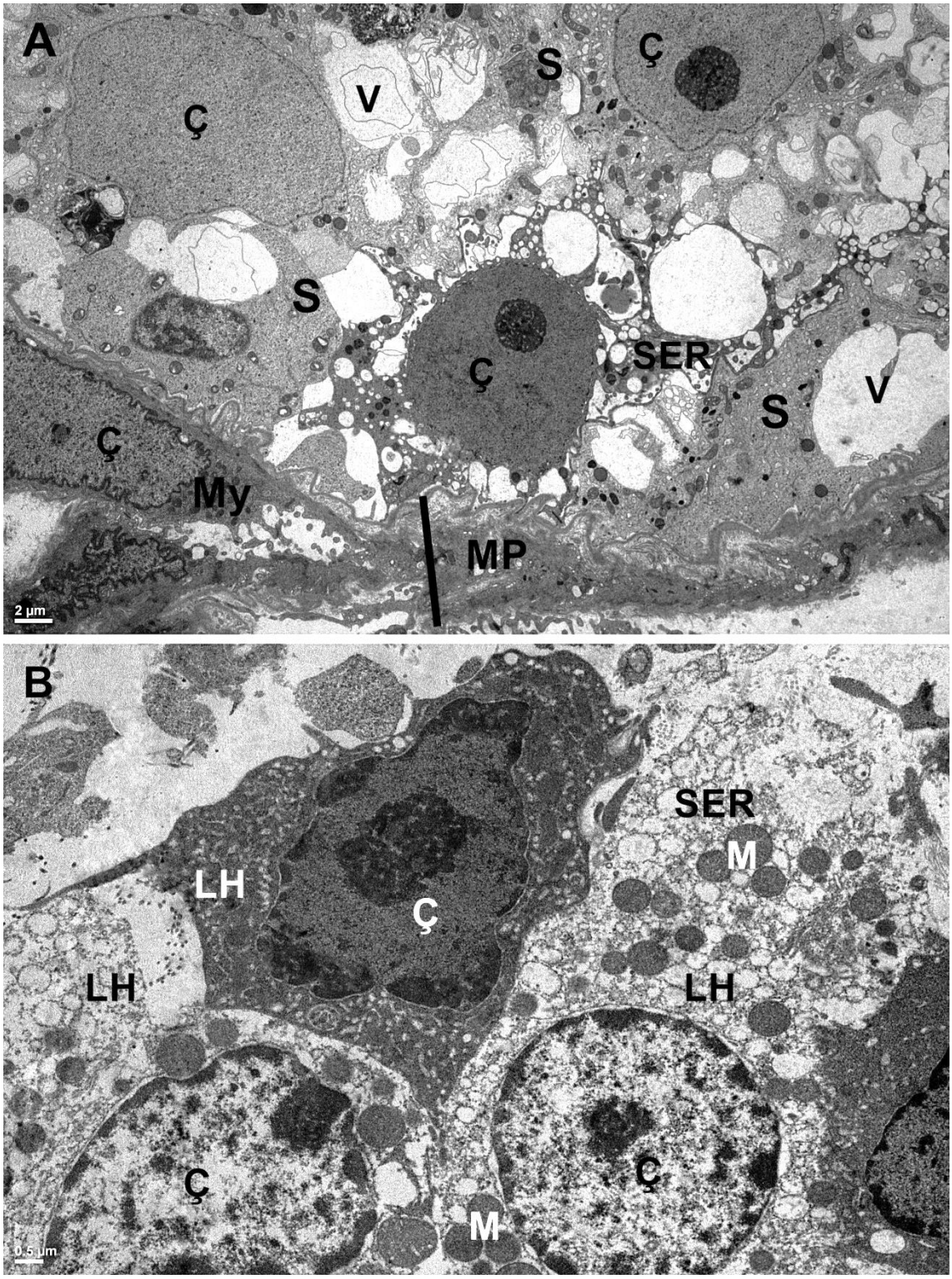


Şekil 23. Grup 1A testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. Normal görünümlü membrana propria (MP), Sertoli hücresi (S), spermatosit (Spt), spermatid (Spd), çekirdek (Ç), görülmektedir. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (ok başı) ve spermatojenik hücreler arasındaki sitoplazmik köprüler (oklar) normal yapıda izlenmektedir. Leydig hücreleri (LH) sitoplazmalarında tübüler tip mitokondriyon (M) ve bol lipid damlacıkları (L) ile normal yapıdadır. Agranüler endoplazmik retikülüm (SER). Bar: 2 µm.

4.3.2. Grup 1B: GnRH antagonisti uygulanan grup

Postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti uygulanan deneklere ait testis doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde, membrana propria total kalınlığının arttığı, düzensiz ve kıvrıntılı bir hal aldığı görüldü. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bozulması nedeniyle, çok sayıda seminiferöz tübülde spermatojenik hücrelere rastlanılmadı. Ayrıca Sertoli hücre sitoplazmasında aşırı SER vakuolizasyonu dikkati çekti. Bazı Sertoli hücrelerinin çekirdeklerinde elektron densitede artış izlendi (Şekil 24A). İnterstisyumda yer alan Leydig hücrelerinin çekirdeklerinin piknotik hale geldiği ve çekirdek periferinde elektron dens heterokromatin birikimlerinin arttığı görüldü. Bazı Leydig hücrelerinde elektron

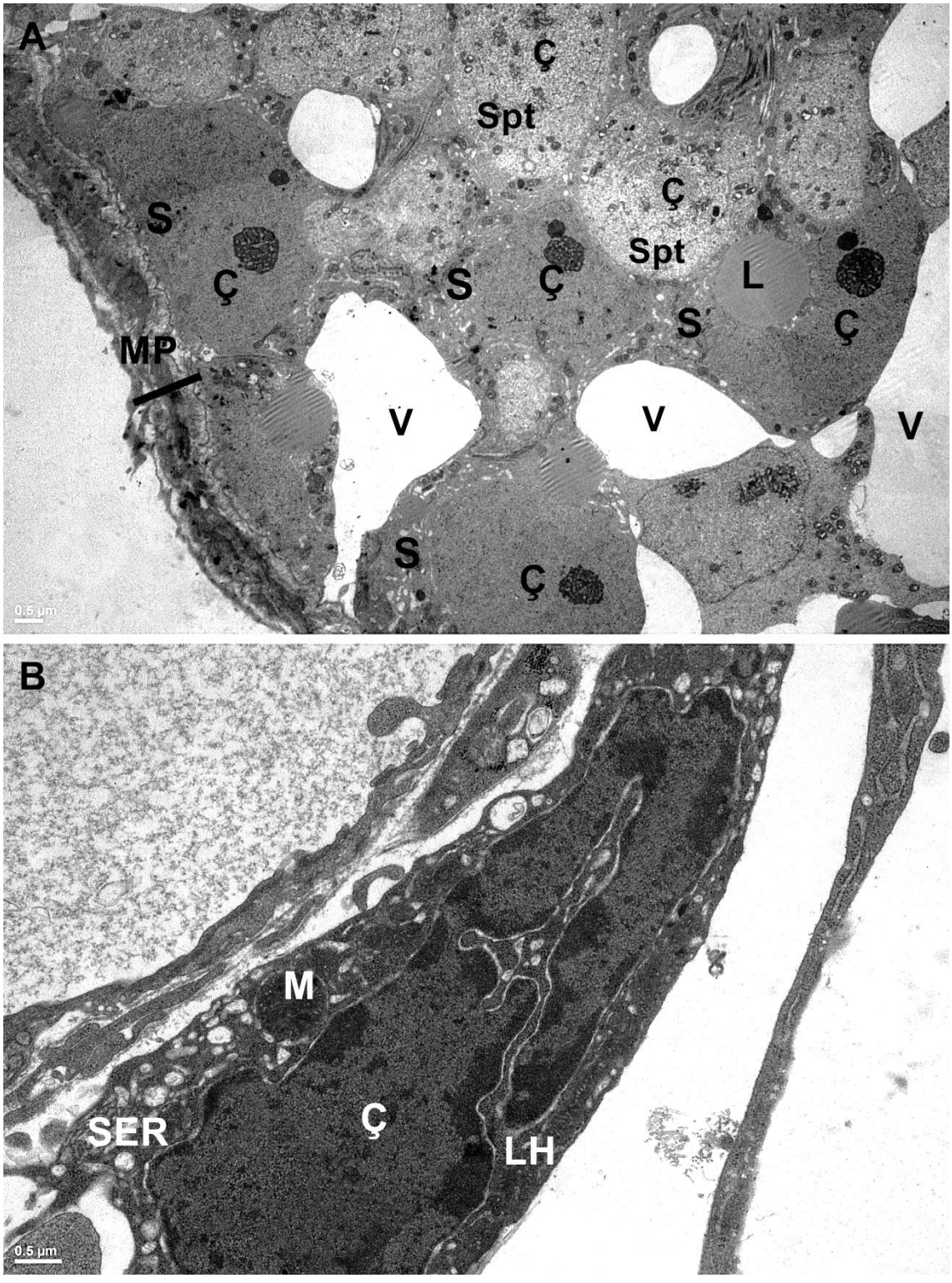
densitede artış ile birlikte sitoplazmik hacimde azalma gözlendi. Bazılarında ise sitoplazmalarının düşük elektron densitede olduğu ve yoğun SER vakuolizasyonu içerdiği dikkati çekti. Genel olarak tüm Leydig hücrelerinin sitoplazmasında mitokondriyonların bütünlüklerini koruduğu ve lipid damlacıkları yönünden belirgin bir azalmanın gerçekleştiği tespit edildi (Şekil 24B).



Şekil 24. Grup 1B testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. **A)** Kalın, kıvrıntılı bir membrana propria (MP) ile aşırı ve anormal vakuolizasyon (V) içeren Sertoli hücreleri (S) izlendi. Miyoid hücre (My), Çekirdek (Ç). Bar: 2 µm. **B)** Bazı Leydig hücrelerinin (LH) sitoplazmik hacimlerinde küçülme ile birlikte çekirdek (Ç) periferlerindeki heterokromatin yamalarında artış görüldü. Düşük elektron densitede sitoplazmaya sahip bazı Leydig hücrelerinde (LH) ise yoğun agranüler endoplazmik retikülüm (SER) vakuolizasyonu dikkati çekti. İntakt mitokondriyonlar (M) izlendi. Bar: 0,5 µm.

4.3.3. Grup 1C: GnRH antagonisti ve Osteokalsin uygulanan grup

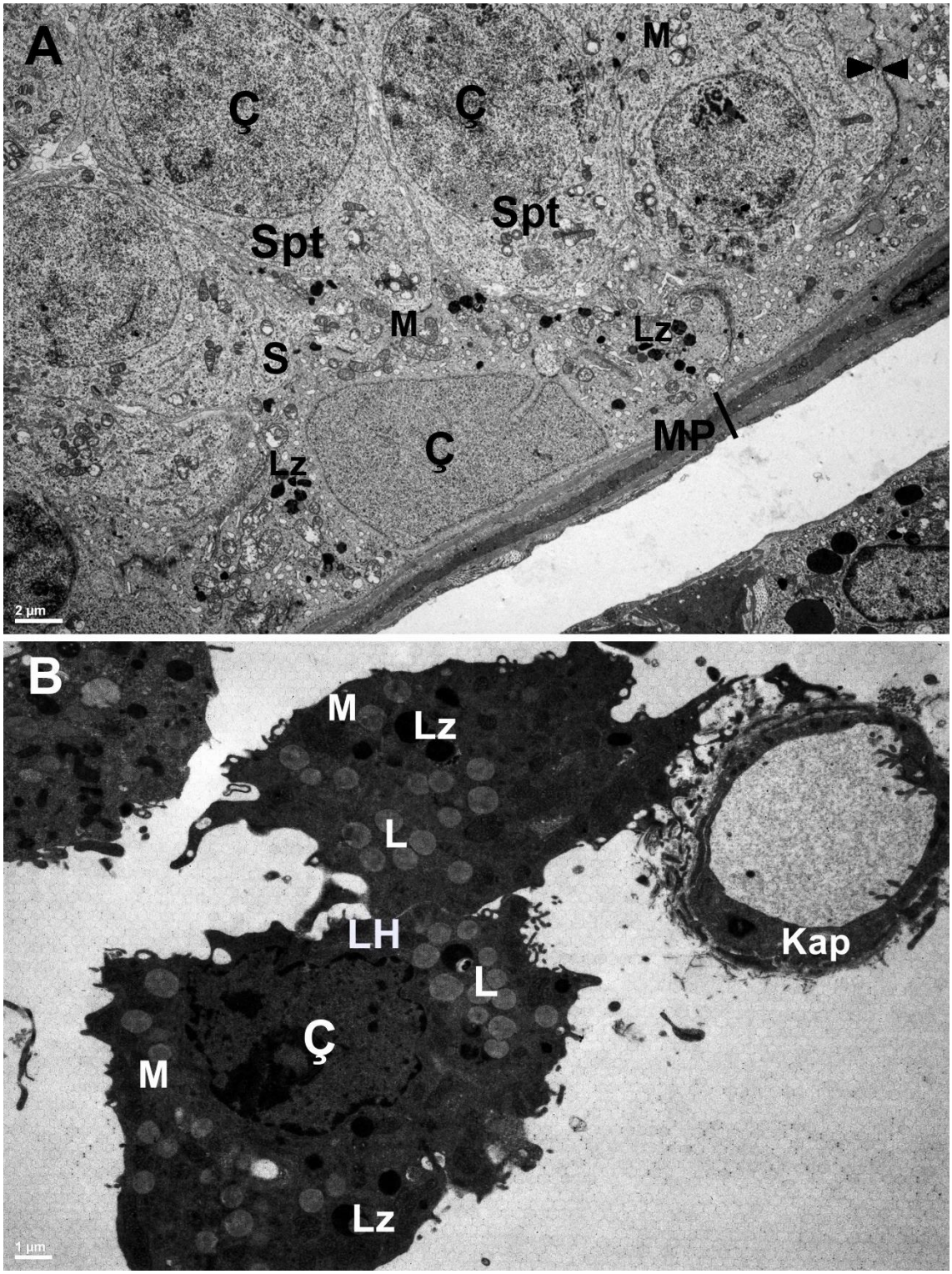
Postnatal 35-63. günler arasında GnRH antagonisti ve osteokalsin uygulanan deneklere ait testis doku örneklerinin elektron mikroskopik incelemesinde, Grup 1B ile karşılaştırıldığında, membrana propriadaki kıvrıntılanma ve kalınlaşmanın nispeten azaldığı dikkati çekti. Grup 1B'den farklı olarak, spermatojenik hücre içermeyen seminiferöz tübüllere rastlanılmadı. Diğer taraftan, Sertoli hücrelerinin sitoplazmasındaki dev vakuollerin varlığını koruduğu görüldü (Şekil 25A). İnterstisyal alanda yer alan elektron dens Leydig hücrelerine ait çekirdeklerde indentasyon miktarının arttığı ancak Grup 1B'ye oranla heterokromatin içeriklerinde ise azalmanın gerçekleştiği belirlendi. Leydig hücre sitoplazmasındaki mitokondriyonların normal yapıda olduğu, ancak SER sisternalarının vakuolize bir görünüm aldığı dikkati çekti. Ayrıca birçok Leydig hücresinin sitoplazmik hacimlerinin azaldığı ve az sayıda lipid damlacığı içerdiği belirlendi (Şekil 25B).



Şekil 25. Grup 1C testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. **A)** Membrana propriada (MP) nispeten azalan kıvrıntı ve kalınlaşma, Sertoli hücreleri (S) arasında dev vakuoller (V) ve nispeten normal görünümde spermatositler (Spt) görüldü. Çekirdek (Ç), Lipid damlacığı (L). Bar: 0,5 µm. **B)** Sitoplazmik hacmi azalmış elektron dens Leydig hücrelerinin (LH) çekirdeklerinde (Ç) indentasyon miktarında artış ve heterokromatin içeriğinde azalma izlendi. Sitoplazmalarında agranüler endoplazmik retikülümun (SER) vakuolize bir görünüm aldığı, ancak mitokondriyonların (M) intakt halde kaldığı dikkati çekti. Bar: 0,5 µm.

4.3.4. Grup 1D: Osteokalsin uygulanan grup

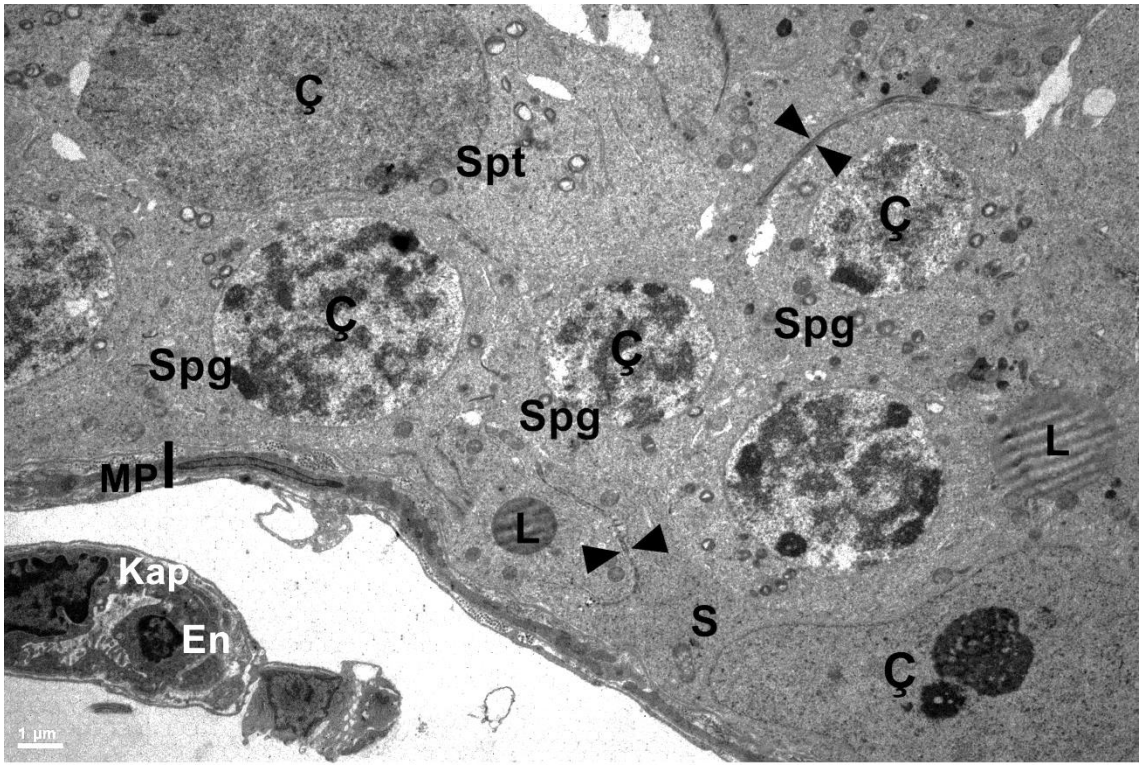
Postnatal 35-63. günler arasında yalnızca osteokalsin uygulanan deneklere ait testis doku örnekleri ince yapı düzeyinde değerlendirildiğinde; normal görünümde membrana propria ile sarılı seminiferöz tübüller ile interstisyumun kontrol grubuna benzer yapıda olduğu görüldü. Seminiferöz tübül epitelini oluşturan Sertoli hücreleri ve spermatojenik hücreler normal yapıdaydı. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar bütünlüğünü korumaktaydı (Şekil 26A). İnsterstisyumda Grup 1B ve Grup 1C'den farklı olarak, Leydig hücre çekirdeklerinin daha az heterokromatin ve indentasyon gösterdiği, sitoplazmik hacimlerinin normal boyutta olup çok sayıda lipid damlacığına sahip olduğu görüldü. Leydig hücreleri çekirdek ve sitoplazmik organelleri yönünden normal yapılarını korumaktaydı (Şekil 26B).



Şekil 26. Grup 1D testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. **A)** Normal görünümde membrana propria (MP) ile çevrelenen seminiferöz tübüllerde Sertoli hücrelerinin (S) ve spermatositlerinin (Spt) de normal yapıda olduğu görüldü. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (ok başı) normal yapıdaydı. Çekirdek (Ç), Lizozom (Lz). Bar: 1 µm. **B)** Çekirdeklerinde (Ç) heterokromatin içeriği ve indentasyon miktarı azalan Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında (LH) lipid damlacığı (L) miktarında artış izlendi. Mitokondriyon (M), Lizozom (Lz), Kapiller (Kap). Bar: 1 µm.

4.3.5. EDS ile indüklenmiş Leydig hücre hasarı grubu

Tek doz EDS uygulaması sonrası 4. gün sakrifiye edilen Grup 2A deneklerinin testis doku örneklerinin elektron mikroskobik incelemesinde, membrana propria ile çevrelenen seminiferöz tübül epitelinde, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar bütünlüklerini korumaktaydı. İnsterstisyumda ise normal yapıda kan damarları ve diğer bağ dokusu hücreleri yer alırken, Leydig hücrelerinin bulunmadığı tespit edildi (Şekil 27).

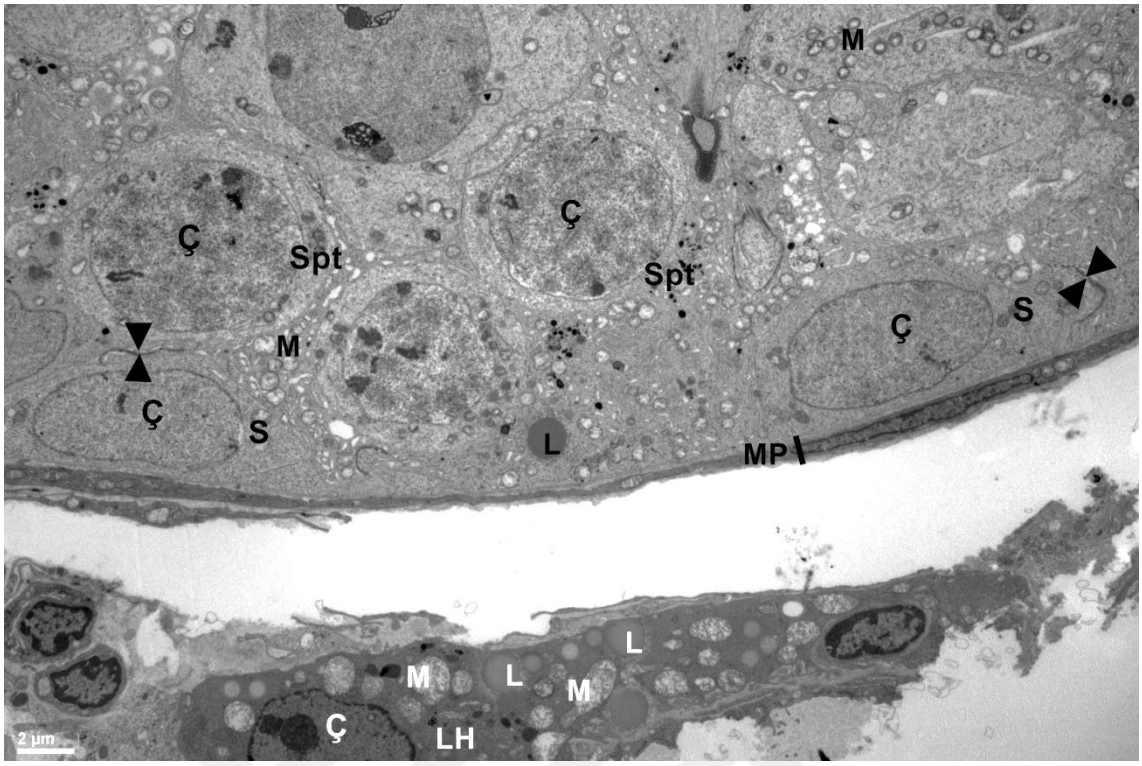


Şekil 27. Tek doz EDS uygulamasından 4 gün sonra sakrifiye edilen deneklere ait testis doku kesitlerinin elektron mikroskobik görünümü. Normal görünüme membrana propria (MP), Sertoli hücresi (S), spermatogonyum (Spg) ve spermatosit (Spt) izlendi. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (ok başı), Çekirdek (Ç), Kapiller (Kap), Endotel hücreleri (En), Lipid damlacığı (L). Bar: 1 µm.

4.3.6. Grup 2A: Kontrol grubu

Tek doz EDS uygulamasından sonra, 63 gün boyunca normal laboratuvar şartlarında yaşatılan deneklerden elde edilen testis doku örneklerinin elektron mikroskobik incelemesinde; Sertoli hücreleri ve spermatojenik hücrelerden oluşan seminiferöz tübül epitelinin dıştan membrana propria ile çevrelendiği görüldü. Membrana propria; bazal lamina, miyoid hücreler ve kollajen liflerden oluşmaktaydı.

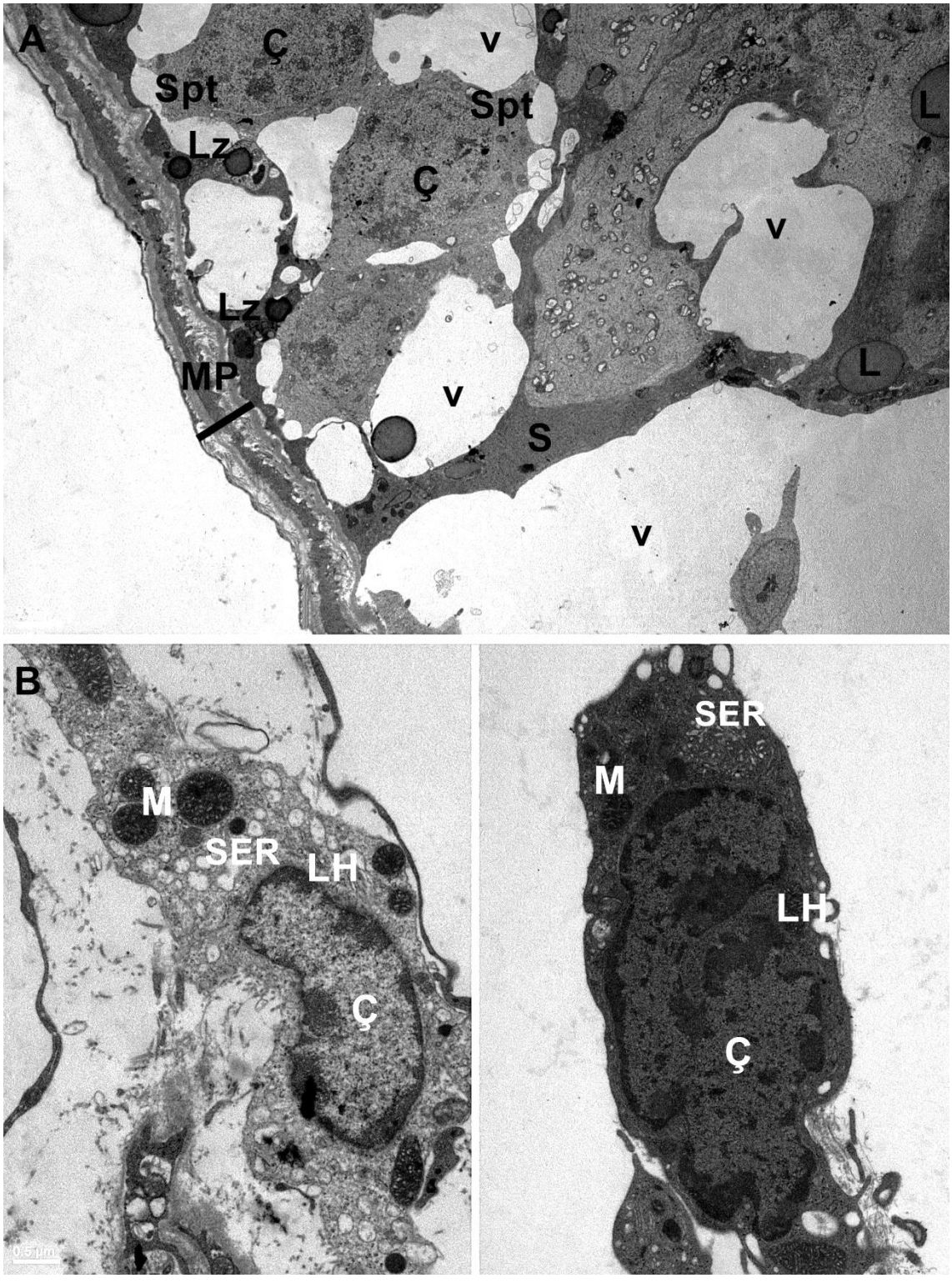
Seminiferöz tübül epiteli, bazal laminadan tübül lümenine doğru sferikal ve merkezi yerleşimli çekirdeğe sahip spermatogonyumlar, oval çekirdekli ve geniş sitoplazmalı primer spermatositler, sekonder spermatositler ve lümen en yakın konumda spermatidlerden oluşmaktaydı. Uzun iğ şekilli çekirdekleri ile karakterize spermatozoonların ise seminiferöz tübül lümeninde yer aldığı gözlendi. Spermatojenik hücreler arasında sitoplazmik köprüler bulunmaktaydı. Seminiferöz tübül epitelinin bir diğer hücresi olan Sertoli hücrelerinin, üçgen veya oval şekilli indentasyonlu bir çekirdeğe ve hücrenin bazalden tübül lümenine kadar uzandığı görüldü. Sertoli hücrelerinin sitoplazması çok iyi gelişmiş SER, belirgin Golgi kompleksi, tübüler tip mitokondriyonlar ile çok sayıda lipid damlacığı içermekteydi. Komşu Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantı kompleksleri yer almaktaydı. Gevşek bağ dokusu yapısındaki interstisyumun, kan ve lenf damarları dışında, düzensiz poligonal şekilli Leydig hücrelerini içerdiği görüldü. Büyük eksantrik ve kromatinden fakir çekirdeğe sahip olan Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında, gelişmiş SER sisternaları, tübüler krista içeren mitokondriyonlar, çok sayıda lipid damlacıkları ve lizozomlar belirgin olarak izlendi (Şekil 28).



Şekil 28. Grup 2A testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. Membrana propria (MP), Sertoli hücresi (S), spermatosit (Spt) ve spermatid (Spd) normal yapıdadır. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (ok başı) normal yapıda görülmektedir. Leydig hücrelerinin (LH) sitoplazmalarında tübüler tip mitokondriyon (M) ve bol lipid damlacığı (L) izlenmektedir. Çekirdek (Ç). Bar: 2 µm.

4.3.7. Grup 2B: GnRH antagonisti uygulanan grup

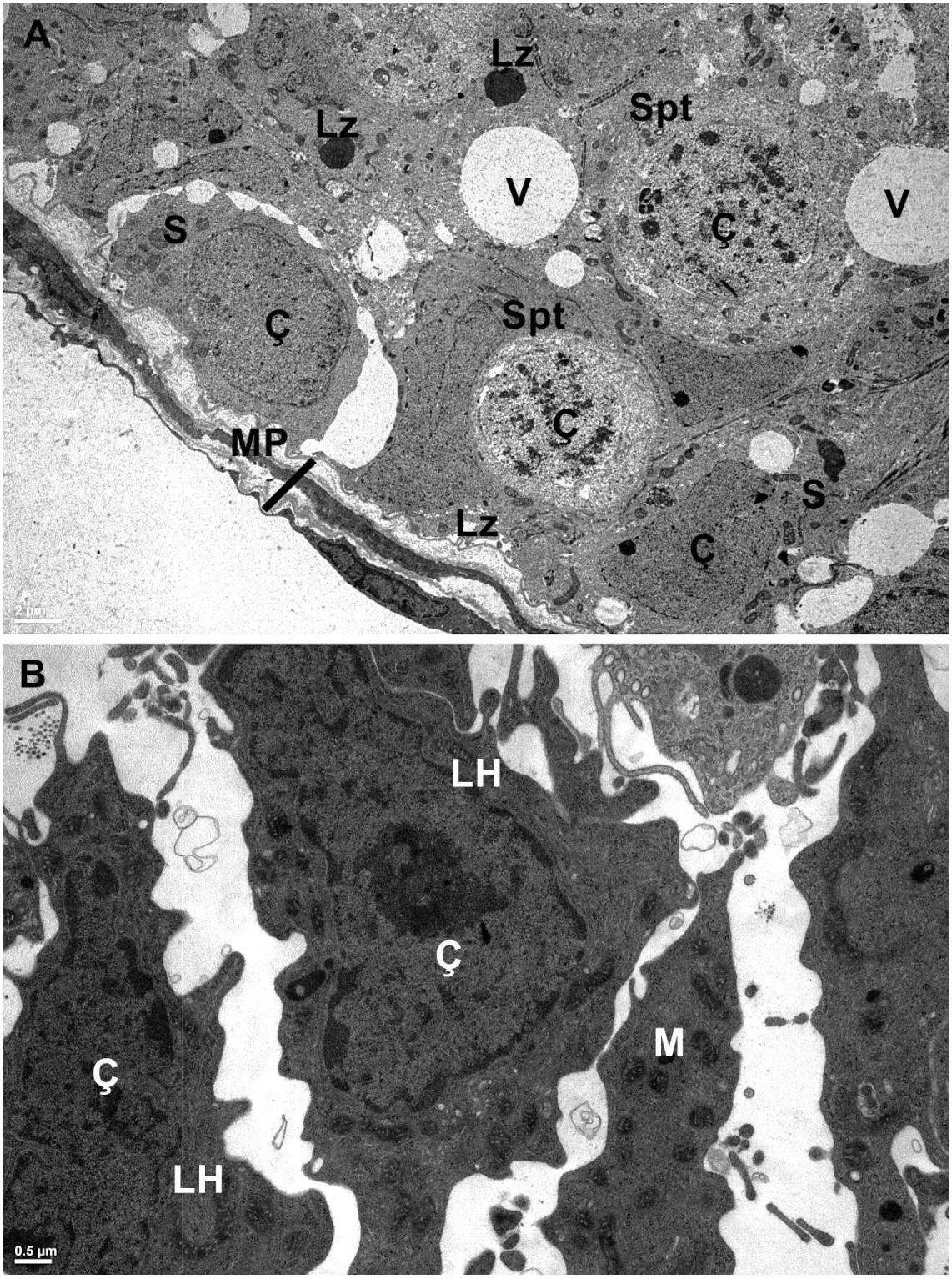
Tek doz EDS uygulamasından sonra 35-63. günler arasında yalnızca GnRH antagonisti uygulanan deneklere ait testis doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde, membrana propria total kalınlığında artış ile seminiferöz tübül epitel hücrelerinin arasında dev vakuoller dikkati çekti. Birçok tübülde Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bozulduğu ve spermatojenik hücrelerin döküldüğü belirlendi. Elektron densitesi artmış Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında çok sayıda lizozomal yapılar tespit edildi (Şekil 29A). İnterstisyumda Leydig hücre çekirdeklerinin piknotik hale geldiği ve çekirdeklerinde heterokromatin yamaların arttığı görüldü. Bazı Leydig hücrelerinde elektron densitede artış ile birlikte sitoplazmik hacimde küçülme gözlenirken, bazılarının sitoplazmalarında düşük elektron densite ve yoğun SER vakuolizasyonu izlendi. Genel olarak bütün Leydig hücrelerinde, organellerin yapısal bütünlüklerini korudukları gözlendi (Şekil 29B).



Şekil 29. Grup 2B testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. **A)** Membrana propria (MP) total kalınlığında artış ile birlikte Sertoli hücreleri (S) ve spermatositler (Spt) arasında dev vakuoller (V) izlendi. Çekirdek (Ç), Lizozom (Lz), Lipid damlacıkları (L). Bar: 2 µm. **B)** Bazı Leydig hücrelerinin (LH) sitoplazmik hacimlerinde küçülme, çekirdek (Ç) periferlerinde heterokromatin yamalarında artış görüldü. Düşük elektron densiteye sahip bazı Leydig hücrelerinde (LH) ise agranüler endoplazmik retikülüm (SER) vakuolizasyonu gözlendi. Mitokondriyonlar (M) normal yapıdaydı. Bar: 0,5 µm.

4.3.8. Grup 2C: GnRH antagonisti ve Osteokalsin uygulanan grup

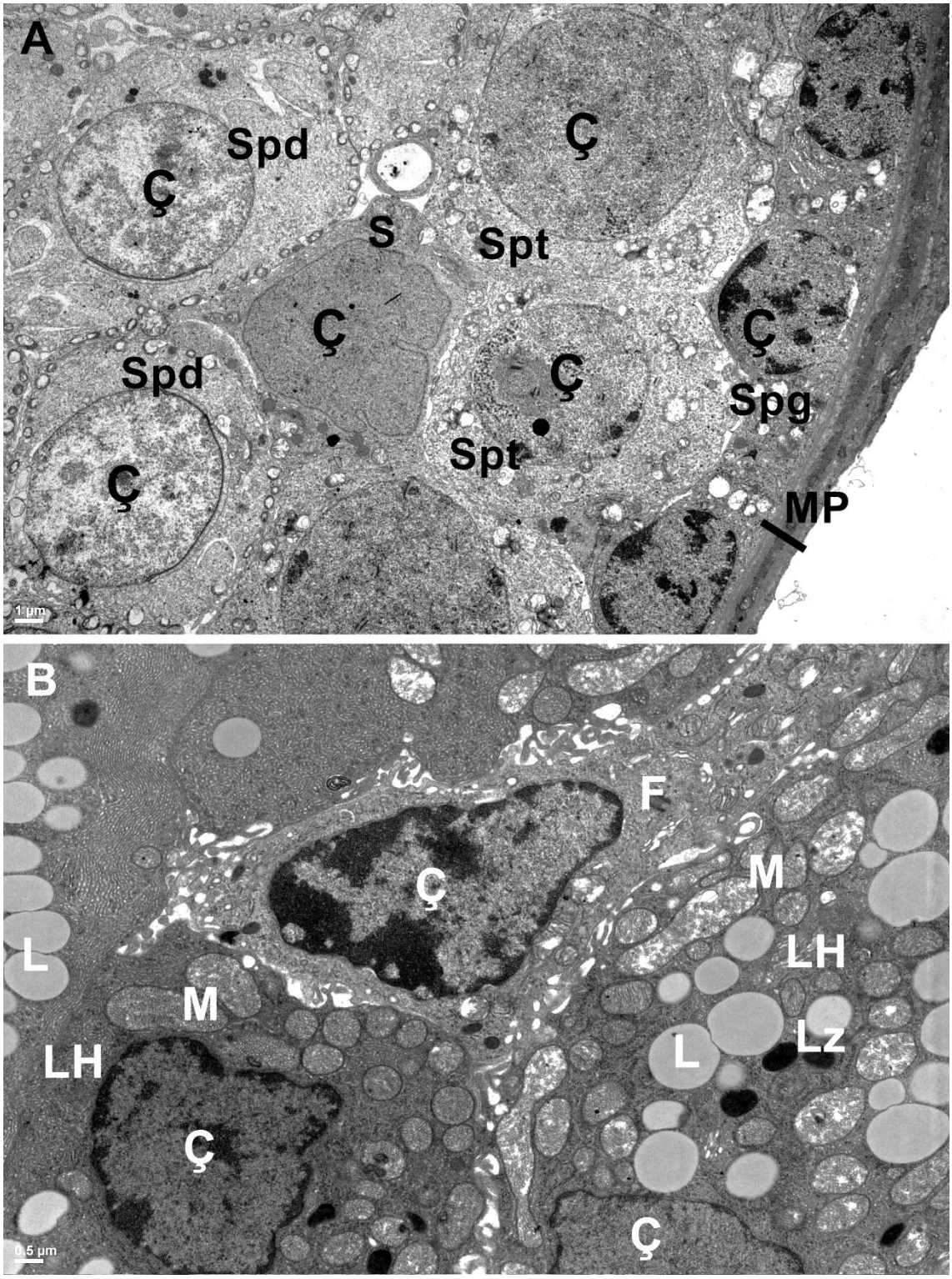
Tek doz EDS uygulamasından sonra 35-63. günler arasında GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklere ait testis doku örnekleri ince yapı düzeyinde değerlendirildiğinde; membrana propria total kalınlığında artışın ve düzensizliğin bu grupta da varlığı tespit edildi. Grup 2B ile karşılaştırıldığında, seminiferöz tübül epitel hücreleri aralarında oluşan vakuollerin boyutlarında nispeten bir azalma izlendi. Grup 2B'den farklı olarak, Sertoli hücrelerinin elektron densitelerinin normal olduğu ve birbirleri arasındaki sıkı bağlantıların bütünlüğünü koruduğu dikkat çekti (Şekil 30A). İnterstisyal alanda yer alan yüksek elektron densitedeki Leydig hücrelerinin, çekirdeklerinde indentasyon miktarının ve heterokromatin içeriğinin azaldığı görüldü. Ancak birçok Leydig hücresinde sitoplazmik hacimde küçülme ile lipid damlacklarının sayılarında azalma devam etmekteydi. Bununla beraber, Leydig hücre sitoplazmalarında, SER ve mitokondriyonların normal görünümlerini korudukları gözlendi (Şekil 30B).



Şekil 30. Grup 2C testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. **A)** Membrana propriada (MP) devam eden kalınlaşma ve düzensizlik, Sertoli hücreleri (S) ve spermatositler (Spt) arasındaki vakuollerin boyutunda (V) nispeten azalma izlendi. Çekirdek (Ç), Lizozom (Lz). Bar: 2 µm. **B)** Leydig hücrelerinin (LH) sitoplazmik hacimlerinde küçülme, çekirdeklerinde (Ç) indentasyon miktarında ve heterokromatin içeriğinde azalma dikkati çekti. Mitokondriyon (M). Bar: 0,5 µm.

4.3.9. Grup 2D: Osteokalsin uygulanan grup

Tek doz EDS uygulamasından sonra 35-63. günler arasında yalnızca osteokalsin uygulanan deneklere ait testis doku örneklerinin elektron mikroskobik incelemesinde; membrana propria, Sertoli hücreleri ve spermatojenik hücrelerin yapılarının kontrol grubuna benzerlik gösterdiği dikkati çekti. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, bütünlüğünü korumaktaydı (Şekil 31A). İnsterstisyumda bağ doku hücreleri ile birarada yer alan Leydig hücrelerine ait çekirdeklerin indentasyon miktarı ve heterokromatin içeriği kontrol grubuna benzemekteydi. Leydig hücrelerinin sitoplazmik hacimlerinin normal olduğu ve sitoplazmada çok sayıda lipid damlacığına sahip oldukları görüldü. Leydig hücre sitoplazmasındaki mitokondriyon ve lizozomların da normal yapılarını korudukları gözlendi (Şekil 31B).

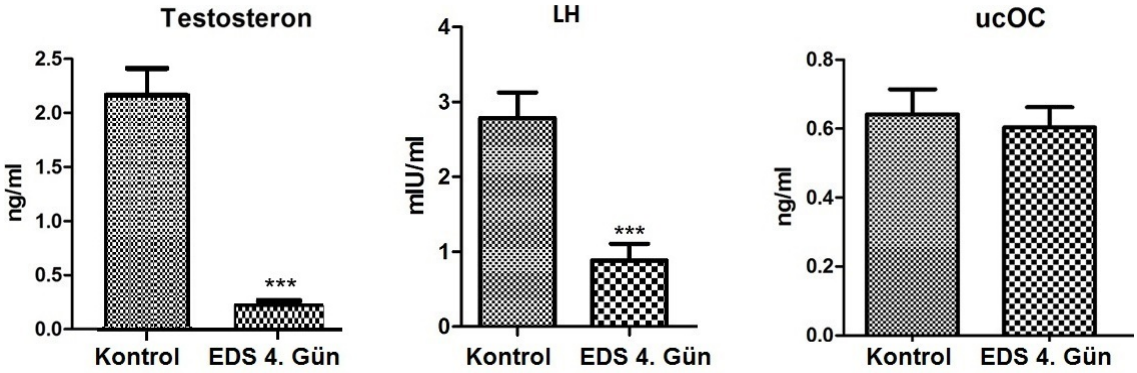


Şekil 31. Grup 2D testis doku örneklerinin elektron mikroskobik görünümü. **A)** Normal görünümde membrana propria (MP) ile çevrelenen Sertoli hücreleri (S), spermatogonyum (Spg) ve spermatositler (Spt) izlendi. Çekirdek (Ç). Bar: 1 µm. **B)** Normal yapıda çekirdek (Ç) içeren Leydig hücrelerinin (LH) sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlacığı (L) gözlendi. Mitokondriyon (M), Lizozom (Lz), Fibroblast (F). Bar: 0,5 µm.

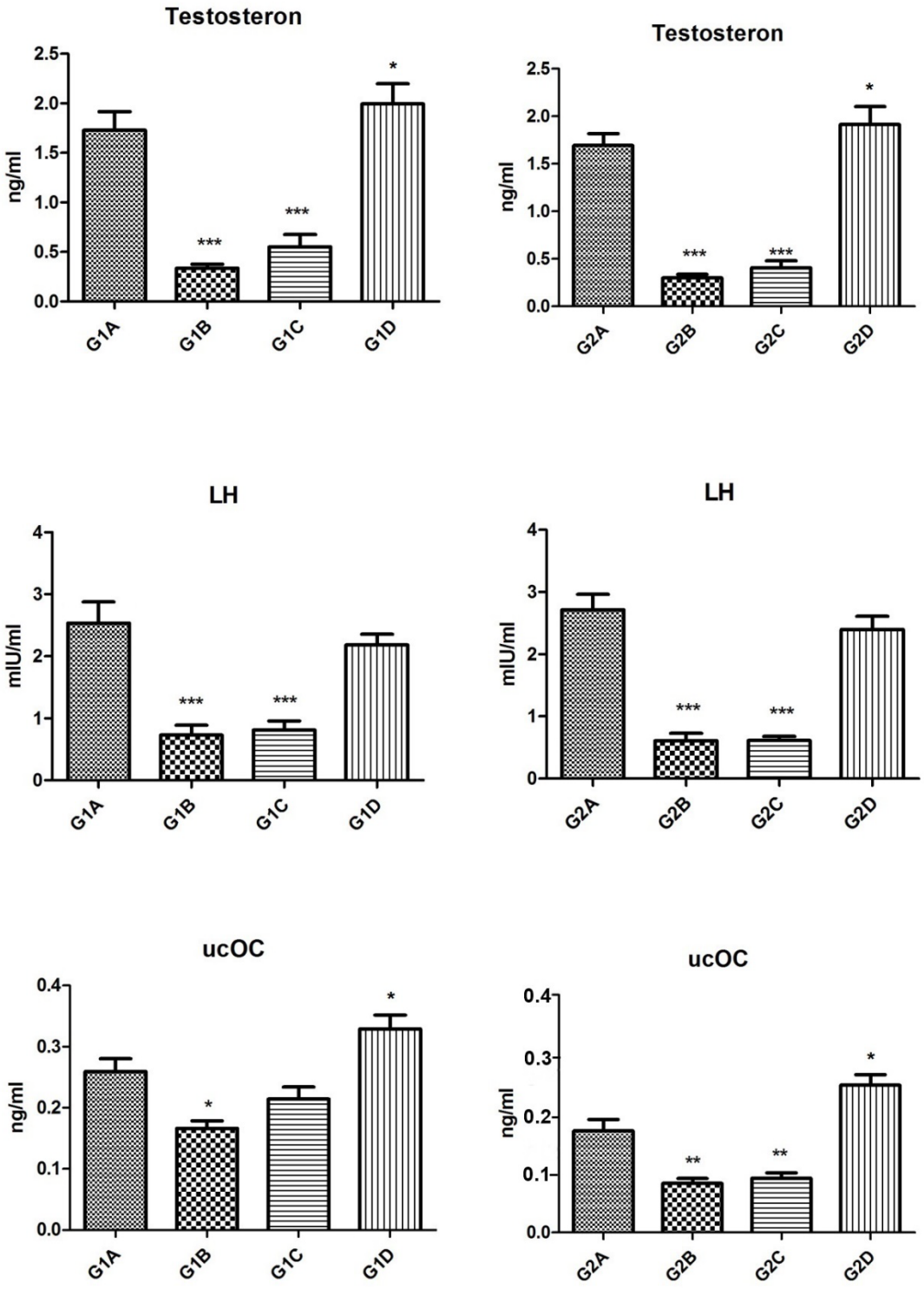
4.4. Biyokimyasal Bulgular

Tek doz EDS verilmesi ile yetişkin Leydig hücrelerinin elimine olup olmadığının tespiti amacıyla, EDS uygulaması sonrası 4. gün sakrifiye edilen deneklerin serum örneklerinin, herhangi bir uygulama yapılmayan yetişkin deneklere ait serum örnekleriyle karşılaştırılması sonucunda; EDS verilen grupta, serum testosteron ve LH seviyelerinin anlamlı şekilde azaldığı bulunmuştur. Ancak EDS sonrası 4. gün sakrifiye edilen bu deneklerin ucOC seviyesinde, kontrol grubuna göre, anlamlı bir farklılık ölçülmemiştir (Şekil 32).

Biyokimyasal verilere göre GnRH antagonisti uygulanan (Grup 1B ve Grup 2B) deneklerin testosteron, LH ve ucOC seviyeleri anlamlı şekilde, hem kontrol grupları (Grup 1A ve Grup 2A), hem de yalnızca osteokalsin uygulaması yapılan (Grup 1D ve Grup 2D) deneklerden, anlamlı olarak düşük bulunmuştur. GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulaması yapılan (Grup 1C ve Grup 2C) deneklerde de, testosteron ve LH seviyeleri, benzer şekilde, kontrol grupları ve osteokalsin uygulanan gruplardan anlamlı şekilde düşük olmasına rağmen, yalnızca GnRH antagonisti uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında, testosteron seviyesinde hafif bir artış gözlenmiştir. Bununla birlikte, LH seviyeleri, Grup 1B ve Grup 2B'ye göre anlamlı bir farklılık göstermemektedir. Grup 1C deneklerinin ucOC seviyesi ile Grup 1A ucOC seviyesi arasında anlamlı bir farklılık gözlenmezken, Grup 2C deneklerinin ucOC seviyesi, Grup 2A deneklerininkinden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Yalnızca osteokalsin uygulaması yapılan deneklerde LH seviyelerinin, kontrol gruplarından anlamlı bir farklılık göstermediği, ancak bu gruplara ait testosteron ve ucOC seviyelerinin, anlamlı olarak kontrol gruplarından daha yüksek olduğu bulundu (Şekil 33).



Şekil 32. Tek doz EDS uygulamasından 4 gün sonra sakrifiye edilen deneklerin serum testosteron, LH ve ucOC değerlerinin istatistiksel değerlendirmesi. ***p< 0,0001, **p<0,001, *p<0,01.



Şekil 33. Grup 1 ve Grup 2 deneklerinin serum testosteron, LH ve ucOC seviyelerinin istatistiksel değerlendirmesi. ***p< 0,0001, **p<0,001, *p<0,01.

5. TARTIŞMA

Postnatal yetişkin Leydig hücrelerinin normal gelişim süreci ile postpubertal EDS uygulaması sonrası rejenere olan yeni yetişkin Leydig hücrelerinde osteokalsinin, testosteron ve INSL3 sentezine etkisinin mikroskobik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelendiği bu çalışmada; GnRH antagonisti uygulanan deneklerde LH, testosteron ve ucOC seviyelerinin belirgin şekilde azaldığı, testis doku örneklerinde ise hem seminiferöz tübüller hem de insterstisyumda ışık ve elektron mikroskobik düzeylerde belirgin dejeneratif değişikliklerin oluştuğu, ayrıca bu gruplarda, Leydig hücrelerinin 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A immünreaktivitelerinde de belirgin bir azalmanın gerçekleştiği tespit edildi. GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklerde de LH ve testosteron seviyelerinde azalma ile hücresel düzeyde dejeneratif değişikliklerin varlığı gözlendi. Postpubertal ucOC seviyesinin ise kontrol grubundan belirgin olarak düşük olduğu, ancak prepubertal ucOC seviyesinin kontrol grubu ile anlamlı bir fark göstermediği belirlendi. Ayrıca GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan hem prepubertal hem de postpubertal deneklerin Leydig hücrelerinde; 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A immünreaktivitelerinde de kontrol gruplarına göre anlamlı bir artışın olmadığı görüldü. Bununla birlikte, GnRH antagonisti uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında, 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A immünreaktivitelerinde hafif bir artış kaydedildi. Yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerde ise; testosteron ve ucOC seviyelerinin kontrol gruplarından anlamlı şekilde yüksek olduğu, ancak LH seviyelerinin kontrol gruplarından anlamlı bir farklılık göstermediği belirlendi. Bunlara ilaveten, yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerde hücresel yapının normal olduğu ve Leydig hücrelerinde özellikle INSL3 ve GPRC6A immünreaktivitelerinin kontrol gruplarından anlamlı olarak yüksek olduğu, ancak 3βHSD immünreaktivitelerinin, kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark göstermediği bulundu.

Yetişkin Leydig hücreleri, postnatal 7. günden başlayarak puberteye kadar devam eden, steroidojenik enzimleri ve mitotik aktiviteleri birbirinden farklı olan 4 belirgin hücresel aşamada gelişmektedir (32, 33, 72, 73, 75, 78). Postpubertal dönemde yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim sürecini incelemek için kullanılan en etkin yöntem ise EDS enjeksiyonu yapılan hayvan modelleridir. Bu yöntemde tek doz EDS

enjeksiyonu sonrasında elimine olan yetişkin Leydig hücrelerinin yerlerini, stem Leydig hücreden tekrar prolifere olarak gelişen, yeni yetişkin Leydig hücre jenerasyonu almaktadır. Literatürde Leydig hücrelerinin farklanma sürecini araştıran birçok çalışmada, yetişkin sıçanlarda tek doz EDS uygulamasını takiben 3-4 gün içerisinde, yetişkin Leydig hücrelerinin elimine olduğu, testosteron üretiminin durduğu, testis, epididimis, prostat bezi ve seminal vezikül ağırlıklarının azaldığı gösterilmiştir. EDS uygulaması sonrasında, testosteronun yanı sıra, FSH-LH seviyeleri ile Leydig hücrelerinde INSL3 ekspresyonunun da indirgendiği rapor edilmiştir (22). EDS uygulamasını takiben, 7-10 hafta içerisinde yeni Leydig hücre popülasyonun yeniden oluşmasıyla, yetişkin Leydig hücre sayısı, testosteron seviyesi ve diğer parametrelerin enjeksiyon öncesindeki durumuna geri döndüğü bildirilmiştir (22, 23, 24, 25, 123, 124).

Sunulan çalışmada da, yetişkin Leydig hücre gelişimini incelemek üzere, tek doz 75 mg/kg EDS enjeksiyonundan 4 gün sonra postpubertal deneklerden elde edilen testis doku örneklerinde, interstisyumda Leydig hücrelerinin bulunmadığı, dolayısıyla Leydig hücre markırı olan 3βHSD ekspresyonunun olmadığı gösterildi. Aynı deneklerin serum LH ve testosteron değerlerinin de azaldığı belirlendi.

Hipotalamustan nabız şeklinde salınan GnRH, hipofizyal portal sistem aracılığıyla hipofiz bezinin anterior lobundan LH salınımını düzenler. LH; lokal parakrin faktörler aracılığıyla germ hücrelerinde mayotik süreci düzenlemesinin yanında, esas etkisini gonadlardaki somatik hücrelerde gösterir. Akut LH sekresyonları ile steroidogenez sürecinin, uzun süreli LH sekresyonlarının da yetişkin Leydig hücre gelişiminin düzenlendiği bilinmektedir (1, 4, 39, 139).

Literatürde GnRH agonist ve antagonistlerinin akut ve kronik uygulamalarının hipofiziyal ve testiküler fonksiyonlara etkileri ile ilgili çok sayıda araştırma bulunmaktadır (162, 163, 165, 166, 167, 239). Bu çalışmalarda kronik GnRH antagonisti uygulamaları ile medikal hipofizektomi modeli oluşturulan hayvanlarda, spesifik olarak yalnızca gonadotropin salınımının inhibe edildiği rapor edilmiştir (166, 167, 239, 240). Misro ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, kronik GnRH antagonisti uygulamaları sonrasında; LH, testosteron ve FSH seviyeleri ile testis, seminal vezikül ve prostat bezi ağırlıklarında belirgin bir azalmanın meydana geldiğini, spermatogenez sürecinde bozulmaya bağlı olarak, spermatojenik hücre çekirdeklerinin piknotik hale geldiğini ve seminiferöz tübül epitelinin vakuolize bir görünüm aldığını bildirmişlerdir

(166). Araştırmacılar ayrıca kronik GnRH antagonisti uygulamalarından sonra Leydig hücre sayılarının ve hücre hacimlerinin de azaldığını belirtmişlerdir (166, 167).

Çalışmamızda da yüksek dozda GnRH antagonisti verilerek LH süpresyonu oluşturulan deneklerde, serum LH ve testosteron seviyeleri ile Leydig hücre sayılarının normale göre belirgin şekilde azaldığı gösterildi. Bunun yanında, HPG aksının bozulmasına bağlı olarak seminiferöz tübüllerde ve insterstisyumda belirgin dejeneratif değişikliklerin varlığı tespit edildi.

LH kontrolünde salgılanan seks steroid hormonlarının seksüel maturasyon ve üreme fonksiyonları dışında, özellikle kemik metabolizmasında da rol oynadığı günümüze kadar yapılan birçok çalışmada rapor edilmiştir. (158, 159, 160, 187, 241). Wang ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada, 42 ay boyunca testosteron uygulaması yapılan hipogonadal erkeklerde kemik yapımı markırlarından iskelet alkalin fosfataz, serum osteokalsin, serum prokollojen miktarlarının arttığı rapor edilmiştir (12). Bu şekilde kantitatif ölçümler dışında, kalitatif olarak da hipogonadal erkeklerde ekzojen testosteron uygulamasının, kemik rezorbsiyonunu yavaşlattığı ve testosteron eksikliği nedeniyle bozulan trabeküler yapıyı restore ettiği belirlenmiştir (9, 242). Benzer şekilde kadınlarda da menapoz ve yaşlanmaya bağlı olarak gözlenen androjen eksikliğinin de, osteoporoz gelişimine neden olduğu bilinmektedir (16, 159). Prostat kanseri tanısı konan hastalarda da GnRH antagonisti ve GnRH agonisti aracılığıyla oluşturulan kombine androjen blokajı sonrasında, testosteron seviyesinin belirgin şekilde azaldığı ve kemik kaybının gerçekleştiği bildirilmiştir (243).

Çalışmamızda da GnRH antagonisti uygulaması sonrasında deneklerin ucOC seviyelerinin düşük olması, osteokalsinin LH süpresyonu nedeniyle azalan testosteron seviyesinden olumsuz yönde etkilendiğini, dolayısıyla osteokalsin ve testosteron arasında anlamlı bir ilişkinin var olduğunu, ancak bu anlamlı ilişkinin LH'dan tamamen bağımsız olmadığını göstermektedir.

Son 10 yılda yapılan klinik araştırma ve gözlemler sonucunda, kemik dokunun da endokrin bir organ gibi steroid hormonların sentez ve sekresyonlarını düzenlediği ortaya çıkarılmıştır (14, 15, 16, 160, 190). Qury ve arkadaşları, osteoblastlarla kokültür oluşturan Leydig hücreleri ve testis eksplantlarının bulunduğu mediumda, testosteron seviyesinin yükseldiğini, osteoblastlar ile fibroblastlar, miyoblastlar veya adipositlerin bir arada bulunduğu kokültür ortamında ise testosteron seviyesinde herhangi artışın

meydana gelmediğini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, osteoblastlarla kokültüre alınan over eksplantlarının bulunduğu medium ortamında da testosteron seviyesinde artış gerçekleşmemiştir. OC-/- osteoblastlarla kokültür oluşturulduğunda ise Leydig hücrelerinde sentezlenen testosteron miktarının azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, in vitro olarak, OC-/- farelerden alınan testis doku kesitlerinde, Leydig hücrelerinde StAR, Cyp17, Cyp11a ve 3βHSD steroidojenik enzim ekspresyonlarının belirgin şekilde azaldığı, osteokalsin enjeksiyonu yapılan normal farelerde ise steroidojenik enzim ekspresyonlarında gözlenen belirgin artışın, testosteron seviyesini yükselttiği bildirilmiştir (15). Aynı araştırmacılar; OC-/- ve LHR-/- farelerle yaptıkları bir diğer çalışmada, OC-/- farelerde testis, epididimis ve seminal vezikül ağırlıklarının belirgin şekilde azaldığı, Leydig hücre maturasyonunun bozulduğu, sperm sayısı ve testosteron seviyesinin düştüğü, LH seviyesinin ise yükseldiğini rapor etmişlerdir. LHR-/- erkek farelerde ise OC seviyesi yüksek bulunmuştur. LHR-/- ve OC-/- farelere ucOC enjeksiyonu yapıldığında, testosteron seviyesinin yükseldiği ancak spermatogenez üzerinde belirgin bir onarıcı etkinin oluşmadığı, Leydig hücre sayısında belirgin bir artışın sağlanamaması nedeniyle de sterilitenin önlenemediği tespit edilmiştir. Bu bulgular, LH ve OC'in birbirini düzenlemedikleri ve OC'in, HPG aksından bağımsız olarak, kemik ve testis arasındaki ikinci bir endokrin aks aracılığıyla Leydig hücrelerinde testosteron sentezini uyardığı şeklinde yorumlanmıştır (14). Osteokalsinin, Leydig hücrelerindeki spesifik reseptörü olan GPRC6A'ya bağlanması ile steroidogenez süreci aktive olmaktadır. Qury ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada, Leydig hücrelerinde GPRC6A yokluğunda steroidojenik enzim ekspresyonlarının azaldığı, dolayısıyla testosteron seviyesinin belirgin şekilde düştüğü ve germ hücre apopitozunun indüklendiği rapor edilmiştir (15). Bir başka çalışmada da GPRC6A-/- farelerde steroidogenezde aksaklık dışında, glukoz intoleransının geliştiği ve kemik mineralizasyon defektlerinin gözlendiği bildirilmiştir (204).

Sunulan çalışmada GnRH antagonisti ile birlikte ekzojen osteokalsin uygulanan deneklerin serum LH ve testosteron seviyeleri kontrol grupları ve yalnızca osteokalsin uygulanan gruplara göre anlamlı olarak düşüktü. Ancak yalnızca GnRH antagonisti uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında, LH seviyeleri arasında herhangi bir fark bulunmazken, serum testosteron ve ucOC seviyelerinde bir miktar artış kaydedildi. GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklerin testosteron

seviyelerinde gözlenen anlamlı olmayan bu artış, osteokalsinin GnRH antagonistine bağlı LH süpresyonu nedeniyle azalan testosteron seviyesini tam olarak tolere edemediğini göstermektedir. Yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerin serum LH düzeyleri de kontrol gruplarına benzer bulunurken, testosteron ve ucOC seviyeleri anlamlı olarak yüksekti. Testis doku kesitleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, 3βHSD ekspresyonu yönünden anlamlı bir farklılık gözlenmezken, INSL3 ve GPRC6A ekspresyonlarının ekzojen osteokalsin uygulaması nedeniyle anlamlı bir artış sergilediği görüldü. İmmünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak elde edilen bu bulgular, yalnızca osteokalsin uygulanan gruplarda osteokalsinin Leydig hücre sayısında anlamlı bir değişiklik oluşturmasa da mevcut Leydig hücrelerinin fonksiyonunu artırıcı yönde etki ettiğini düşündürmektedir. Ayrıca testis doku örneklerinin, ışık ve elektron mikroskobik incelemelerinde de biyokimyasal ve immünohistokimyasal bulgularla uyumlu olarak, seminiferöz tübüller ve insterstisyum yapısının da normal olduğu görülmektedir.

Pubertede gerçekleşen LH sekresyonlarına paralel olarak testosteron seviyesinin, iskelet gelişimine bağlı olarakta osteokalsin seviyesinin yükseldiği bilinmektedir (163, 194, 198, 232, 244). Kirmani ve arkadaşlarının, OC-testosteron ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, kemik gelişim süreci olan pubertede (11-14 yaş) artan osteokalsin seviyesinin, testosteron seviyesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (194). Gerçekten de çalışmamızda tüm alt gruplarda prepubertal dönem deneklere ait ucOC seviyelerinin, postpubertal EDS uygulanan deneklerden yüksek olduğu görüldü.

Testosteron üretiminin primer stimülatörü olan LH; kemik metabolizmasını 3 farklı yoldan modüle etmektedir. İlkinde; testosteron sentezini stimüle ederek kemik kütle artışını sağlarken, ikinci yolda INSL3 sentezini regüle ederek hem yetişkinlik döneminde Leydig hücrelerinin proliferasyon ve farklanmasında, hem de kemik metabolizmasında rol almaktadır. Herhangi bir sebeple LH-INSL3 arasındaki sinyalizasyon bozukluğunun, kemik kütlesinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir. Üçüncü yolda ise LH; 25-hidroksi Vitamin D ekpresyonunu regüle ederek, yine kemik mineralizasyonu ve kalsiyum homeostasisinde görev alır (244). Hannan ve arkadaşlarının 2016 da yaptıkları bir çalışmada, endojenöz ve ekzojenöz kronik LH stimülasyonu ile serum INSL3 konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (239). Yetişkinlik döneminde LH kontrolünde Leydig hücrelerinden salınan INSL3, sistemik etkilerinin yanı sıra, otokrin ve parakrin etki göstererek germ hücrelerinin ve Leydig

hücrelerinin fonksiyonlarını da düzenlemektedir (19, 211, 229). LH ve INSL3 arasındaki pozitif ilişki son 15 yılda literatürde birçok çalışmada gösterilmesine rağmen, farklı görüşte çalışmalara da rastlanılmıştır. Bay ve arkadaşları 135 sağlıklı yetişkin erkeğin kullanıldığı çalışmalarında, LH ve INSL3 arasında herhangi bir ilişkinin olmadığını ileri sürmüşlerdir (226). Ancak aynı araştırmacıların 2007 yılında erken postnatal ve geç prepubertal dönemdeki erkeklerle ilgili çalışmalarında ise bir önceki çalışmalarından farklı olarak, kord kanı ve serumdaki LH/INSL3 oranının, prenatal kriptorşidizm tanısı koymada ve Leydig hücre fonksiyon bozukluklarının belirlenmesinde, LH/testosteron oranına göre daha hassas bir belirteç olduğu, dolayısıyla LH ve INSL3 arasında pozitif bir ilişkinin bulunduğu bildirilmiştir (227). Uniorşid erkeklerle yapılan bir çalışmada ise, INSL3 ve LH arasında negatif ilişkinin varlığı vurgulanırken, aynı çalışma kapsamında normal sağlıklı erkeklerde INSL3 ve LH arasında pozitif bir ilişkinin varlığı dikkati çekmiştir (224). Haftalar ya da ayları kapsayan gonadotropin tedavilerinde de INSL3 sentezinin arttığı, Leydig hücrelerinin farklanma ve fonksiyon kapasitelerinin indüklendiği bildirilmiştir (211, 226). Kawamura ve arkadaşları da GnRH antagonisti uygulayarak gonadotropin süpresyonu yaptıkları sıçanlarda, INSL3 tedavisinin, germ hücre apopitozuna karşı koruyucu etkisini göstermişlerdir (229). Endokrin bozucuların; postnatal yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim sürecine veya EDS ile yapılan Leydig hücre eliminasyonunun ardından gerçekleşen Leydig hücre rejenerasyonuna etkileriyle ilgili çalışmalarda, Leydig hücre sayı ve fonksiyonlarının indirgendiği, dolayısıyla INSL3 sentezinde azalmanın gerçekleştiği rapor edilmiştir. Bu durum, endokrin bozucuların gestasyon döneminde veya pubertal dönemde Leydig hücre sayı ve fonksiyonlarına olan olumsuz etkilerinin en erken INSL3 ölçümü ile monitörize edilebileceği şeklinde yorumlanmıştır (21, 22). Ayrıca Klinefelter sendromlu hastalarla yapılan bir başka çalışmada testosteron seviyesi gibi INSL3 seviyesinin de düşük olması, Leydig hücrelerinde şiddetli fonksiyon bozukluğunun bir belirtisi olarak kabul edilmiştir. Şiddetli hipospermatogenez nedeniyle infertil olan erkeklerde ise normal testosteron ve LH seviyesi gözlenmesine rağmen, düşük INSL3 seviyesinin izlenmesi; INSL3'ün, Leydig hücre hasarının tayin edilmesinde testosterondan daha duyarlı bir belirteç olduğu ve klinik olarak androjen süpresyonunu belirlemede kullanılabilir olduğu belirtilmiştir (211). Literatürde hipotalamik-hipogonadizm tanısı konan erkeklerde, Leydig hücre

sayısında ve fonksiyonlarında azalmaya bağlı olarak, INSL3 konsantrasyonunun düşük olduğuna dair çok sayıda yayın bulunmaktadır. Bu hastalığa sahip erkeklere birkaç günlük hCG/LH uygulaması yapılması durumunda, periferal testosteron seviyesinde akut artışın gerçekleştiği, ancak INSL3 seviyesinin düşük kaldığı görülmüştür (226, 245). Tüm bu çalışmalar dikkate alındığında, INSL3 konsantrasyonunun, Leydig hücrelerinin gelişim süreci veya sonrası için hücrede "hasar hafızası" oluşturarak, Leydig hücrelerinin terminal fonksiyon kapasitelerini etkilediği düşünülmektedir (19).

INSL3 ve LH arasındaki pozitif ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışma bulunmasına rağmen, INSL3'ün osteokalsin ile ilişkisini araştıran literatürde yalnızca bir çalışmaya rastlanılmıştır. Overvad ve arkadaşları tarafından 2014 yılında yayınlanan bu çalışmada araştırmacılar, Klinefelter sendromlu hastalarda düşük INSL3 seviyesi ile kemik mineral yoğunluğundaki azalmayı ilişkilendirerek, INSL3 ve osteokalsin arasındaki pozitif ilişkiyi göstermişlerdir. Aynı çalışmada testosteron tedavisi uygulanan Klinefelter sendromlu erkeklerde INSL3 seviyesinin, testosteron tedavisi uygulanmayan Klinefelter sendromlu erkeklerden daha düşük olduğu rapor edilmiştir. Bunun nedeni olarak; ekzojen testosteron tedavisi gören bu hastalarda, ilerleyen aşamada LH süpresyonu sonucu Leydig hücrelerinde INSL3 üretim kapasitesinin baskılanması gösterilmiştir (233). Del Borgo ve arkadaşları ise intrastestiküler INSL3 antagonisti enjeksiyonu yapılan sıçanlarda, germ hücre kaybının gerçekleştiğini ve bu nedenle de INSL3 antagonisti uygulamalarının, doğum kontrol yöntemi olarak da kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (230).

Sunulan çalışmada elde edilen bulgular, LH, osteokalsin ve INSL3 arasındaki pozitif ilişkiyi desteklemekte olup, GnRH antagonisti uygulanan deneklerde, LH süpresyonu nedeniyle testosteron seviyesinde azalmaya paralel olarak, ucOC seviyesi ile INSL3 ve GPRC6A ekspresyonlarında belirgin bir düşüş tespit edilmiştir. Ayrıca GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin tedavisi uygulanan deneklerde de ucOC seviyesi ile INSL3 ve GPRC6A ekspresyonları, kontrol grupları ve yalnızca osteokalsin uygulanan gruplardan belirgin şekilde düşüktü. LH süpresyonuna bağlı olarak azalan testosteron seviyesinin, bu gruplarda ucOC seviyesini de düşürdüğü ve bunun bir sonucu olarak, osteokalsin ile pozitif ilişki içinde olan INSL3 ile osteokalsin reseptörü olan GPRC6A ekspresyonlarında azalmanın gerçekleştiği söylenebilir. Diğer taraftan LH süpresyonu nedeniyle Leydig hücrelerinde gözlenen ciddi fonksiyon kaybına karşı

osteokalsin uygulamasının, Leydig hücreleri için bir fonksiyon markırı olarak kullanılan INSL3'ün ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olmadığını da düşündürmektedir. Bununla birlikte, INSL3 ekspresyonundaki azalmanın LH süpresyonundan mı yoksa indirekt olarak osteokalsin seviyesindeki düşüşten mi kaynaklandığına ilişkin soruların cevabı için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak yalnızca GnRH antagonisti uygulanan deneklerin ucOC seviyeleri, GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklerininkiyle karşılaştırıldığında ise anlamlı olmasa da bir miktar artış kaydedilmiştir. Bu bulgu, normalde LH kontrolünde ekspresyon gösteren INSL3'ün, LH salınımı baskılandığında, testosteron gibi, osteokalsin tarafından zayıfta olsa stimüle edildiğini göstermektedir. Yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerin testis doku kesitlerinde osteokalsinin, Leydig hücre fonksiyonunu artırıcı yönde etki göstererek, INSL3 ve GPRC6A ekspresyonlarında anlamlı bir artış sağladığı dikkati çekti. Yalnızca osteokalsin uygulanan gruplarda GPRC6A aktivitesindeki bu artış; aynı gruplarda osteokalsin tarafından GPRC6A aracılığıyla gerçekleşen testosteron sentezindeki anlamlı artışı açıklamaktadır. Ekzojen osteokalsin alımına bağlı olarak GPRC6A'da görülen immünreaktivite artışı; bir ligand olarak osteokalsinin, kendi reseptörü olan G-protein bağlı aile üyesi GPRC6A ekpresyon yoğunluğunu yükseltmesinden veya reseptör sayısını farklı sinyal yolaklarını kullanarak artırabilmesinden kaynaklanabilir. Diğer yandan aynı gruplardaki özellikle testosteron seviyesindeki bu artışın osteokalsinin, GPRC6A sayısı veya aktivitesini artırıcı yöndeki etkisinden mi yoksa INSL3 ekspresyonundaki artıştan mı kaynaklandığı ise tartışma konusudur.

Literatürde INSL3/RXFP2 sinyalizasyonu ile kemik metabolizması arasındaki ilişki, ilk kez 2008 yılında Ferlin ve arkadaşları tarafından ortaya konulmuştur. Çalışmada RXFP2 mutasyonu veya INSL3 aktivitesinde azalma nedeniyle 25 erkeğin 16'sında, hipogonadizmin belirtilerinden biri olan kemik mineral yoğunluğunda azalmaya bağlı osteoporoz veya osteopeninin gözlendiği rapor edilmiştir. Bu nedenle INSL3 sinyalizasyon bozukluğunun, osteoporoz tanısı koymada yeni bir terapötik yol olabileceği ileri sürülmüştür (232).

Çalışmamızda yetişkin Leydig hücrelerinin normal postnatal gelişim süreçleri ile EDS uygulaması sonrasında model hayvanlarda yeni yetişkin Leydig hücre jenerasyonunun oluşum aşamasında yalnızca osteokalsin uygulamasının, Leydig hücre fonksiyonlarını anlamlı oranda artırıcı etki gösterdiği belirlendi. Aynı zamanda hem

normal koşullarda hem de model hayvanlarda yetişkin Leydig hücrelerinin farklanma sürecine ait biyokimyasal, mikroskobik ve immünohistokimyasal verilerin genel olarak birbirine benzerlik gösterdiği dikkati çekti. Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, yetişkin Leydig hücrelerinin normal postnatal gelişim sürecinde ve EDS uygulaması sonrasındaki yetişkin Leydig hücrelerinin farklanma aşamasında osteokalsin-testosteron, osteokalsin-INSL3 ve testosteron-INSL3 arasında pozitif ilişkinin bulunduğu, ancak bu ilişkinin in vivo koşullarda LH'dan tamamen bağımsız olmadığı ve indirekt olarak LH süpresyonundan etkilendiği bulundu.

Literatürde in vitro koşullarda veya LHR-/- farelerle yapılan birçok çalışmada, OC'in LH'dan bağımsız olarak testosteron sentezini stimüle ettiği gösterilmesine rağmen, in vivo koşullarda LH süpresyonu yapılan deneklerde OC-testosteron ilişkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada GnRH antagonisti aracılığıyla LH süpresyonu yapılan deneklerde OC uygulaması yapılarak, LH duyarsızlığı bulunan veya LH eksikliğine bağlı hipogonadizm tanısı konan hastalarda LH yerine OC'in testosteron sentezini stimüle edip edemeyeceğinin araştırması yapılmıştır. Elde edilen bulgulara göre, OC'in bir miktar testosteron sentezini uyardığı belirlenmekle birlikte, esas etkisini LH süpresyonu yapılmayan yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerde gösterdiği tespit edilmiştir. 3βHSD immünreaktivite skorlarına ve Leydig hücre sayısı analizlerine göre osteokalsinin, Leydig hücre sayısını değiştirmeden, mevcut Leydig hücre fonksiyonunu artırarak testosteron seviyesini yükselttiği düşünüldü. Çalışmamız yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim sürecinde, osteokalsin ve testosteron ilişkisini Leydig hücre sayı ve fonksiyonları çerçevesinde değerlendiren ilk çalışmadır.

INSL3; testosteron gibi fetal ve yetişkinlik döneminde Leydig hücreleri tarafından sentezlenen bir hormondur. Fetal hayatta LH'dan bağımsız olarak sentezlendiği bilinen INSL3, yetişkin hayatta LH kontrolündedir. Bizim çalışmamızda da LH süpresyonu yapılan deneklere OC uygulaması yapılarak INSL3'ün yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim sürecinde, testosteron gibi LH'dan bağımsız OC aracılığıyla sentezlenip sentezlenmediği araştırılmıştır. Çalışmamızda tıpkı testosteron gibi INSL3'ün de, LH'dan bağımsız olarak OC aracılığıyla bir miktar ekpresyonunun arttığı belirlenirken, LH süpresyonu yapılmayan yalnızca OC uygulanan deneklerde ise OC'in, Leydig hücre fonksiyonunu artırarak, normal sınırların üstünde INSL3

ekspresyonuna neden olduğu dikkati çekti. Bu bakımdan sunulan çalışma yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim sürecinde osteokalsin ve INSL3 ilişkisini araştıran ilk çalışma olma özelliğini de taşımaktadır.

Osteokalsin ile Leydig hücre fonksiyonları arasındaki bu karşılıklı fonksiyonel ilişkinin en önemli avantajı; indirekt olarak kemik sağlığının da korunuyor olmasıdır. Ancak bu koşullarda dezanvantaj olarak diğer sistemlerde beklenmeyen yan etkilerin oluşması da söz konusudur. Bu nedenle beslenme, iskelet sağlığı ve üreme gibi, çok sayıda doku ve organ arasındaki fizyolojik bütünsel ilişkinin ortaya çıkarılması için ileri çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Son yıllarda çevresel ve genetik faktörler dışında, yaşlanma veya testiküler hasara bağlı olarak hipogonadizm tanısı konulan erkeklerde artan ekzojen testosteron kullanımının, uzun vadede LH salınımını indirgediği ve endojenöz testosteron üretimini de durduğu dikkati çekmektedir. Bu durum kemik mineral yoğunluğunda azalmaya bağlı osteoporoz dışında, kas gücünde ve seksüel fonksiyonlarda kayıplara, kardiyovasküler hastalıklar ile böbrek yetmezliği ve prostat kanseri gibi çeşitli yan etkilere de neden olmaktadır (9, 11, 12). Tüm bu yan etkileri elimine etmek adına, testosteron replasman tedavileri yerine özellikle primer hipogonadizme karşı veya mevcut fertilite koşullarını iyileştirmek için ekzojen osteokalsin uygulamalarının yeni bir terapötik yol olabileceği kanaatine varıldı.

Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde; yetişkin Leydig hücrelerinin normal postnatal gelişim süreci ve EDS uygulaması sonrası rejenerasyonları sırasında, osteokalsin uygulamasının, Leydig hücre sayısında anlamlı bir farklılık oluşturmadığı, ancak mevcut Leydig hücrelerinin fonksiyonunu artıcı yönde etki ederek, testosteron seviyesini artırdığı belirlendi. Osteokalsin-testosteron ve osteokalsin-INSL3 arasındaki pozitif ilişkinin in vivo koşullarda LH'dan tamamen bağımsız olmadığı sonucuna varıldı.

6. SONUÇLAR

Yetişkin Leydig hücrelerinin normal postnatal gelişim sürecinde ve EDS uygulaması sonrasında yetişkin Leydig hücrelerinin rejenerasyonu sırasında OC'in, yetişkin Leydig hücrelerinde testosteron ve INSL3 sentezine etkilerini ışık-elektron mikroskobik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle incelendiği bu çalışma sonucunda;

1. Herhangi bir uygulama yapılmaksızın, normal laboratuvar koşullarında yaşatılan kontrol gruplarına ait deneklerin testis doku örneklerinin ışık ve elektron mikroskobik incelemesinde; seminiferöz tübüllerin ve insterstisyumun normal yapıda olduğu görüldü. İmmünohistokimyasal değerlendirmelerinde Leydig hücrelerinde yoğun 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A ekspresyonu ile serum örneklerinin biyokimyasal analizlerinde normal sınırlarda LH, testosteron ve ucOC seviyelerinin varlığı tespit edildi.
2. GnRH antagonisti uygulanan deneklerin testis doku kesitlerinde seminiferöz tübüller ve insterstisyumda ışık ve elektron mikroskobik düzeylerde belirgin dejeneratif değişiklikler izlendi. Leydig hücrelerinin 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A immünreaktivitesinde de belirgin bir azalma gözlendi. Serum LH, testosteron ve ucOC seviyelerinin de belirgin şekilde düşük olduğu görüldü.
3. GnRH antagonisti ile birlikte osteokalsin uygulanan deneklerin testis doku kesitlerinde ışık ve elektron mikroskobik düzeyde dejeneratif değişikliklerin kısmen de olsa devam ettiği, yalnızca GnRH antagonisti uygulanan deneklerle karşılaştırıldığında Leydig hücrelerinde 3βHSD, INSL3 ve GPRC6A immünreaktivite skorlarında anlamlı olmasa da bir artışın gerçekleştiği dikkati çekti. LH ve testosteron seviyelerinde ise azalmanın kısmen devam ettiği, özellikle puberte döneminde olmaları nedeniyle ekzojen osteokalsin uygulamasına bağlı olarak Grup 1C deneklerinin ucOC seviyesinin kontrol grubuna benzer olduğu, ancak Grup 2C ucOC seviyesinin kontrol grubundan düşük olduğu gözlendi.
4. Yalnızca osteokalsin uygulanan deneklerde ise testis doku kesitlerinde belirgin herhangi bir dejeneratif değişikliğe rastlanılmadı. Leydig hücrelerinde özellikle

INSL3 ve GPRC6A immünreaktivite skorları anlamlı olarak kontrol gruplarından yüksek bulundu. 3βHSD immünreaktivite skorlarının ise kontrol gruplarına göre anlamlı bir farklılık oluşturmadığı tespit edildi. Testosteron ve ucOC seviyeleri kontrol gruplarından anlamlı şekilde yüksek iken, LH seviyelerinin kontrol gruplarından anlamlı bir farklılık oluşturmadığı görüldü.

5. Yetişkin Leydig hücrelerinin normal postnatal gelişim süreçleri ile EDS uygulaması sonrasında model hayvanlarda yeni yetişkin Leydig hücre jenerasyonunun oluşumu sırasında elde edilen biyokimyasal, mikroskobik ve immünohistokimyasal verilerin genel olarak birbirine benzerlik gösterdiği dikkati çekti.

Kemik sağlığı ve üreme sistemi arasındaki osteokalsin aracılı fizyolojik ilişkinin ortaya çıkarılması ile testosteron replasman tedavilerine bağlı yan etkileri elimine etmek için pubertede ve yetişkinlik döneminde özellikle primer hipogonadizm tedavisinde veya mevcut fertilite koşullarını iyileştirmek adına ekzojen osteokalsin kullanımının, yeni bir terapötik yol olabileceği sonucuna varıldı. Bununla birlikte INSL3 ve GPRC6A arasındaki fonksiyonel ilişkinin gen düzeyinde de ortaya çıkarılması için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde, yetişkin Leydig hücrelerinin normal postnatal gelişim sürecinde ve EDS uygulaması sonrasındaki yetişkin Leydig hücrelerinin farklanma aşamasında osteokalsin-testosteron-INSL3 arasındaki pozitif ilişkinin, in vivo koşullarda LH'dan tamamen bağımsız olmadığı ve indirekt olarak LH süpresyonundan etkilendiği ortaya çıkarıldı. Yetişkin Leydig hücrelerinin gelişim sürecinde LH varlığında osteokalsin alımının, Leydig hücre sayısını değiştimemekle birlikte, mevcut Leydig hücrelerinin fonksiyon kapasitlerini artırıcı yönde etki gösterdiği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. **Nieschlag E, Behre HM and Nieschlag S.** *Andrology; Male Reproductive Health and Dysfunction*. 3th Ed. Springer: Germany, **2010**.

2. **de Kretser DM.** *Male infertility*. Lancet. **1997:** Mar 15;349(9054):787-90.

3. **Brugh VM, Lipshultz L.** Male factor infertility: evaluation and management. *Med Clin North Am*. **2004;** 88(2):367-85.

4. **Trussell JC.** Male reproductive endocrinology: when to replace gonadotropins. *Semin Reprod Med*. **2013;** 31(4):237-44.

5. **Krausz C.** Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **2011;** 25(2):271-85.

6. **Tsujimura A.** The Relationship between Testosterone Deficiency and Men's Health. *World J Mens Health.* **2013;** 31(2):126-35.

7. **Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J.** Low serum testosterone and mortality in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* **2008;** 93(1):68-75.

8. **Seidman SN.** Androgens and the aging male. *Psychopharmacol Bull.* **2007;** 40(4):205-18.

9. **Köhn FM.** Testosterone and body functions. *Aging Male.* **2006;** 9(4):183-8.

10. **Swerdloff RS, Wang C.** Androgens and aging in men. *Exp Gerontol.* **1993;** 28(4-5):435-46.

11. **Le B, Chen H, Zirkin B, Burnett A.** New targets for increasing endogenous testosterone production: clinical implications and review of the literature. *Andrology.* **2014;** 2(4):484-90.

12. **Wang C, Cunningham G, Dobs A, Iranmanesh A, Matsumoto AM, et. al.** Long-term testosterone gel (AndroGel) treatment maintains beneficial effects on sexual function and mood, lean and fat mass, and bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* **2004;** 89(5):2085-98.

13. **Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, et al.** Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* **1996;** 81(12):4358-65.

14. **Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, et. al.** Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J Clin Invest.* **2013;** 123(6):2421-33.

15. **Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, et al.** Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell.* **2011;** 144(5):796-809.

16. **Karsenty G.** The mutual dependence between bone and gonads. *J Endocrinol.* **2012;** 213(2):107-14.

17. **Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, et al.** Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell.* **2007;** 130(3):456-69.

18. **Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, et al.** Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell.* **2010;** 142(2):296-308.

19. **Ivell R, Heng K, Anand-Ivell R.** Insulin-Like Factor 3 and the HPG Axis in the Male. *Front Endocrinol (Lausanne).* **2014;** 27;5:6.

20. **Ivell R, Wade JD, Anand-Ivell R.** INSL3 as a biomarker of Leydig cell functionality. *Biol Reprod.* **2013;** 88(6):147.

21. **Anand-Ivell R, Ivell R.** Insulin-like factor 3 as a monitor of endocrine disruption. Reproduction. **2014;** 147(4):R87-95.

22. **Heng K, Anand-Ivell R, Teerds K, Ivell R.** The endocrine disruptors dibutyl phthalate (DBP) and diethylstilbestrol (DES) influence Leydig cell regeneration following ethane dimethane sulphonate treatment of adult male rats. *Int J Androl.* **2012;** 35(3):353-63.

23. **Yu-Fei Zhang, Kai-Ming Yuan, Yong Liang, Yan-Hui Chu, Qing-Quan Lian, et al.** Alterations of gene profiles in Leydig-cell-regenerating adult rat testis after ethane dimethane sulfonate-treatment. *Asian J Androl.* **2015;** 17(2): 253–260.

24. **Teerds KJ, de Boer-Brouwer M, Dorrington JH, Balvers M, Ivell R.** Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. *Biol Reprod.* **1999;** 60(6):1437-45.

25. **Ariyaratne S, Kim I, Mills N, Mason I, Mendis-Handagama C.** Effects of ethane dimethane sulfonate on the functional structure of the adult rat testis. *Arch Androl.* **2003;** 49(4):313-26.

26. **Christensen A K.** A History of Leydig Cells Research. Payne AH and Hardy MP. *The Leydig Cell in Health and Disease.* New York: Humana Press, **2007**:3-30.

27. **Michael H. Ross WP.** *Histology: A Text And Atlas: With Correlated Cell And Molecular Biology.* 6th Ed. 351 West Camden Street. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, **2011**.

28. **Leslie P. Gartner Jlh.** *Concise Histology*. 4th Ed: Elsevier; **2011**.

29. **Simpson BJ, Wu FC, Sharpe RM.** Isolation of human Leydig cells which are highly responsive to human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab.* **1987**; 65(3):415-22.

30. **O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H.** The foetal Leydig cell differentiation, function and regulation. *Int J Androl.* **2006**; 29(1):90-5.

31. **Lording DW, De Kretser DM.** Comparative ultrastructural and histochemical studies of the the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod Fertil.* **1972;** 29(2):261-9.

32. **Habert R, Lejeune H, Saez JM.** Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* **2001;** 179(1-2):47-74.

33. **Chen H, Ge RS, Zirkin BR.** Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol.* **2009;** 306(1-2):9-16.

34. **Prince FP.** The triphasic nature of Leydig cell development in humans, and comments on nomenclature. *J Endocrinol.* **2001;** 168(2):213-6.

35. **Saez JM.** Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev.* **1994**; 15(5):574-626.

36. **Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB.** Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod.* **2001;** 65(3):660-71.

37. **Barsoum IB, Kaur J, Ge RS, Cooke PS, Yao HH.** Dynamic changes in fetal Leydig cell populations influence adult Leydig cell populations in mice. *FASEB J.* **2013;** 27(7):2657-66.

38. Svingen T, Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations.*Genes Dev.* **2013;** 27(22):2409-26.

39. Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colón E, et al. Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Horm Res Paediatr.* **2010;** 73(2):93-101.

40. Griswold SL, Behringer RR. Fetal Leydig cell origin and development. *Sex Dev.* **2009;** 3(1):1-15.

41. Hatano O, Takakusu A, Nomura M, Morohashi K. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. *Genes Cells.* **1996;** 1(7):663-71.

42. Mayerhofer A, Lahr G, Seidl K, Eusterschulte B, Christoph A, et al. The neural cell adhesion molecule (NCAM) provides clues to the development of testicular Leydig cells. *J Androl.* **1996;** 17(3):223-30.

43. DeFalco T, Takahashi S, Capel B. Two distinct origins for Leydig cell progenitors in the fetal testis. *Dev Biol.* **2011;** 352(1):14-26.

44. Karl J, Capel B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol.* **1998;** 203(2):323-33.

45. Shima Y, Morohashi KI. Leydig progenitor cells in fetal testis. *Mol Cell Endocrinol.* **2017;** 15;445:55-64.

46. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Mol Cell Endocrinol.* **2000;** 163(1-2):3-9.

47. Wen Q, Zheng QS, Li XX, Hu ZY, Gao F, et al. Wt1 dictates the fate of fetal and adult Leydig cells during development in the mouse testis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **2014;** 307(12):E1131-43.

48. Bielinska M, Seehra A, Toppari J, Heikinheimo M, Wilson DB. GATA-4 is required for sex steroidogenic cell development in the fetal mouse. *Dev Dyn.* **2007;** 236(1):203-13.

49. O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. Neuroendocrine regulation of Leydig cell development. *Ann N Y Acad Sci.* **2005;** 1061:109-19.

50. O'Shaughnessy PJ, Fowler PA. Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction*. **2011;** 141(1):37-46.

51. Barsoum IB, Yao HH. Fetal Leydig cells: progenitor cell maintenance and differentiation. *J Androl.* **2010;** 31(1):11-5.

52. Yao HH, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev.* **2002;** 16(11):1433-40.

53. Brennan J, Tilmann C, Capel B. Pdgfr-alpha mediates testis cord organization and fetal Leydig cell development in the XY gonad. *Genes Dev.* **2003;** 17(6):800-10.

54. Miyabayashi K, Katoh-Fukui Y, Ogawa H, Baba T, Shima Y, et al. Aristaless related homeobox gene, Arx, is implicated in mouse fetal Leydig cell differentiation possibly through expressing in the progenitor cells. *PLoS One*. **2013;** 8(6):e68050.

55. Teerds KJ, Huhtaniemi IT. Morphological and functional maturation of Leydig cells: from rodent models to primates. *Hum Reprod Update.* **2015;** 21(3):310-28.

56. Qin J, Tsai MJ, Tsai SY. Essential roles of COUP-TFII in Leydig cell differentiation and male fertility. *PLoS One.* **2008;** 3(9):e3285.

57. **Baker PJ, O'Shaughnessy PJ.** Role of gonadotropins in regulating number of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction.* **2001;** 122(2):227-34.

58. **Zhang FP, Pakarainen T, Zhu F, Poutanen M, Huhtaniemi I.** Molecular characterization of postnatal development of testicular steroidogenesis in luteinizing hormone receptor knockout mice. *Endocrinology*. **2004;**145(3):1453-63.

59. **Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I.** Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol.* **2001;** 15(1):172-83.

60. **El-Gehani F, Zhang FP, Pakarinen P, Rannikko A, Huhtaniemi I.** Gonadotropin independent regulation of steroidogenesis in the fetal rat testis. *Biol Reprod.* **1998;** 58(1):116-23.

61. **Habert R, Picon R.** Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol-17 beta levels in maternal maternal and fetal plasma and in fetal testes in the rat. *J Steroid Biochem.* **1984;** 21(2):193-8.

62. **Gondos B, Paup DC, Ross J, Gorski RA.** Ultrastructural differentiation of Leydig cells in the fetal and postnatal hamster testis. *Anat Rec.* **1974;** 178(3):551-65.

63. **Scott HM, Mason JI, Sharpe RM.** Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev.* **2009;** 30(7):883-925.

64. **Klonisch T, Fowler PA, Hombach-Klonisch S.** Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Dev Biol.* **2004;** 270(1):1-18.

65. **Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, et al.** Targeted disruption of the Insl3 gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol.* **1999;** 13(5):681-91.

66. **Wu SM, Chan WY.** Male pseudohermaphroditism due to inactivating luteinizing hormone receptor mutations. *Arch Med Res.* **1999;** 30(6):495-500.

67. **Wen Q, Cheng CY, Liu YX.** Development, function and fate of fetal Leydig cells. *Semin Cell Dev Biol.* **2016;** 59:89-98.

68. **Kerr JB, Knell CM.** The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development.* **1988;** 103(3):535-44.

69. **Kuopio T, Tapanainen J, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I.** Developmental stages of fetal type Leydig cells in prepubertal rats. *Development.* **1989;** 107(2):213-20.

70. **Zirkin BR, Ewing LL.** Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: a stereological study of cell number and ultrastructure. *Anat Rec.* **1987;** 219(2):157-63.

71. **Chen H, Stanley E, Jin S, Zirkin BR.** Stem Leydig cells: from fetal to aged animals. *Birth Defects Res C Embryo Today.* **2010;** 90(4):272-83.

72. **Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Papadopoulos V, Zirkin BR, et al.** In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2006;** 103(8):2719-24.

73. **Benton L, Shan LX, Hardy MP.** Differentiation of adult Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **1995;** 53(1-6):61-8.

74. **Ariyaratne HB, Chamindrani Mendis-Handagama S.** Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod.* **2000;** 62(3):680-90.

75. Zhang Y, Ge R, Hardy MP. Androgen-forming stem Leydig cells: identification, function and therapeutic potential. *Dis Markers.* **2008;** 24(4-5):277-86.

76. Stanley EL, Johnston DS, Fan J, Papadopoulos V, Chen H, et al. Stem Leydig cell differentation: differentiation: gene expression during development of the adult rat population of of Leydig cells. *Biol Reprod.* **2011;** 85(6):1161-6.

77. Hardy MP, Gelber SJ, Zhou ZF, Penning TM, Ricigliano JW, et al. Hormonal control of Leydig cell differentiation. *Ann N Y Acad Sci.* **1991;** 637:152-63.

78. Siril Ariyaratne HB, Chamindrani Mendis-Handagama S, Buchanan Hales D, Ian Mason. Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *J. Biol Reprod.* **2000;** 63(1):165-71.

79. Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, et al. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol.* **2004;** 167(5):935-44.

80. Teerds KJ, Rijntjes E, Veldhuizen-Tsoerkan MB, Rommerts FF, de Boer-Brouwer M. The development of rat Leydig cell progenitors in vitro: how essential is luteinising hormone? *J Endocrinol.* **2007;** 194(3):579-93.

81. Baker PJ, Johnston H, Abel M, Charlton HM, O'Shaughnessy PJ. Differentiation of adult-type Leydig cells occurs in gonadotrophin-deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol.* **2003;** 1:4.

82. Ge RS, Hardy MP. Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differentiation of rat Leydig cells. *Endocrinology.* **1998;** 139(9):3787-95.

83. Teerds KJ, Closset J, Rommerts FF, de Rooij DG, Stocco DM, et al. Effects of pure FSH and LH preparations on the number and function of Leydig cells in immature hypophysectomized rats. *J Endocrinol.* **1989;** 120(1):97-106.

84. Chemes HE, Gottlieb SE, Pasqualini T, Domenichini E, Rivarola MA, et al. Response to acute hCG stimulation and steroidogenic potential of Leydig cell fibroblastic precursors in humans. *J Androl.* **1985;** 6(2):102-12.

85. Prince FP. Ultrastructure of immature Leydig cells in the human prepubertal testis. *Anat Rec.* **1984;** 209(2):165-76.

86. Shan LX, Phillips DM, Bardin CW, Hardy MP. Differential regulation of steroidogenic enzymes during differentiation optimizes testosterone production by adult rat Leydig cells. *Endocrinology.* **1993;** 133(5):2277-83.

87. Ivell R, Anand-Ivell R. Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. *Hum Reprod Update.* **2009;** 15(4):463-76.

88. Welsh M, Saunders PT, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* **2009;** 23(12):4218-30.

89. Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K. Cellular architecture of the lamina propria of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res.* **1990;** 262(2):253-61.

90. Awoniyi CA, Zirkin BR, Chandrashekar V, Schlaff WD. Exogenously administered testosterone maintains spermatogenesis quantitatively in adult rats actively immunized against gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* **1992;** 130(6):3283-8.

91. Spaliviero JA, Jimenez M, Allan CM, Handelsman DJ. Luteinizing hormone receptor-mediated effects on initiation of spermatogenesis in gonadotropin-deficient (hpg) mice are replicated by testosterone. *Biol Reprod.* **2004;** 70(1):32-8.

92. **Marshall GR, Jockenhövel F, Lüdecke D, Nieschlag E.** Maintenance of complete but quantitatively reduced spermatogenesis in hypophysectomized monkeys by testosterone alone. *Acta Endocrinol (Copenh).* **1986;** 113(3):424-31.

93. **Roth MY, Page ST, Lin K, Anawalt BD, Matsumoto AM, et al.** Dose-dependent increase in intratesticular testosterone by very low-dose human chorionicgonadotropin in normal men with experimental gonadotropin deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* **2010;** 95(8):3806-13.

94. **Coviello AD, Matsumoto AM, Bremner WJ, Herbst KL, Amory JK, et al.** Low-dose human chorionic gonadotropins manintains intratesticular testosterone in normal men with testosterone-induced gonadotropin suppression. *J Clin Endocrinol Metab.* **2005;** 90(5):2595-602.

95. **O'Shaughnessy PJ, Willerton L, Baker PJ.** Changes in Leydig cell gene expression during development in the mouse. *Biol Reprod.* **2002;** 66(4):966-75.

96. **Pierucci-Alves F, Clark AM, Russell LD.** A developmental study of the Desert hedgehog-null mouse testis. *Biol Reprod.* **2001;** 65(5):1392-402.

97. **O'Shaughnessy PJ, Morris ID, Baker PJ.** Leydig cell re-generation and expression of cell signalling molecules in the germ cell-free testis. *Reproduction.* **2008;** 135(6):851-8.

98. **Tremblay JJ.** Molecular regulation of steroidogenesis in endocrine Leydig cells. *Steroids.* **2015;** 103:3-10.

99. **Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I.** Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **2004;** 215(1-2):135-41.

100. **Selvage DJ, Parsons L, Rivier C.** Role played by brainstem neurons in regulating testosterone secretion via a direct neuralpathway between the hypothalamus and the testes. *Endocrinology.* **2006;** 147(6):3070-5.

101. **Romero LI, Kakucska I, Lechan RM, Reichlin S.** Interleukin-6 (IL-6) is secreted from the brain after intracerebroventricular injection of IL-1 beta in rats. *Am J Physiol.* **1996;** 270(3 Pt 2):R518-24.

102. **O'Hara L, McInnes K, Simitsidellis I, Morgan S, Atanassova N, et al.** Autocrine androgen action is essential for Leydig cell maturation and function, and protects against late-onset Leydig cell apoptosis in both mice and men. *FASEB J.* 2015; 29(3):894-910.

103. **Shan LX, Bardin CW, Hardy MP.** Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology.* **1997;** 138(3):1259-66.

104. **O'Shaughnessy PJ, Johnston H, Willerton L, Baker PJ.** Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J Cell Sci.* **2002;** 115(Pt 17):3491-6.

105. **Shan LX, Hardy MP.** Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. *Endocrinology.* **1992;** 131(3):1107-14.

106. **Welsh M, Saunders PT, Atanassova N, Sharpe RM, Smith LB.** Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* **2009;** 23(12):4218-30.

107. **Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF, Seidl K.** Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules. *Cell Tissue Res.* **1990;** 262(2):253-61.

108. **Welsh M, Moffat L, Belling K, de França LR, Segatelli TM, et al.** Androgen receptor signalling in peritubular myoid cells is essential for normal differentiation and function of adult Leydig cells. *Int J Androl*. **2012;** 35(1):25-40.

109. Li X, Li H, Jia L, Li X, Rahman N. Oestrogen action and male fertility: experimental and clinical findings. *Cell Mol Life Sci.* **2015;** 72(20):3915-30.

110. Yu W, Zheng H, Lin W, Tajima A, Zhang Y, et al. Estrogen promotes Leydig cell engulfment by macrophages in male infertility. *J Clin Invest.* **2014;** 124(6):2709-21.

111. Kirilov M, Clarkson J, Liu X, Roa J, Campos P, et al. Dependence of fertility on kisspeptin-Gpr54 signaling at the GnRH neuron. *Nat Commun.* **2013;** 4:2492.

112. Kauffman AS, Park JH, McPhie-Lalmansingh AA, Gottsch ML, Bodo C, et al. The kisspeptin receptor GPR54 is required for sexual differentiation of the brain and behavior. *J Neurosci.* **2007;** 27(33):8826-35.

113. Weissman BA, Niu E, Ge R, Sottas CM, Holmes M, et al. Paracrine modulation of androgen synthesis in rat leydig cells by nitric oxide. *J Androl.* **2005;** 26(3):369-78.

114. Anand-Ivell R, Heng K, Hafen B, Setchell B, Ivell R. Dynamics of INSL3 peptide expression in the rodent testis. *Biol Reprod.* **2009;** 81(3):480-7.

115. Anand-Ivell RJ, Relan V, Balvers M, Coiffec-Dorval I, Fritsch M, et al. Expression of the insülin like peptide 3 (INSL3) hormone-receptor (LGR8) system in the testis. *Biol Reprod.* **2006;** 74(5):945-53.

116. Wikström AM, Bay K, Hero M, Andersson AM, Dunkel L. Serum insulin-like factor 3 levels during puberty in healthy boys and boys with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* **2006;** 91(11):4705-8.

117. Anand-Ivell R, Wohlgemuth J, Haren MT, Hope PJ, Hatzinikolas G, et al. Peripheral INSL3 concentrations decline with age in a large population of Australian men. *Int J Androl.* **2006;** 29(6):618-26.

118. Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. The role of thyroid hormone in testicular development and function. *J Endocrinol.* **2008;** 199(3):351-65.

119. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, et al. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* **2004;** 89(1):400-9.

120. Duarte A, Poderoso C, Cooke M, Soria G, Cornejo Maciel F, et al. Mitochondrial fusion is essential for steroid biosynthesis. *PLoS One.* **2012;** 7(9):e45829.

121. Polyakov VY, Soukhomlinova MY, Fais D. Fusion, Fragmentation, and Fission of Mitochondria. *Biochemistry.* **2003;** 68(8):838–849.

122. Ariyaratne S, Kim I, Mills N, Mason I, Mendis-Handagama C. Effects of ethane dimethane sulfonate on the functional structure of the adult rat testis. *Arch Androl.* **2003;** 49(4):313-26.

123. Jackson CM, Jackson H. Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatogenic action of ethane dimethanesulphonate. *J Reprod Fertil.* **1984;** 71(2):393-401.

124. Atanassova N, Koeva Y, Bakalska M, Pavlova E, Nikolov B, et al. Loss and recovery of androgen receptor protein expression in the adult rat testis following androgen withdrawal by ethane dimethanesulfonate. *Folia Histochem Cytobiol.* **2006;** 44(2):81-6.

125. Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, et al. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol.* **2004;** 167(5):935-44.

126. **Kerr JB, Bartlett JM, Donachie K, Sharpe RM.** Origin of regenerating Leydig cells in the testis of the adult rat. An ultrastructural, morphometric and hormonal assay study. *Cell Tissue Res.* **1987;** 249(2):367-77.

127. **Vreeburg JT, Ooms MP, Rommerts FF, Teerds KJ.** Functional properties of developing rat Leydig cells after treatment with ethylene dimethanesulphonate (EDS). *J Reprod Fertil.* **1988;** 84(1):63-9.

128. **Guo J, Zhou H, Su Z, Chen B, Wang G, et al.** Comparison of cell types in the rat Leydig cell lineage after ethane dimethanesulfonate treatment. *Reproduction.* **2013;** 145(4):371-80.

129. **Chen H, Huhtaniemi I, Zirkin BR.** Depletion and repopulation of Leydig cells in the testes of aging brown Norway rats. *Endocrinology.* **1996;** 137(8):3447-52.

130. **Stanley E, Lin CY, Jin S, Liu J, Sottas CM, et al.** Identification, proliferation and differentiation of adult Leydig stem cells. *Endocrinology.* **2012;** 153(10):5002-10.

131. **Morris AJ, Taylor MF, Morris ID.** Leydig cell apoptosis in response to ethane dimethanesulphonate after both in vivo and in vitro treatment. *J Androl.* **1997;** 18(3):274-80.

132. **Taylor MF, de Boer-Brouwer M, Woolveridge I, Teerds KJ, Morris ID.** Leydig cell apoptosis after the administration of ethane dimethanesulfonate to the adult male rat is a Fas-mediated process. *Endocrinology.* **1999;** 140(8):3797-804.

133. **Kim JM, Luo L, Zirkin BR.** Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate. *Endocrinology.* **2000;** 141(5):1846-53.

134. **Morris ID, Lendon RG, Waters C, Naylor G, Jones N.** Thymic regression and apoptosis in the rat after treatment with the Leydig cell cytotoxin ethylene dimethanesulphonate (EDS). *Toxicology.* **1997;** 120(1):19-27.

135. **Sharpe RM, Maddocks S, Kerr JB.** Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destructionand testosterone replacement. *Am J Anat.* **1990;** 188(1):3-20.

136. **Gray LE, Klinefelter G, Kelce W, Laskey J, Ostby J, et al.** Hamster Leydig cells are less sensitive to ethane dimethanesulfonate when compared to rat Leydig cells both in vivo and in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* **1995;** 130(2):248-56.

137. **Kraemer FB, Shen WJ, Harada K, Patel S, Osuga J, et al.** Hormone-sensitive lipase is required for high-density lipoprotein cholesteryl ester-supported adrenal steroidogenesis. *Mol Endocrinol.* **2004;** 18(3):549-57.

138. **Payne AH, Hales DB.** Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev.* **2004;** 25(6):947-70.

139. **Hall PF, Osawa S, Thomasson CL.** A role for calmodulin in the regulation of steroidogenesis. *J Cell Biol.* **1981;** 90(2):402-7.

140. **Papadopoulos V, Miller WL.** Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* **2012;** 26(6):771-90.

141. **Stocco DM.** Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. Mol Endocrinol. **2001;** 15(8):1245-54.

142. **Parker KL, Rice DA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, et al.** Steroidogenic factor 1: an essential of endocrine development. *Recent Prog Horm Res.* **2002;** 57:19-36.

143. Coutant R, Mallet D, Lahlou N, Bouhours-Nouet N, Guichet A, et al. Heterozygous mutation of steroidogenic factor-1 in 46,XY subjects may mimic partial androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* **2007;** 92(8):2868-73.

144. Miller WL. Disorders of androgen synthesis--from cholesterol to dehydroepiandrosterone. *Med Princ Pract.* **2005;** 1:58-68.

145. Papadopoulos V, Amri H, Li H, Boujrad N, Vidic B, et al. Targeted disruption of the peripheral-type benzodiazepine receptor gene inhibits steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line. *J Biol Chem.* **1997;** 272(51):32129-35.

146. Culty M, Luo L, Yao ZX, Chen H, Papadopoulos V, et al. cholesterol transport, peripheral benzodiazepine receptor, and steroidogenesis in aging Leydig cell. *J Androl.* **2002;** 23(3):439-47.

147. Hume R, Kelly RW, Taylor PL, Boyd GS. The catalytic cycle of cytochrome P-450scc and intermediates in the conversion of cholesterol to pregnenolone. *Eur J Biochem.* **1984;** 140(3):583-91.

148. Hughes IA. Minireview: sex differentiation. *Endocrinology.* **2001;** 142(8):3281-7.

149. Jarow JP, Chen H, Rosner TW, Trentacoste S, Zirkin BR. Assessment of the androgen environment within the human testis: minimally invasive method to obtain intratesticular fluid. *J Androl Androl.* **2001;** 22(4):640-5.

150. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev.* **2000;** 21(5):551-83.

151. Araujo AB, O'Donnell AB, Brambilla DJ, Simpson WB, Longcope C, et al. Prevalence and incidence of androgen deficiency in middle-aged and older men: estimates from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* **2004;** 89(12):5920-6.

152. Chen H, Hardy MP, Huhtaniemi I, Zirkin BR. Age-related decreased Leydig cell testosterone production in the brown Norway rat. *J Androl.* **1994;** 15(6):551-7.

153. Zirkin BR, Tenover JL. Aging and declining testosterone: past, present, and hopes for the future. *J Androl.* **2012;** 33(6):1111-8.

154. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. Baltimore Longitudinal Study of Aging. *J Clin Endocrinol Metab.* **2001;** 86(2):724-31.

155. Korenman SG, Morley JE, Mooradian AD, Davis SS, Kaiser FE, et al. Secondary hypogonadism in older men: its relation to impotence. J Clin Endocrinol Metab. **1990;** 71(4):963-9.

156. Michael H, Härkönen PL, Väänänen HK, Hentunen TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and boneresorption. *J Bone Miner Res.* **2005;** 20(12):2224-32.

157. Kaufman JM, Vermeulen A. The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocr Rev.* **2005;** 26(6):833-76.

158. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell.* **2007;** 130(5):811-23.

159. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev.* **2002;** 23(3):279-302.

160. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, et al. Androgens and bone. *Endocr Rev.* **2004;** 25(3):389-425.

161. Reifenstein EC Jr, Albright F. The metabolic effects of steroid hormones in osteoporosis. *J Clin Invest.* **1947;** 26(1):24-56.

162. Sukcharoen N. GnRH Antagonists: an Update. *Thai Journal of Obstetrics and Gynaecology*. **2000;** 12:71-76.

163. Bliss SP, Navratil AM, Xie J, Roberson MS. GnRH signaling, the gonadotrope and endocrine control of fertility. *Front Neuroendocrinol.* **2010;** 31(3):322-40.

164. Matsumoto AM, Karpas AE, Bremner WJ. Chronic human chorionic gonadotropin administartion in normal men: evidence that follicle-stimulating hormone is necessary for the maintenance of quantitatively normal spermatogenesis in man. *J Clin Endocrinol Metab*. **1986;** 62(6):1184-92.

165. Gobello C. Effects of GnRH antagonists vs agonists in domestic carnivores, a review. *Reprod Domest Anim.* **2012;** 47 Suppl 6:373-6.

166. Misro MM, Ganguly A, Das RP. GnRH antagonist treatment affects nuclear size and membrane associated indentations in rat Leydig cells. *Arch Androl.* **1991;** 27(1):25-33.

167. Ganguly A, Misro MM, Das RP. Roles of FSH and testosterone in the initiation of spermatogenesis in prepubertal rats medically hypophysectomized by a GnRH antagonist. *Arch Androl.* **1994;** 32(2):111-20.

168. Behre HM, Kliesch S, Pühse G, Reissmann T, Nieschlag E. High loading and low maintenance doses of a gonadotropin-releasing hormone antagonist effectively suppress serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* **1997;** 82(5):1403-8.

169. Schwetz V, Pieber T, Obermayer-Pietsch B. The endocrine role of the skeleton: background and clinical evidence. *Eur J Endocrinol.* **2012;** 166(6):959-67.

170. Rathore ER, Singh M, Kumar V, Misra A. Osteocalcin: an emerging biomarker for bone turnover. *Int J Res Med Sci.* **2016;** 4(9):3670-3674.

171. Patti A, Gennari L, Merlotti D, Dotta F, Nuti R. Endocrine Actions of Osteocalcin. *Int J Endocrinol.* **2013;** Article ID846480, doi.org/10.1155/2013/846480.

172. Lee AJ, Hodges S, Eastell R. Measurement of osteocalcin. *Ann Clin Biochem.* **2000;** 37(4):432-46.

173. Shao J, Wang Z, Yang T, Ying H, Zhang Y, et al. Bone regulates glucose metabolism as an endocrine organ through osteocalcin. *Int J Endocrinol.* **2015;** 967673.

174. Booth SL, Centi A, Smith SR, Gundberg C. The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? *Nat Rev Endocrinol.* **2013;** 9(1):43-55.

175. Booth SL, Lichtenstein AH, O'Brien-Morse M, McKeown NM, Wood RJ, et al. Effects of a hydrogenated form of vitamin K on bone formation and resorption. *Am J Clin Nutr*. **2001;** 74(6):783-90.

176. Price PA, Williamson MK. Effects of warfarin on bone. Studies on the vitamin K- dependent protein of rat bone. *J Biol Chem.* **1981;** 256(24):12754-9.

177. Confavreux CB. Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism. *Kidney Int.* **2011;** 79121:S14-9.

178. Ferron M, Hinoi E, Karsenty G, Ducy P. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008;** 105(13):5266-70.

179. Ferron M, McKee MD, Levine RL, Ducy P, Karsenty G. Intermittent injection of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type2 diabetes in mice. *Bone.* **2012;** 50(2):568-75.

180. Mizokami A, Yasutake Y, Gao J, Matsuda M, Takahashi I, et al. Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. *PLoS One.* **2013**; 8(2):e57375.

181. Foresta C, Strapazzon G, De Toni L, Gianesello L, Bruttocao A, et al. Androgens modulate osteocalcin release by human visceral adipose tissue. *Clin Endocrinol (Oxf).* **2011;** 75(1):64-9.

182. Kanazawa I, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yamamoto M, Kurioka S, et al. Adiponectin is associated with changes in bone markers during glycemic control in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* **2009;** 94(8):3031-7.

183. Seidell JC, Björntorp P, Sjöström L, Kvist H, Sannerstedt R. Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism*. **1990;** 39(9):897-901.

184. Tsai EC, Matsumoto AM, Fujimoto WY, Boyko EJ. Association of bioavailable, free, and total testosterone with insulin resistance: influence of sex hormone-binding globulin and body fat. *Diabetes Care.* **2004;** 27(4):861-8.

185. Karsenty G. Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass. *Cell Metab*. **2006;** 4(5):341-8.

186. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. Cell. **2000;** 100(2):197-207.

187. Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends Endocrinol Metab.* **2010;** 21(2):89-95.

188. Stoch SA, Parker RA, Chen L, Bubley G, Ko YJ, et al. Bone loss in men with prostate cancer treated with gonadotropin-releasing hormone agonists. *J Clin Endocrinol Metab*. **2001;** 86(6):2787-91.

189. Ferlin A, Schipilliti M, Vinanzi C, Garolla A, Di Mambro A, et al. Bone mass in subjects with Klinefelter syndrome: role of testosterone levels and androgen receptor gene CAG polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab*. **2011;** 96(4):E739-45.

190. De Toni L, Di Nisio A, Rocca MS, De Rocco Ponce M, Ferlin A, et al. Osteocalcin, a bone-derived hormone with important andrological implications. *Andrology.* **2017;** 5(4):664-670.

191. Kanazawa I, Tanaka K, Ogawa N, Yamauchi M, Yamaguchi T, et al. Undercarboxylated osteocalcin is positively associated with free testosterone in male patients with type 2 diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* **2013;** 24(3):1115-9.

192. Liao M, Guo X, Yu X, Pang G, Zhang S, et al. Role of metabolic factors in the association between osteocalcin and testosterone in Chinese men. *J Clin Endocrinol Metab.* **2013;** 98(8):3463-9.

193. Kyvernitakis I, Saeger U, Ziller V, Bauer T, Seker-Pektas B, et al. The effect of age, sex hormones, and bone turnover markers on calcaneal quantitative ultrasonometry in healthy German men. *J Clin Densitom.* **2013;** 16(3):320-8.

194. Kirmani S, Atkinson EJ, Melton LJ 3rd, Riggs BL, Amin S, et al. Relationship of testosterone and osteocalcin levels during growth. *J Bone Miner Res.* **2011;** 26(9):2212-6.

195. Schwetz V, Gumpold R, Graupp M, Hacker N, Schweighofer N, et al. Osteocalcin is not a strong determinant of serum testosterone and sperm count in men from infertile couples. *Andrology.* **2013;** 1(4):590-4.

196. Bolland MJ, Grey A, Horne AM, Reid IR. Testoterone levels following decrease in serum osteocalcin. *Calcif Tissue Int.* **2013;** 93(2):133-6.

197. Legrand E, Hedde C, Gallois Y, Degasne I, Boux de Casson F, et al. Osteoporosis in men: a potential role for the sex hormone binding globulin. *Bone.* **2001;** 29(1):90-5.

198. Ferlin A, Selice R, Carraro U, Foresta C. Testicular function and bone metabolism beyond testosterone. *Nat Rev Endocrinol.* **2013;** 9(9):548-54.

199. Foresta C, Strapazzon G, De Toni L, Perilli L, Di Mambro A, et al. Bone mineral density and testicular failure: evidence for a role of vitamin D 25-hydroxylase in human testis. *J Clin Endocrinol Metab.* **2011;** 96(4):E646-52.

200. Pi M, Faber P, Ekema G, Jackson PD, Ting A, et al. Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem.* **2005;** 280(48):40201-9.

201. Wellendorph P, Bräuner-Osborne H. Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor. *Gene.* **2004;** 335:37-46.

202. Kuang D, Yao Y, Lam J, Tsushima RG, Hampson DR. Cloning and characterization of a family C orphan G-protein coupled receptor. *J Neurochem.* **2005;** 93(2):383-91.

203. Pi M, Quarles LD. GPRC6A regulates prostate cancer progression. *Prostate.* **2012;** 72(4):399-409.

204. Pi M, Chen L, Huang MZ, Zhu W, Ringhofer B, et al. GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome. *PLoS One.* **2008;** 3(12):e3858.

205. Pi M, Nishimoto SK, Quarles LD. GPRC6A: Jack of all metabolism (or master of none). *Mol Metab.* **2016;** 6(2):185-193.

206. Adham IM, Burkhardt E, Benahmed M, Engel W. Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J Biol Chem.* **1993;** 268(35):26668-72.

207. Pusch W, Balvers M, Ivell R. Molecular cloning and expression of the relaxin-like factor from the mouse testis. *Endocrinology.* **1996;** 137(7):3009-13.

208. Spiess AN, Balvers M, Tena-Sempere M, Huhtaniemi I, Parry L, et al. Structure and expression of the rat relaxin-like factor (RLF) gene. *Mol Reprod Dev.* **1999;** 54(4):319-25.

209. Ivell R, Balvers M, Domagalski R, Ungefroren H, Hunt N, et al. Relaxin-like factor: a high specific and constitutive new marker for Leydig cells in the human testis. *Mol Hum Reprod.* **1997;** 3(6):459-66.

210. Ivell R, Balvers M, Anand RJ, Paust HJ, McKinnell C, et al. Differentiation-dependent expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, type 10, in the rodent testis: effect of aging in Leydig cells. *Endocrinology.* **2003 Jul;** 144(7):3130-7.

211. Ferlin A, Foresta C. Insulin-like factor 3: a novel circulating hormone of testicular origin in humans. *Ann N Y Acad Sci.* **2005;** 1041:497-505.

212. Hombach-Klonisch S, Seeger S, Tscheudschilsuren G, Buchmann J, Seliger G, et al. Cellular localization of human relaxin-like factor in the cyclic endometrium and placenta. *Mol Hum Reprod.* **2001;** 7(4):349-56.

213. Hombach-Klonisch S, Buchmann J, Sarun S, Fischer B, Klonisch T. Relaxin-like factor (RLF) is differentially expressed in the normal and neoplastic human mammary gland. *Cancer.* **2000;** 89(11):2161-8.

214. Bathgate R, Moniac N, Bartlick B, Schumacher M, Fields M, et al. Expression and regulation of relaxin-like factor gene transcripts in the bovine ovary: differentiation-dependent expression in theca cell cultures. *Biol Reprod.* **1999;** 61(4):1090-8.

215. Irving-Rodgers HF, Bathgate RA, Ivell R, Domagalski R, Rodgers RJ. Dynamic changes in the expression of relaxin-like factor (INSL3), cholesterol side-chain cleavage cytochrome p450, and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in bovine ovarian follicles during growth and atresia. *Biol Reprod.* **2002;** 66(4):934-43.

216. Zimmermann S, Steding G, Emmen JM, Brinkmann AO, Nayernia K, et al. Targeted disruption of the Insl3 gene causes bilateral cryptorchidism. *Mol Endocrinol.* **1999;** 13(5):681-91.

217. Zimmermann S, Schöttler P, Engel W, Adham IM. Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: structure and expression during testis and ovarydevelopment. *Mol Reprod Dev.* **1997;** 47(1):30-8.

218. Hutson JM, Hasthorpe S, Heyns CF. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. *Endocr Rev.* **1997;** 18(2):259-80.

219. Foresta C, Zuccarello D, Garolla A, Ferlin A. Role of hormones, genes and environment in human cryptorchidism. *Endocr Rev*. **2008;** 29(5):560-80.

220. Elder JS. The undescended testis. Hormonal and surgical management. *Surg Clin North Am.* **1988;** 68(5):983-1005.

221. Spanel-Borowski K, Schäfer I, Zimmermann S, Engel W, Adham IM. Increase in final stages of follicular atresia and premature decay of corpora lutea in Insl3-deficient mice. *Mol Reprod Dev.* **2001;** 58(3):281-6.

222. Ferlin A, Pepe A, Gianesello L, Garolla A, Feng S, et al. New roles for INSL3 in adults. *Ann N Y Acad Sci.* **2009;** 1160:215-8.

223. Ferlin A, Garolla A, Rigon F, Rasi Caldogno L, Lenzi A, et al. Changes in serum insulin-like factor 3 during normal male puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* **2006;** 91(9):3426-31.

224. Anand-Ivell R, Wohlgemuth J, Haren MT, Hope PJ, Hatzinikolas G, et al. Peripheral INSL3 concentrations decline with age in a large population of Australian men. Int J Androl. **2006;** 29(6):618-26.

225. Yuan FP, Lin DX, Rao CV, Lei ZM. Cryptorchidism in LhrKO animals and the effect of testosterone-replacement therapy. *Hum Reprod.* **2006;** 21(4):936-42.

226. Bay K, Hartung S, Ivell R, Schumacher M, Jürgensen D, et al. Insulin-like factor 3 serum levels in 135 normal men and 85 men with testicular disorders: relationship to the luteinizing hormone-testosterone axis. *J Clin Endocrinol Metab.* **2005;** 90(6):3410-8.

227. Bay K, Virtanen HE, Hartung S, Ivell R, Main KM, et al. Insulin-like factor 3 levels in cord blood and serum from children: effects of age, postnatal hypothalamic-pituitary-gonadal axis activation and cryptorchidism. *J Clin Endocrinol Metab.* **2007;** 92(10):4020-7.

228. Roth MY, Lin K, Bay K, Amory JK, Anawalt BD, et al. Serum insulin-like factor 3 is highly correlated with intratesticular testosterone in normal men with acute, experimental gonadotropin deficiency stimulated with low-dose human chorionic gonadotropin: a randomized, controlled trial. *Fertil Steril.* **2013;** 99(1):132-9.

229. Kawamura K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, et al. Paractine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004;** 101(19):7323-8.

230. Del Borgo MP, Hughes RA, Bathgate RA, Lin F, Kawamura K, et al. Analogs of insulin-like peptide 3 (INSL3) B-chain are LGR8 antagonists in vitro and in vivo. *J Biol Chem.* **2006;** 281(19):13068-74.

231. Ivell R, Heng K, Nicholson H, Anand-Ivell R. Brief maternal exposure of rats to the xenobiotics dibutyl phthalate or diethylstilbestrol alters adult-type Leydig cell development in male offspring. *Asian J Androl.* **2013;** 15(2):261-8.

232. Ferlin A, Pepe A, Gianesello L, Garolla A, Feng S, et al. Mutations in the insulin-like factor 3 receptor are associated with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* **2008;** 23(5):683-93.

233. Overvad S, Bay K, Bojesen A, Gravholt CH. Low INSL3 in Klinefelter syndrome is related to osteocalcin, testosterone treatment and body composition, as well as measures of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Andrology*. **2014;** 2(3):421-7.

234. Weinbauer GF, Limberger A, Behre HM, Nieschlag E. Can testosterone alone maintain the gonadotrophin-releasing hormone antagonist-induced suppression of spermatogenesis in the non-human primate. *J Endocrinol.* **1994**; 142(3):485-95.

235. Cornejo-Cortés MA, Sánchez-Torres C, Vázquez-Chagoyán JC, Suárez-Gómez HM, Garrido-Fariña G, et al. Rat embryo quality and production efficiency are dependent on gonadotrophin dose in superovulatory treatments. *Lab Anim.* **2006;** 40(1):87-95.

236. Jackson CM, Jackson H. Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatogenic antispermatogenic action of ethane dimethanesulphonate. *J Reprod Fertil.* **1984;** 71(2):393-401.

237. Bolat D, Oltulu F, Uysal A, Kose T, Gunlusoy B, et al. Effects of losartan on experimental varicocele-induced testicular germ cell apoptosis. *Andrologia.* **2016;** 48(7):840-6

238. Benson T. Akingbemi, Renshan Ge, Gary R. Klinefelter,Barry R. Zirkin, and Matthew P. Hardy. Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with m ultiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004;** 101(3): 775–780.

239. Hannan MA, Kawate N, Fukami Y, Weerakoon WW, Büllesbach EE, et al. Effects of long-acting GnRH antagonist, degarelix acetate, on plasma insulin-like peptide 3, testosterone and luteinizing hormone concentrations, and scrotal circumference in male goats. *Theriogenology.* **2017;** 88:228-235.

240. Misro MM, Ganguly A, Das RP. Adverse effects of chronic GnRH antagonist on seminiferous epithelium in adult rats. *Arch Androl.* **1992;** 29(1):69-78.

241. Välimäki VV, Alfthan H, Ivaska KK, Löyttyniemi E, Pettersson K, et al. Serum estradiol, testosterone and sex hormone-binding globulin as regulators of peak bone mass and bone turnover rate in young Finnish men. *J Clin Endocrinol Metab.* **2004;** 89(8):3785-9.

242. Benito M, Vasilic B, Wehrli FW, Bunker B, Wald M, et al. Effect of testosterone replacement on trabecular architecture in hypogonadal men. *J Bone Miner Res.* **2005;** 20(10):1785-91.

243. Diamond T, Campbell J, Bryant C, Lynch W. The effect of combined androgen blockade on bone turnover and bone mineral densities in men treated for prostate carcinoma: longitudinal evaluation and response to intermittent cyclic etidronate therapy. *Cancer.* **1998;** 83(8):1561-6.

244. De Toni L, De Filippis V, Tescari S, Ferigo M, Ferlin A, et al. Uncarboxylated osteocalcin stimulates 25-hydroxy vitamin D production in Leydig cell line through a GPRC6a-dependent pathway. *Endocrinology.* **2014;** 155(11):4266-74.

245. Bay K, Matthiesson KL, McLachlan RI, Andersson AM. The effects of gonadotropin suppression and selective replacement on insulin-like factor 3 secretion in normal adult men. *J Clin Endocrinol Metab.* **2006;** 91(3):1108-11.

ÖZGEÇMİŞ

Gülfidan COŞKUN, 1985 yılında Andırın-Kahramanmaraş'ta doğdu. İlk ve orta öğrenimini Adana'da tamamladı. 2003 yılında Özel Çukurova Bilfen Fen lisesinden mezun oldu. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladı ve ardından, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2011 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra, aynı yıl doktora eğitimine başladığı Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına ÖYP Araştırma Görevlisi olarak atandı. Gülfidan Coşkun evli ve bir çocuk annesidir.