

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**SKROTAL HİPERTERMİ UYGULANAN SIÇANLARIN  
LEYDİĞ HÜCRELERİNİN MORFOLOJİK OLARAK  
İNCELENMESİ**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Cevat AKTAŞ**

EDİRNE – 2007

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ BİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi  
Prof. Dr. Mehmet KANTER

**SKROTAL HİPERTERMİ UYGULANAN SIÇANLARIN  
LEYDİĞ HÜCRELERİNİN MORFOLOJİK OLARAK  
İNCELENMESİ**

**(Yüksek Lisans Tezi)**

**Cevat AKTAŞ**

**Tez No :**

**EDİRNE – 2007**

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü**

**O N A Y**

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Mehmet KANTER danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Cevat AKTAŞ tarafından tez başlığı “Skrotal Hipertermi Uygulanan Sıçanların Leydig Hücrelerinin Morfolojik Olarak İncelenmesi” olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 19/07/2007 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından “**Yüksek Lisans Tezi**” olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet KANTER  
JÜRİ BAŞKANI

Yrd. Doç. Dr. Enis ULUÇAM  
ÜYE

Yrd. Doç. Dr. Nurettin AYDOĞDU  
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İsmet DÖKMECİ  
Enstitü Müdürü

## **TEŐEKKÜR**

Eđitimim süresince, yetiŐmemde büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen sevgili aileme minnettarım. Yüksek Lisans eğitimim boyunca beni yetiŐtiren, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalıŐmam sırasında bilimsel katkıları ve yardımlarını esirgemeyen, tez danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet KANTER'e, elektron kesitlerinin alınmasında ki yardımlarından dolayı biyolog Tolga MERCANTEPE' ye, araŐtırmam süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Yrd. Doç. Dr. Gülnur KIZILAY, Yrd. Doç. Dr. YeŐim Hülya UZ ve Öđr. Gör. Dr. Meryem AKPOLAT' a en içten teŐekkürlerimi sunarım. ÇalıŐmam esnasında yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım, AraŐ. Gör. Yeter T. TARLADAÇALIŐIR, AraŐ. Gör. Melike SAPMAZ ve AraŐ. Gör. Dr. Bilkay SEREZ' e teŐekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1-2
GENEL BİLGİLER.....	3-9
HİPERTERMİ VE FERTİLİTE.....	3
TESTİSİN HİSTOLOJİSİ.....	3-4
LEYDİĞ HÜCRELERİNİN GELİŞİMİ.....	4-5
LEYDİĞ HÜCRELERİNİN HİSTOLOJİSİ.....	5-6
LEYDİĞ HÜCRELERİNDE STREOİDOGENEZİS.....	6-9
GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	10-13
IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME.....	11
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME.....	11-12
ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME.....	12-13
BULGULAR.....	14-37
AĞIRLIK TAKİBİ SONUÇLARI.....	14-15
KONTROL GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	15-18
HİPERTERMİ SONRASI 1. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	19-21
HİPERTERMİ SONRASI 14. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	22-24
HİPERTERMİ SONRASI 35. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	25-27
HİPERTERMİ SONRASI 70. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	28-30
HİPERTERMİ SONRASI 105. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	31-33
HİPERTERMİ SONRASI 140. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR.....	34-37
TARTIŞMA.....	38-42
SONUÇ.....	43
ÖZET.....	44-45
SUMMARY.....	46-47
KAYNAKLAR.....	48-55
RESİMLER LİSTESİ.....	56-57
ÖZGEÇMİŞ.....	58
EK 1ETİK KURUL KARARI.....	59

## SEMBOL VE KISALTMALAR LİSTESİ

**A°:** Armstrong

**ATP:** Adenozin trifosfat

**cAMP:** Siklik adenozin monofosfat

**cm:** Santimetre

**DER :** Düz endoplazmik retikulum

**DHEA:** Dehidroepiandrosteron

**DHT:** Dihidro-testosteron

**dk:** Dakika

**EDS :** Ethan dimethan sulphonat

**ER:** Östrojen reseptör

**FSH :** Folikül stimulan hormon

**H+E:** Hematoksilen+Eosin

**HSD :** Hidroksisteroid dehidrogenaz

**LH:** Luteinizan hormon

**nm:** Nanometre

**OsO<sub>4</sub>:** Osmium tetraoksit

**P450arom:** P450 aromataz

**PBR :** Peripheral-Type Benzodiazepine Reseptör

**PBS :** Fosfat Buffer Solusyonu

**PK-A :** Protein Kinaz A

**StAR:** Steroidogenik akut regülatör protein

**TGF-β:** Transforming Growth Factor β

**α:** Alfa

**β:** Beta

**μm:** Mikrometre

**μm<sup>2</sup>:** Mikrometrekare

## GİRİŞ VE AMAÇ

Birçok memeli türünde testisler skrotum içinde, vücut dışında bulunur ve fonksiyonlarını normal vücut ısısından birkaç derece daha düşük ısıda gerçekleştirirler. Vücut ısısının altındaki bu sıcaklık spermatogenezis için gereklidir (1-3). Normal vücut ısısında (37 °C) spermatogenezisin bozulduğu bilinmektedir (2, 4). Hafif bir ısı artışı, olgun sperm hücrelerinin hızlı bir şekilde kaybı ile sonuçlanır (5).

Spermatogenezis, birçok hücrel faktörlerin eşlik etmesi ile gerçekleşen kompleks bir olay olmakla birlikte kimyasal ajanlara ve çevresel faktörlere karşı çok hassastır. Son zamanlarda bazı yaşam tarzı özellikleri artmış skrotal ısıya neden olarak erkek üreme fonksiyonunu etkilemektedir. İnsanlarda skrotal ısının artışı mesleki maruziyet, yaşam tarzı ve klinik vakalardan (örneğin kriptorşidizm) kaynaklanır (3).

Skrotal ısının yükselmesi ratlarda (6), farede (7) ve insanlarda (3) testis ağırlığının azalmasına, spermlerin morfolojilerinin, hareketliliğinin bozulmasına ve canlılığının azalmasına sebep olur. Germ hücrelerinin kaybı fertilitiyi azaltır. Normal testiküler fonksiyonun devamı bir seri kompleks endokrin ve mekanik etkileşime bağlıdır (8).

Sperm üretiminin başlaması ve gelişiminin devamı için Leydig hücrelerinden testosteronun sentezlenmesi gerekmektedir (9).

Leydig hücreleri sıcaklık stresine hassastır. Leydig hücrelerinin fizyolojik fonksiyonu olan erkek seksüel steroidleri üretme, sıcaklıkla birlikte azalmaktadır (10). Ratlarda yapılan çalışmalarda testosteron eksikliğinde testislerde apoptozisin gerçekleştiği görülmüştür (11). Erkek infertilisinde, Leydig hücrelerinin fonksiyonlarının zarar görmesi önemli bir sebeptir.

İnsanlar tedavi veya tatil amaçlı su sıcaklığı oldukça yüksek olan termal kaplıcalara gidebilmektedirler. Spermatogenezisi etkileyen stres faktörlerinden biride termal strestir (12).

Sauna veya sıcak banyoların sebep olduğu testiküler ısı artışıda spermatogenezisi bozabilmektedir (13).

Ülkemizde oldukça yaygın alternatif tıp yöntemlerinden biri olan kaplıca tedavilerinde, çağdaş bilimsel araştırmalara ve çağdaş bilimsel değerlendirmelere gereksinim vardır. Vücut ısısından çok daha yüksek derecedeki su sıcaklığının, testisler üzerine etkileri ayrıca ısının, sperm üretimi ve olgunlaşması için gerekli olan testosteronu üreten Leydig hücrelerinin morfolojilerine etkileri, bilimsel ilgi alanı olmayı sürdürmektedir.

Bu çalışmada; skrotal hipertermi uygulanmış sıçanların, spermatogenezis için gerekli olan testosteronu üreten Leydig hücrelerinde, kısa ve uzun dönemde gözlenen morfolojik değişiklikleri ışık ve elektron mikroskobik olarak ortaya koymayı amaçladık.



## **GENEL BİLGİLER**

### **HİPERTERMİ VE FERTİLİTE**

Hipertermi vücut sıcaklığının anormal derecede yükselmesi olarak adlandırılır. İnsanlardaki normal vücut sıcaklığı 37 °C dir. Bu değerin 38.9 °C derecenin üstüne çıkması ve belirli bir süre bu değerde kalması fertilitate açısından çeşitli sorunlara neden olabilir. Hipertermi enfeksiyonlar, sıcak banyolar, egzersiz, sauna gibi nedenlere bağlı olarak gelişebilir (14). Testiküler fonksiyon ısıya bağımlıdır ve vücut ısısından birkaç daha aşağıdadır (1-3). Yapılan çalışmalarda hiperterminin spermatogenez üzerine yaptığı etkiler gösterilmiştir. Genel, skrotal ve testiküler ısının arttırılması ile sperm sayısında, morfolojik ve hareketlilikleri açısından spermatazoonların yüzdesinde azalma tespit edilmiştir (15). Hipertermi testislerde germ hücre kayıplarına neden olur. Testislerdeki germ hücre kaybı fertilitateyi düşürür (16).

### **TESTİSİN HİSTOLOJİSİ**

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşur. Testisin başlıca iki görevi hormon ve spermatazoon üretmektir. Testiste üretilen başlıca hormon testosterondur. Testosteron spermatogenez, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü için önemlidir (17).

Testisler semen üreten parenşimli organlardır. Funiculus spermaticus'la asılı olarak skrotum içinde bulunurlar. Fetal hayatta testisler karın boşluğu içindedirler. Doğumdan sonra canalis inguinalis'ten geçerek (descensus testis) skrotuma inerler (18).

Testisler, lobuli testis denilen lobüllere ayrılırlar. Bu lobüller konik şekillidir. Mediastinuma doğru daralırlar, 400 tanedirler. Mediastinum, damarları ve ductusları destekler. Her lobülde bir veya birkaç kıvrılmış tubuli seminiferi contorti bulunur. Bunlar 60 cm uzunluğunda ve 150-250 mikrometre çapındadır. Bu tubuliler mediastinuma girerken birleşerek tubuli rectileri yaparlar. Sayıları 20-30 tanedir. Onlarda birleşerek rete testis denilen plexus'u yaparlar (18).

Rete testisten çıkan 10-12 duktuli efferentesten tunica albugineayı delerek kaput epididimise girer. Testisin arka kenarına funikulus tutunmuştur. Arka kenarın yan kısmına bağlanmış olarak epididimis bulunur (18).

Seminifer tübül fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Seminifer epitelde iki tip hücre vardır. Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenetik seriyi oluşturan hücreler. Spermatogenik seri hücreler 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir; işlevleri spermatozoonları üretmektir. Spermatozoon üretimi spermatogenez olarak adlandırılır. Bu süreç, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri içerir ve hücreler sonunda spermatozoonlara farklılaşır; bu aşama spermiyogenez olarak adlandırılır (17).

Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemlidir. Testisler de seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, kan ve lenf damarlarıyla doldurulmuştur. Bağ dokusu çeşitli tipte hücre içerir, bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Ergenlikte işlevsel olarak belirgin hale gelen Leydig hücreleri interstisyel dokuda bulunur. Bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gerçekleşmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler (17).

## **LEYDIG HÜCRELERİNİN GELİŞİMİ**

İnterstisyel Leydig hücreleri, gonadal kabarıklığın orijinal mezenşiminden köken alırlar (19-21). Memelilerdeki Leydig hücreleri en az iki farklı tip içerirler. Fetal tip Leydig hücreleri, fetal ve neonatal yaşam boyunca erkeğe ait primer seks karakterlerinin oluşmasından sorumludur. Bunları pubertal erkeğe ait özelliklerden sorumlu yetişkin tip Leydig hücrelerinin oluşması takip eder (22).

Fetal Leydig Hücrelerinin Gelişimi; ilk fetal Leydig hücreleri, testisin şekillenmesini takiben nispeten daha geç farklılaşırlar. Erkek gonadlardan ilk olarak açık bir şekilde tanımlanabilecek olan yapı histolojik kesitlerden de görülebilen seminifer tübüllerdir. İlk Leydig hücreleri fetal testisin bu gelişim basamağından sonra görülür (23).

Ratlarda seminifer tübüller 13. günde şekillenir. Aynı zamanda germ hücrelerinin etrafında ve onları çevreleyen büyük yeni tip hücreler (sertoli hücre öncülleri) ortaya çıkar (23, 24). Bu, gonadın anterior bölgesinde başlar ve gonadın içine girinceye kadar genişleyerek devam eder ve 24 saatte sonuçlanır. Aynı zamanda bazal membran spermatik kordların etrafında kademe kademe şekillenir. Daha sonra Leydig hücreleri mezenşimal hücrelerden farklılaşarak interstisyel alanda 15.5 günde görülürler. Bu hücreler steroid üreten hücrelerin ultrastrüktürel yapısını gösteren; tübüler krsitalı büyük mitokondriler, lipid damlacıkları ve düz endoplazmik retikulum (DER) içerirler (24). Fetal rat testisleri testosteron üretmeye in vivo ve in vitro her iki durumda da 15.5 günde başlar (25). Fetal rat testislerinin gelişebilmesi luteinizan hormonun (LH) bağlanması ile olur ve bu hormona cevap 14.5 gün ile 15.5 gün arasında olur. Aynı zamanda testosteron sekresyonunda başlar (26).

Fetal Leydig hücreleri doğumdan sonraki ilk ve ikinci postnatal hafta boyunca azalır (27). Fetal Leydig hücrelerine postnatal 2. haftadan sonra ne olduğu net olarak bilinmemektedir. Histolojik ve ultrastrüktürel gözlemlerden bunların dejenere olarak yetişkin tip Leydig hücrelerine dönüştüğü (28) veya postnatal yaşam boyunca özel bir grup olarak kaldığı ileri sürülmektedir (29).

Yetişkin Leydig Hücrelerinin Gelişimi; ratlarda, yetişkin tip Leydig hücreleri postnatal 10. gün dolaylarında görülürler ve 15. günden itibaren pubertenin sonuna kadar (56.gün) artmaya devam ederler. Leydig hücreleri mezenşimal hücrelerden şekillenirler fakat bunlar bir önce meydana gelen Leydig hücrelerinden farklıdırlar (30). Leydig hücrelerinin sayıca artışı LH ve folikül stimulan hormon (FSH) kontrolü altındadır (31).

## **LEYDIG HÜCRELERİNİN HISTOLOJİSİ**

Memelilerde Leydig hücreleri interstisyel alanda düzensiz şekilde seminifer kordların etrafında bulunurlar. Burada kan damarları, lenfatik, çeşitli hücresel elementler ve makrofajlar bulunur. Leydig hücreleri kan veya lenf damarlarının etrafında kümeler oluştururlar (22, 32).

Leydig hücreleri poligonal şekilli ve yaklaşık olarak 15 µm çapında olan hücrelerdir. Bunlar tek nukleus ve 1-2 nukleolus içerirler. İnsanların interstisyel hücrelerine spesifik olarak, sitoplazmalarında Reinke kristalleri olarak adlandırılan proteinler bulunur (33).

Genellikle komşu Leydig hücreleri arasında 150-200 Å kalınlığında plazma membranı bulunur. Bununla beraber sık sık intersellüler alanda 20 Å kalınlığındaki darlıklarda gap junctionlar gözlenir (22). Birçok steroid üreten hücre gibi, Leydig hücreleri lipit damlacıkları, karakteristik tübüler kristal mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş düz endoplazmik retikulum içerirler.

Puberteden sonra, bir siklik adenosin monofosfat (cAMP)-aracılı mekanizma tarafından LH ile uyarılmanın ardından, Leydig hücreleri, 5 $\alpha$ -redüktaz enzimi ile dihidrotestosteron'a dönüştürülebilir, testosteron üretirler (34). Hücreler sentezledikleri testosteron hormonunu, birlikte buldukları kan veya lenf kapillerlerine boşaltarak endokrin sekresyon yaparlar (35). Serumda bulunan testosteronun yaklaşık %95'i (seks hormon-bağlayıcı globulin, SHBG ve diğer proteinlere tutunmuş halde) Leydig hücreleri tarafından sentezlenir; kalan testosteron adrenal korteks tarafından üretilir.

Leydig hücre toplulukları, tübüller arası alanda, kan damarları ve lenfatik sinüzoidlerle yakın ilişkide bulunmaktadır. Steroid üreten tüm hücreler gibi, Leydig hücreleri bolca; lipit damlacıkları, DER, tübüler kristal mitokondriyonlara sahiptir.

Steroidogenik akut regülatör protein (StAR) dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana kolesterolü taşıyarak steroid sentezini ayarlar. Adrenal ve gonadal steroidlerin sentezinin bozuk olduğu (lipoid konjenital adrenal hiperplazi) kişilerde, StAR'ı kodlayan gende bir mutasyon belirlenmiştir.

Leydig hücre fonksiyonu ön hipofizden iki hormonu ile ayarlanır: LH, testosteron üretimini uyarırken, prolaktin LH reseptör ekspresyonunu başlatır.

Testosteron, spermatogenez, erkek libidosunu ve erkek aksesuar bezlerinin (prostat ve seminal vezikül) fonksiyonlarını sürdürür (34).

## **LEYDIG HÜCRELERİNDE STEROİDOGENEZİS**

Testosteron Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında bulunan lipit damlacıklarındaki kolesterolden sentezlenir. Steroid üreten hücrelerde bol miktarda bulunan peroksisomlar, kolesterolün biyosentezinde ve metabolizmasında kullanılır (36). Leydig hücrelerinden testosteron üretimi peroksisomlarla pozitif korelasyon gösterir (37).

Bütün steroid hormonlar için kolesterol substrat özelliği taşıyıcı ve hücrestoklardan (örneğin lipit damlacıkları veya plazma membranı gibi) Protein Kinaz A (PK-A) aracılığı ile mitokondrinin dış zarına taşınır. Kolesterolün mitokondrinin dış zarından iç zarına

taşınmasında 2 taşıyıcı protein vardır: 1- StAR, 2- Periferel-Tip Benzodiazepine Reseptör (PBR) (38).

Steroidogenik akut regülatör protein (StAR) sıçan, fare, koç ve insanların gonad ve adrenal bezlerinde akut steroid üretiminin düzenlenmesinden sorumludur (38). StAR steroid yapıdaki hormonların sentezindeki ilk basamakta kolesterolün mitokondrinin dış zarından iç zarına taşınmasında gereklidir (39). StAR geninin düzenlenmesi nuklear reseptör steroidogenik faktöre bağlıdır. StAR genindeki bir mutasyon lipoid konjenital adrenal hiperplaziye sebep olur ki bu da hastaların steroid üretememeleri ile sonuçlanır (39).

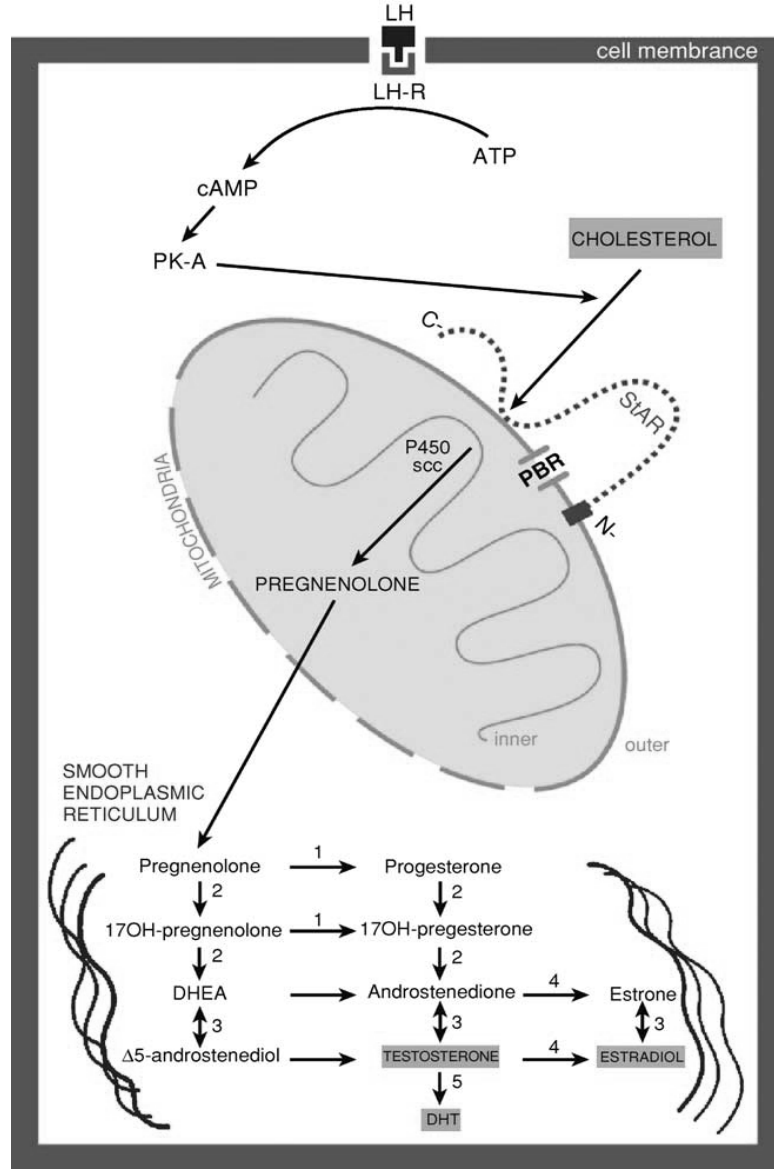
Periferel-Tip Benzodiazepine Reseptör (PBR) kolesterolün mitokondrinin dış zarından iç zarına taşınmasını sağlayan mitokondrial bir proteindir. PBR'ünün moleküler işleyişinde kolesterol için bir kanal görevi gördüğü ileri sürülür. PBR geninin hasar görmesi kolesterolün taşınmamasına sebep olur (40).

Steroidogenesis kolesterolün enzimatik aktivite ile pregnenolana çevrilmesi ile başlar. Bu reaksiyon, kolesterolün yan zincirinin kırılması, mitokondri iç zarının matriksinde bulunan P-450<sub>scc</sub> enzim sistemi ile katalize edilir. Pregnenolan daha sonra DER zarına taşınır. DER pregnenolanun testosterona çevrilmesinde gerekli olan birçok çeşit hidroksisteroid dehidrogenaz (HSD) enzimleri içerir (36).

Hidroksisteroid dehidrogenaz (HSD) Leydig hücrelerinde steroidogenesis için gerekli olan enzimlerdendir (41). 3 $\beta$ -HSD, 17 $\alpha$  hidroksilaz ve 17 $\beta$ -HSD steroid sentezi için gereklidirler. 11 $\beta$ -HSD, 3 $\alpha$ -HSD, 5 $\alpha$  redüktaz steroid sentezinin içinde yer alırlar.

3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz, Leydig hücrelerinde testosteron üretiminde gerekli olan anahtar enzimdir (42). 11 $\beta$ -HSD, postnatal dönemde Leydig hücrelerinin sayıca artışında, testis ağırlığının artışında, intrasellüler membran yüzeylerinin artışında ve Leydig hücrelerindeki testosteron salınımı ile korelasyon gösterir (43).

Leydig hücrelerinde steroidogenesis; LH 'ın LH reseptörüne bağlanması ile adenzin trifosfat (ATP)'tan cAMP sentezini uyarır. Kolesterolün sitoplazmadan mitokondriye taşınmasında gerekli olan PK-A'yı cAMP aktifleştirir. StAR ve PBR kolesterolü mitokondrinin dış zarından içzarına, P450<sub>scc</sub> enzim sisteminin bulunduğu yere taşır. StAR'ın N ucu mitokondrinin dış zarına bağlanır. PBR' nin fonksiyonu kolesterol için bir kanal görevi görmektir. P450<sub>scc</sub> kolesterolü pregnenolona çevirir ve pregnenolon hemen testosteronun sentezinin meydana geleceği DER'a taşınır (DHEA, Dehidroepiandrosteron; DHT, Dihidrotestosteron. Reaksiyon 1, 3 $\beta$ -HSD; Reaksiyon 2, sitokrom P450 17 $\alpha$  hidroksilaz; Reaksiyon 3, 17 $\beta$ -HSD; Reaksiyon 4, sitokrom P450 aromataz; Reaksiyon 5, 5 $\alpha$ -redüktaz), (Şekil 1).



**Şekil 1. Leydig hücrelerinde steroidogenezis (39, 44).**

Yetişkin Leydig hücreleri androjen üretirler. Androjenler yetişkin Leydig hücrelerinin otokrin kontrolüne katılırlar. Shan ve ark. (45) androjen reseptörlerinin özellikle prepubertal dönemde Leydig hücrelerinde nükleus içinde lokalize olduklarını rapor etmişlerdir. Shan ve ark. (45) göre Leydig hücreleri puberte boyunca androjene maksimum hassastır. Shan ve ark. (46) göre androjenler immatur yetişkin Leydig hücrelerde androjen reseptör seviyelerini maksimum düzeyde uyarırken matur yetişkin Leydig hücrelerinde çok etkili değildirler. Androjenlerin yetişkin Leydig hücrelerinin farklılaşmasının başlaması için gerekli olduğuna dair birçok güçlü kanıt vardır (47). Antiandrojen ile tedavi sonucunda yetişkin Leydig hücrelerinde hipertrofi, golgi aparatının genişlemesi, mitokondri sayısında artış ve mitokondri dejenerasyonu görülür (48).

Erkek gonadları androjenleri östrojenlere çevirebilirler. Geriye dönüşün olmadığı bu çevrilmeden sorumlu olan enzime sitokrom P450 aromataz (P450arom) adı verilir (49). Bu enzim omurgalılarda steroid üreten hücrelerin endoplazmik retikulumunda bulunur. P450arom ratlarda olgun ve olgun olmayan Leydig hücrelerinin yanısıra sertoli hücrelerinde de bulunur. Domuz, koç ve insanlarda ise bu enzimler Leydig hücrelerinde bulunur (49). Leydig hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinde östrojenlerin rolleri olduğuna dair bir çok çalışma vardır. Carreau ve ark. (50) P450arom enziminin Leydig hücrelerinde ve spermatidlerde lokalize olduklarını bildirmişlerdir. Yetişkin Leydig hücrelerinde P450arom enziminin düzenlenmesi ve aktivitesi, LH ve steroid kontrolü altındadır. Seminifer tübüldeki bazı parakrin faktörlerde bunların içinde yer alır, germ hücreleri leydig hücrelerinden P450arom enziminin üretilmesinde rol alırlar (51). Leydig hücrelerinin iki tane östrojen reseptörü altünitesi (ER) vardır. Bunlar ER $\alpha$  ve ER $\beta$  olarak adlandırılırlar. Bunların testosteronu 17 $\beta$ -estradiole çevirme kapasiteleri vardır. Leydig hücreleri östrojene maruz kalırlar. Bu maddeler, çevresel ajanlarda dahil, Leydig hücrelerinin gelişimine ve fonksiyonlarına zıt etkiye, fertilitiyi bozmaya sebep olurlar (41).

Anti-Müllerian Hormon (AMH), Transforming Growth Faktör  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ailesinden bir glikoproteindir. AMH, fetal ve prepubertal dönemler boyunca Leydig hücrelerinde steroidogeneze etki eder. TGF- $\beta$  ailesinin diğer üyeleri gibi AMH' ında fetal ve prepubertal dönemler boyunca testiküler steroidogenik fonksiyon üzerine otokrin/parakrin etkiye sahip olduğu görülür (52). Steroidogenezis üzerindeki bu etkilerden Leydig hücrelerindeki AMH reseptörleri sorumludurlar (53).

Tiroit hormonu mezenşimal hücre öncüllerinin proliferasyonuna sebep olur ve onların Leydig hücre öncüllerine farklılaşmasını hızlandırır. Bu farklılaşmayı hızlandırırken aynı zamanda yeni Leydig hücrelerin şekillenmesini artırır. Tiroit bezinin hipofonksiyonunda veya hiperfonksiyonunda Leydig hücre proliferasyonu etkilenir (54).

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nde üretilen, 3 aylık, ağırlıkları 290-360 gr arasında değişen 49 adet Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip deneklerimizden, her biri 7 sıçan içeren, 1'i kontrol 6'sı deney grubu olmak üzere toplam 7 grup oluşturuldu. Deney süresi boyunca, tüm deneklerimiz, optimum laboratuvar koşulları ( $22\pm 1$  °C, 12 saat aydınlık/karanlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi.

Çalışmamızda deneklerin skrotumuna sıcak su uygulanması amacı ile deney grubu için sıcaklığı 43 °C ye ayarlanmış ve kontrol grubu için ise sıcaklığı 22 °C ye ayarlanmış benmari kullanıldı. Gruplar Tablo 1 de görüldüğü gibi oluşturuldu. Skrotal hipertermi oluşturmak amacı ile deney grubuna ait ratların skrotumları, 43 °C ye ayarlanmış benmaride 6 gün boyunca her gün 30 dakika, kontrol grubuna ait ratların skrotumları ise 22 °C ye ayarlanmış benmari içinde 6 gün boyunca her gün 30 dakika süre ile tutuldu. (56, 57).

Deneyde kullanılan tüm deneklerin başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları çalışma sırasında tartıldı (Tablo 2).



**Tablo 1. Deney grupları.**

<b>Gruplar</b>	<b>Uygulama Süresi</b>
<b>Kontrol (n=7)</b>	22 °C / 6 Gün / 30 dk
<b>Hipertermi sonrası 1. gün (n=7)</b>	43 °C / 6 Gün / 30 dk
<b>Hipertermi sonrası 14. gün (n=7)</b>	43 °C / 6 Gün / 30 dk
<b>Hipertermi sonrası 35. gün (n=7)</b>	43 °C / 6 Gün / 30 dk
<b>Hipertermi sonrası 70. gün (n=7)</b>	43 °C / 6 Gün / 30 dk
<b>Hipertermi sonrası 105. gün (n=7)</b>	43 °C / 6 Gün / 30 dk
<b>Hipertermi sonrası 140. gün (n=7)</b>	43 °C / 6 Gün / 30 dk

Bütün deneklerin sakrifikasyon zamanları aynı güne denk getirilerek 50 mg/kg ketamin-xylazine anestezisi altında, her iki testis biyopsi materyali olarak alındı. Alınan testilerin ağırlıkları tartıldı (Tablo 2) ve bu materyaller ışık ve elektron mikroskopik gözlemlerimiz için işlemlendirildi.

### **IŞIK MİKROSKOBİK İNCELEME**

Işık mikroskopik incelemeler için testis materyalleri, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Işık Mikroskopi Laboratuvar'ında işlemlendirildi. Bu amaçla testis dokuları Bouin fiksatoründe 4 gün fikse edildikten sonra yıkama işlemine geçildi. Dokular 2 gün %70'lik alkolde yıkanarak, dehidratasyon işlemine geçildi. Dokular artan alkol serilerinde (%70, 90, 96, 100) 1'er saat tutuldu. Dehidratasyon aşamasından sonra saydamlaştırma basamağı için dokular 3 seri 15'er dakika toluol ile muamele edildi. Gömme işleminden önce dokular yumuşak parafinde 1 gece tutuldu. Bir sonraki gün testis dokuları yumuşak parafinden alınarak 1 saat sıvı sert parafinde tutularak, bloklandı. Bu bloklardan alınan 6µm kalınlığındaki kesitlere Hematoksilen+Eosin (H+E) boyası uygulandı. Işık mikroskopunda (Olympus CX31-Japan) Leydig hücrelerinin fotoğrafları çekildi.

### **İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEME**

İmmunohistokimyasal boyama için Kus ve ark. (58) ın kullandığı yöntem uygulandı. Bu amaçla testis dokusundan 6 µm kalınlığında kesitler alındı ve deparafinizasyon işlemi takiben kesitler suya indirildi. Daha sonra Fosfat Buffer Solusyonuna (PBS; pH 7.6) alınan

kesitler, antijen retrieval içinde mikrodalga fırında 15 dakika kaynatıldı. Bu aşamadan sonra hidrojen peroksidad aktivitesinin giderilmesi için %3'lük hidrojen peroksit ile 5 dakika muamele edildi. Distile su içinde çalkalanarak kesitler PBS ile yıkandı. Spesifik olmayan boyamanın önüne geçmek amacıyla öncelikle kesitler %1 preimmün rabbit serum ile inkübe edildi. Daha sonra kesitler 23 °C de nemli chamber içinde testosteron monoklonal antikoru (Bio-Genex, San Ramon CA, USA) ile 1 saat süre ile inkübe edildi. Antikorum bağlanabilmesi için biotin-streptavidin yöntemi (Bio-Genex, San Ramon CA, USA) ile 3-amino 9 etil karbazol (AEC), (Dako carpinteria CA, USA) kromojen olarak kullanıldı. Kesitlere Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama uygulandı.

Sitoplazmalarında testosteron bulunan Leydig hücreleri, immünohistokimyasal yöntemlerle boyandı. Leydig hücrelerinin sayımı için; Olympus marka BX 51 model mikroskoba uyumlu 100 kare oküler mikrometre kullanıldı. İnterstisyel alanlardan, rasgele belirlenen 10 alanda 40'luk objektif büyütmesinde, 100 kare içerisine düşen birim alandaki immün pozitif olan hücreler sayıldı (59). Her grup için seri kesitlerin sayılması ile elde edilen rakamların aritmetik ortalaması alındı. Böylece 100 kare oküler mikrometrenin kapsadığı alandaki ortalama Leydig hücre sayısı saptandı. Mikrometrik lam yardımı ile 40'luk objektif büyütmesi için 100 kare oküler mikrometrenin alanı belirlendi. Bu hesaplama sonucunda grup başına 625  $\mu\text{m}^2$ 'deki ortalama Leydig hücre sayısı tespit edildi. Sayılan hücreler Tablo 3 de gösterildi.

Çalışmamızda verilen istatistiksel analizleri, Leydig hücre sayımı ve ağırlık takip sonuçları Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Anlamlı fark bulunan gruplar arasındaki karşılaştırmalar için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. Fark,  $P < 0.05$  olduğunda anlamlı kabul edildi.

## **ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME**

Elektron mikroskobik incelemeler için;

- |  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. Glutaraldehit (pH'sı 7.3, % 2.5'luk ) | 1.5 saat Prefiksasyon |
| 2. Fosfat tamponu                        | 1 gece                |
| 3. OsO4 (% 1'lik)                        | 1 saat Postfiksasyon  |
| 4. Fosfat tamponu                        | 15 dakika (dk) Yıkama |

## 5. Dehidratasyon

% 50	10 dk
% 70	10 dk
% 90	10 dk
% 96	10 dk
% 100	20 dk
% 100	20 dk
% 100	20 dk

## 6. Propilen oksit (Saydamlaştırma)

Propilen oksit I	20 dk
Propilen oksit II	20 dk
Propilen oksit III	20 dk

## 7. Propilen oksit + araldit (İnklüzyon)

3 hacim Propilen oksit + 1 hacim Araldit	1 saat
1 hacim Propilen oksit + 1 hacim Araldit	1 saat
1 hacim Propilen oksit + 3 hacim Araldit	1 gece

## 8. Saf aralditte bekletme

1 saat

## 9. Kapsüle gömme, etiketleme

## 10. 45 C'lik etüvde 1 gün, 60 C'lik etüvde 2 gün bekletme.

Blokların kesim bölgelerini belirlemek amacıyla, yarı ince kesitler alınarak (RMC-MTX Ultramikrotom-Amerikan), azur mavisıyla boyandı. Belirlenen bölgelerden 40-60 nm kalınlığında ince kesitler alınıp, kesitler uranil asetat ve kontrastı artırmak amacı ile Reynold'un kurşun sitrat boyaları ile boyandı. Bu kesitler Jeol 1010 elektron mikroskobunda incelenerek, bulgular fotoğraflandırdı.

## **BULGULAR**

### **AĞIRLIK TAKİBİ SONUÇLARI**

Kontrol ve deney gruplarına ait deneklerin başlangıç ve bitiş vücut ağırlıkları ile testis ağırlıklarının karşılaştırması Tablo 2 de gösterilmiştir. Vücut başlangıç ve bitiş ağırlıkları değerlendirildiğinde hipertermi sonrası 1. gün dışındaki diğer gruplarda ki deneklerin ağırlıklarının kontrole oranla arttığı görüldü ( $P < 0.05$ ).

Kontrole göre kıyaslandığında, tüm deney gruplarında testis ağırlıklarında azalma olduğu, en az azalmanın hipertermi sonrası 1.gün grubunda olduğu görülürken ( $P < 0.05$ ), en yüksek düşüşün hipertermi sonrası 105. gün grubunda olduğu görüldü ( $P < 0.0001$ ). Hipertermi sonrası 35, 70 ve 140. gün gruplarında ise testis ağırlıklarının kontrole oranla aynı oranlarda azaldığı tespit edildi ( $P < 0.001$ ).

**Tablo 2. Kontrol ve deney gruplarına ait vücut ve testis ağırlıkları.**

Gruplar	Başlangıç Vücut Ağırlığı (g, n=7)	Bitiş Vücut Ağırlığı (g, n=7)	Tek Testis Ağırlığı (g, n=7)
Kontrol	312±13	314±14	1.874±0.10
Hipertermi sonrası 1. gün	328±15	335±18	1.757±0.09 <sup>†</sup>
Hipertermi sonrası 14. gün	320±16	360±21 <sup>*</sup>	1.315±0.07 <sup>‡</sup>
Hipertermi sonrası 35. gün	315±13	345±19 <sup>*</sup>	0.786±0.06 <sup>§</sup>
Hipertermi sonrası 70. gün	340±18	368±22 <sup>*</sup>	0.779±0.05 <sup>§</sup>
Hipertermi sonrası 105. gün	330±17	355±20 <sup>*</sup>	0.696±0.04 <sup>  </sup>
Hipertermi sonrası 140. gün	333±17	345±19 <sup>*</sup>	0.767±0.05 <sup>§</sup>

\*p<0.05 kontrolle kıyaslandığında.

†p<0.05 kontrolle kıyaslandığında.

‡p<0.01 kontrolle kıyaslandığında.

§p<0.001 kontrolle kıyaslandığında.

||p<0.0001 kontrolle kıyaslandığında

## **KONTROL GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

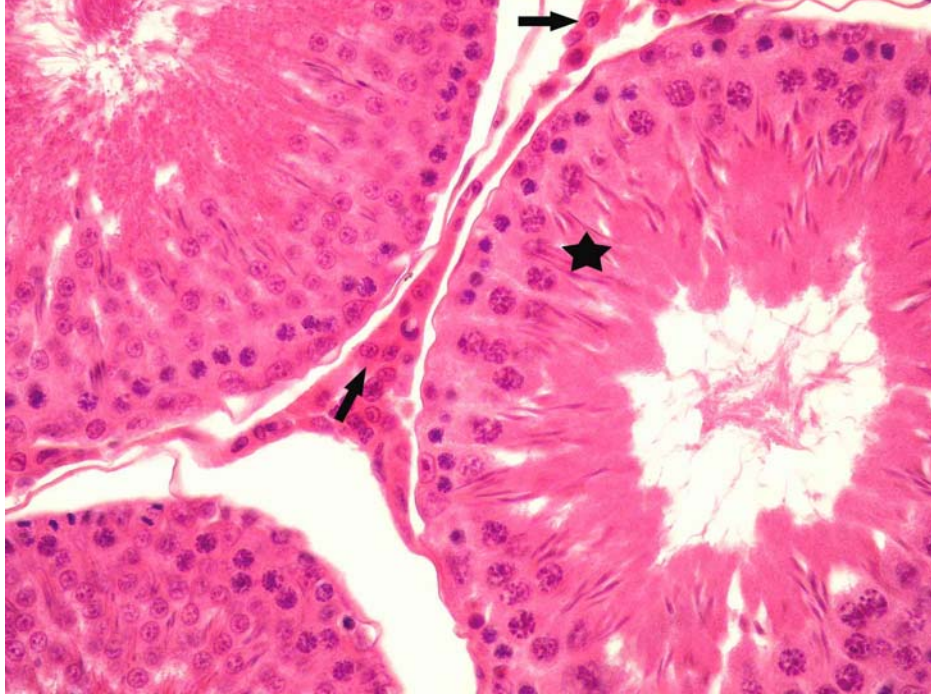
### **Işık Mikroskopik Bulgular**

Kontrol grubuna ait deneklerden alınan ve rutin H+E ile boyanan testis doku kesitleri incelendiğinde, seminifer tübül sınırlarının düzgün olduğu, seminifer tübüllerde germ hücrelerinin düzenli dizildikleri tespit edildi. İnterstisyel doku ve bu alandaki Leydig hücrelerinin normal histolojik yapıda oldukları görüldü. Çoğunlukla poligonal şekilli olan Leydig hücreleri, düzgün yuvarlağa yakın oval biçimli çekirdeği ve normal sınırlar içinde eozinofilik boyanan sitoplazması ile ayırt edildi (Resim 1).

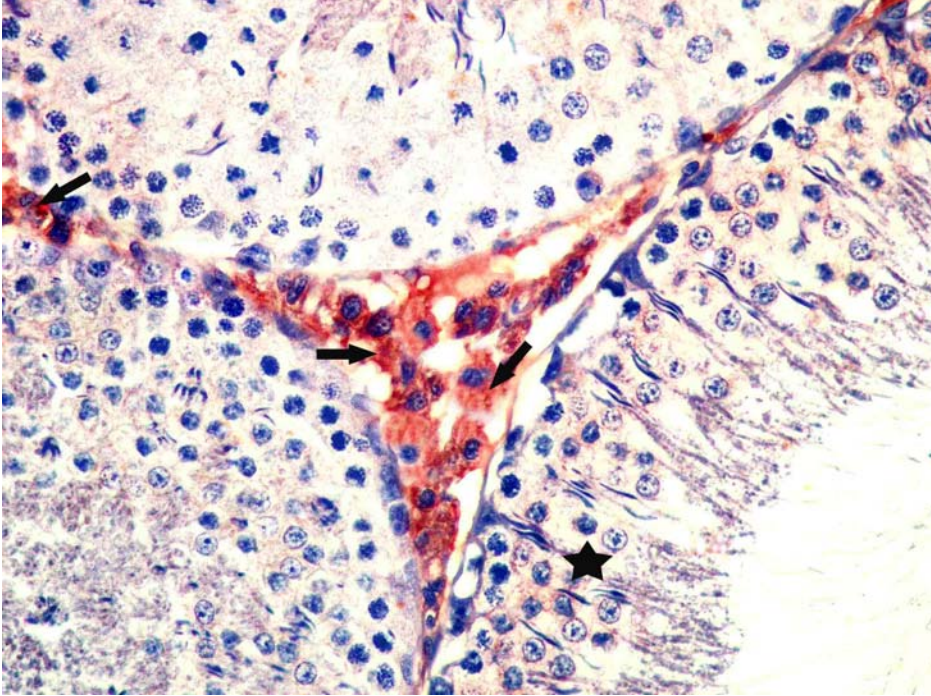
Kontrol ve deney gruplarının testis kesitlerine uygulanan immünohistokimyasal boyama sonucunda testosteron pozitif Leydig hücreleri değerlendirildi (Tablo 3). İmmün pozitif reaksiyon veren Leydig hücrelerinin sayımında en yüksek değer kontrol grubunda olduğu görüldü. Kontrol grubuna ait Leydig hücrelerinin kuvvetli immün reaksiyon verdiği görüldü (Resim 2).

## **Elektron Mikroskopik Bulgular**

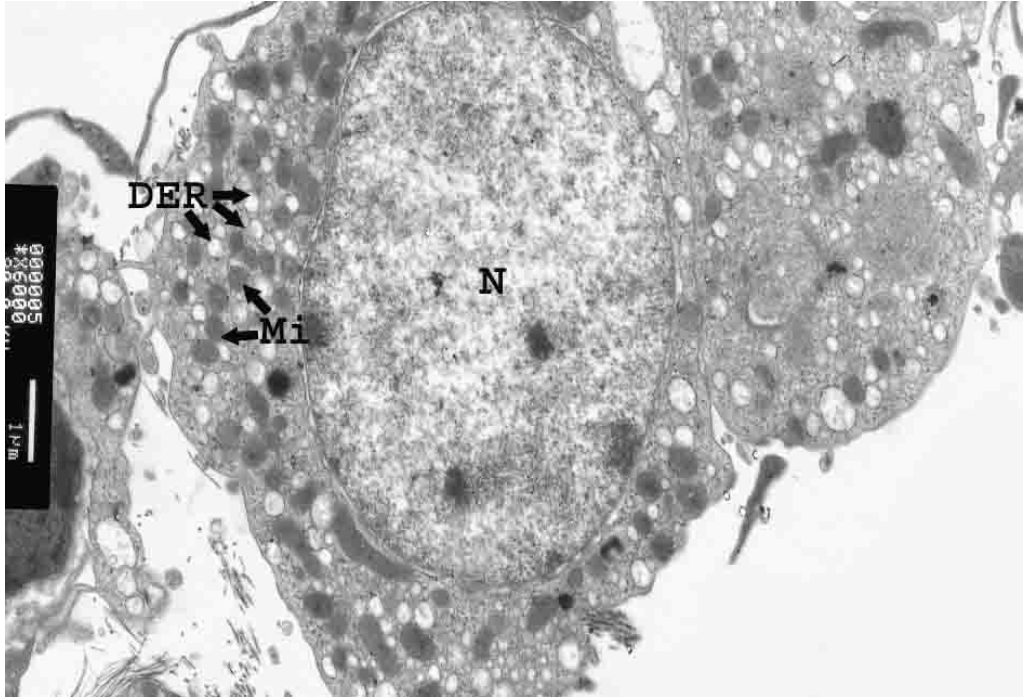
Kontrol grubu deneklerde yapılan incelemede; Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında tübüler kristal mitokondriler ve aktif DER sisternaları normal yapıları ile ayırt edildi. Ökromatin yapıdaki nukleusun oldukça düzenli, yuvarlağa yakın oval biçimli olduğu, kromatin materyalinin ise homojen dağıldığı izlendi (Resim 3).



**Resim 1.** Sınırları düzgün seminifer tübüllerde, düzenli dizilim gösteren germ hücreleri (\*) görülmekte. İnterstisyel sahada yerleşmiş olan poligonol şekilli Leydig hücrelerinin (→) oval biçimli nükleusu ve eozinofilik boyanan sitoplazması dikkati çekmekte. H+E, X400.



**Resim 2.** İnterstisyel sahada kuvvetli immünreaktivite gösteren testosteron pozitif Leydig hücreleri (→) ve seminifer tübüllerde düzenli dizilim gösteren germ hücreleri (\*) görülmekte. İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, X400.



**Resim 3.** Ökromatin yapıda, oval nükleuslu (N) Leydig hüresinin sitoplazmasında tübüler kristalî mitokondriler (Mi) ve aktif haldeki DER sistemaları (DER) dikkati çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X6000.



## **HİPERTERMİ SONRASI 1. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

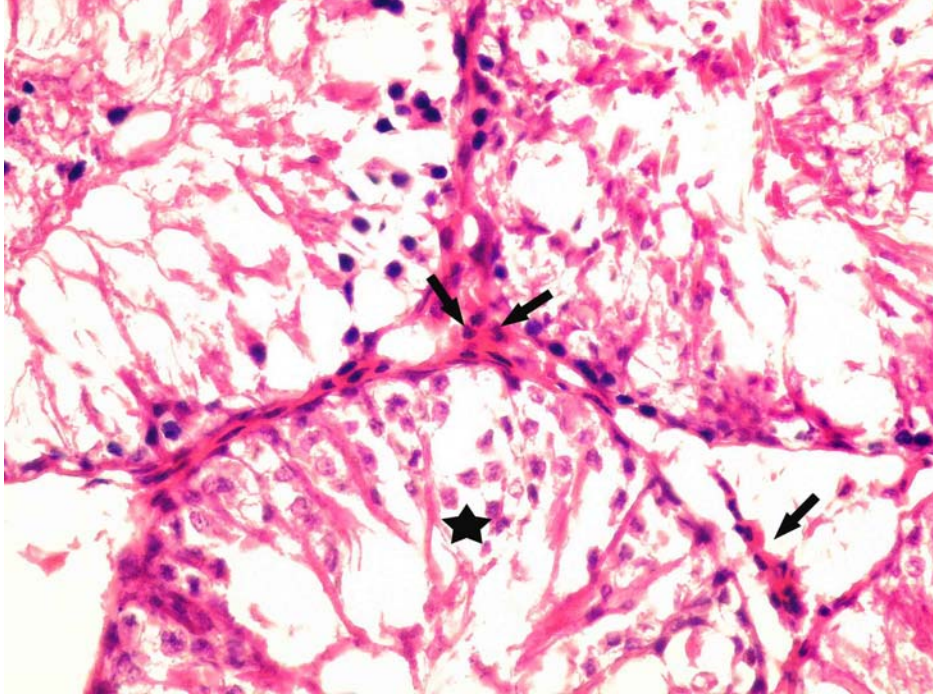
### **Işık Mikroskopik Bulgular**

6 gün hipertermi uygulamasını takiben 1 gün sonra alınan ve rutin H+E ile boyanan testis doku kesitleri incelendiğinde, seminifer tübül sınırları düzgün olmasına rağmen, tübüllerde sertoli hücrelerinin uzantıları arasında germ hücre diziliminin bozulduğu ve spermatogenik seriye ait birkaç hücrenin mevcudiyeti dikkati çekti. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinin normal histolojik yapılarının bozulduğu, sitoplazmalarında kayıpların ve çekirdek yapılarında ise düzensizliklerin olduğu izlendi (Resim 4).

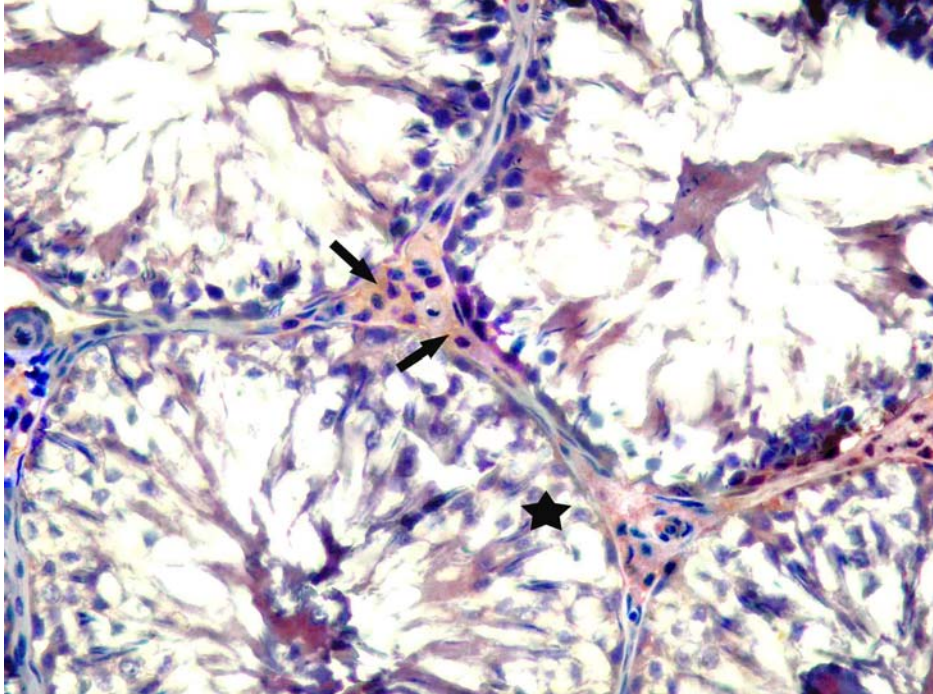
Hipertermi sonrası 1. gün grubunda immün pozitif hücrelerin sayısının oldukça azaldığı ve immünohistokimyasal olarak boyanan birkaç Leydig hücresinin de kontrol grubuna oranla çok zayıf immün reaksiyon verdiği izlendi ( $P<0.0001$ ), (Resim 5).

### **Elektron Mikroskopik Bulgular**

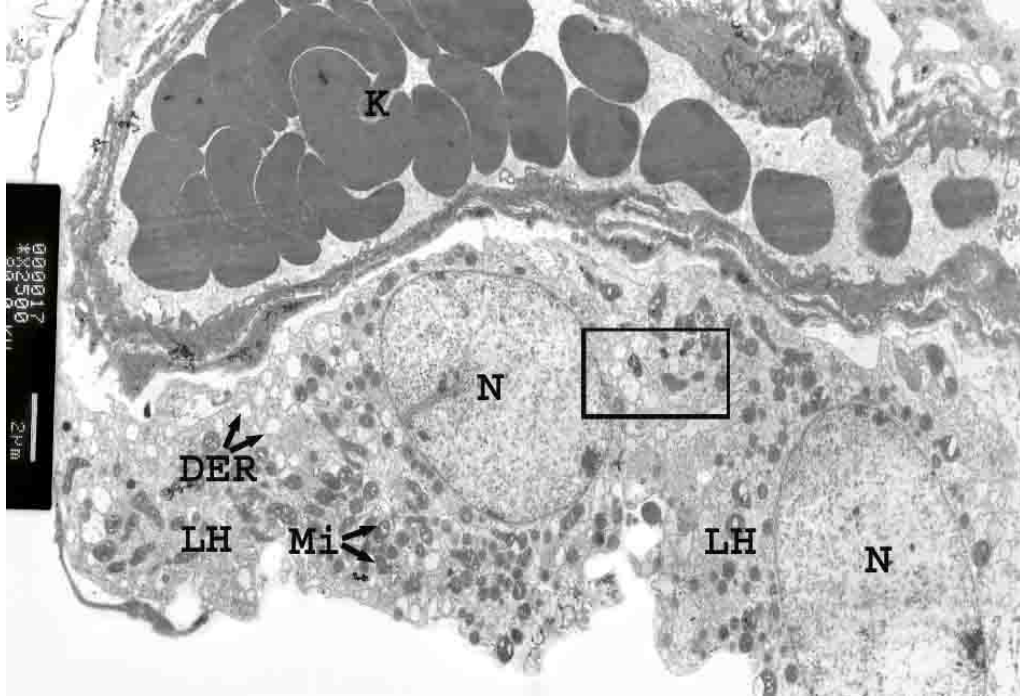
6 günlük hipertermi uygulamasından sonraki 1. günde yapılan elektron mikroskopik incelemede, Leydig hücrelerinin sitoplazmasının belli bölgelerine lokalize olmuş, yoğun yerleşimli çoğunlukla yuvarlak ya da oval şekilli, tübüler krista yapısında yer yer düzensizliklere sahip mitokondrilere rastlandı. DER sisternalarının şekillerinde düzensizleşme ile birlikte belirgin dilatasyon dikkat çekici boyutta izlendi. Bunların yanı sıra hücrelerin oval şekilli, ökromatin yapıda nukleusa sahip olmalarına rağmen, nukleuslarda yer yer derin invaginasyonlar ve küçük çentikler içerdiği gözlemlendi (Resim 6, 7).



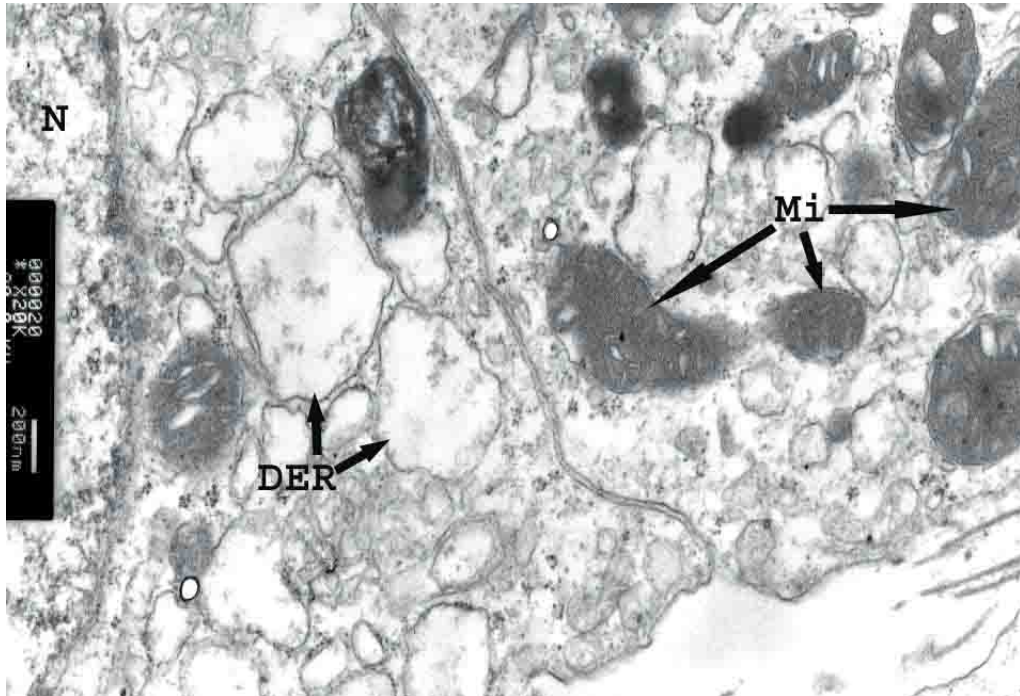
**Resim 4.** Sınırları düzgün seminifer tübüllerde, sertoli hücrelerinin uzantıları arasında germ hücre diziliminin bozulduğu (\*) görülmekte. Leydig hücrelerinin (→) sitoplazmalarındaki kayıp ve çekirdek yapılarındaki düzensizlikler dikkati çekmekte. H+E, X400.



**Resim 5.** İnteristisyumda sayıları oldukça azalmış, çok zayıf immün pozitif reaksiyon gösteren Leydig hücreleri (→) dikkati çekmekte. Seminifer tübüllerde germ hücre diziliminin bozulduğu (\*) görülmekte. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.



**Resim 6.** Bir kapilerin (K) komşuluğunda yerleşmiş, oval şekilli ökromatin yapıdaki nükleusun (N) yer yer derin invaginasyonlar ve küçük çentikler içerdiği gözlemlendi. Leydig hücrelerinin (LH) sitoplazmalarında yoğun yerleşimli mitokondriler (Mi) ve yer yer dilate olmuş düzensiz şekilli DER sisternaları (DER) dikkati çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X2500.



**Resim 7.** Ökromatin yapıda nükleusa (N) sahip Leydig hücrelerinde dilate olmuş ve düzensiz şekilli DER sisternaları (DER) ve tübüler krista yapısı bozulmuş mitokondriler (Mi) görülmekte. Komşu Leydig hücrelerinde de benzer bozuklukların olduğu dikkati çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X20000.

## **HİPERTERMİ SONRASI 14. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

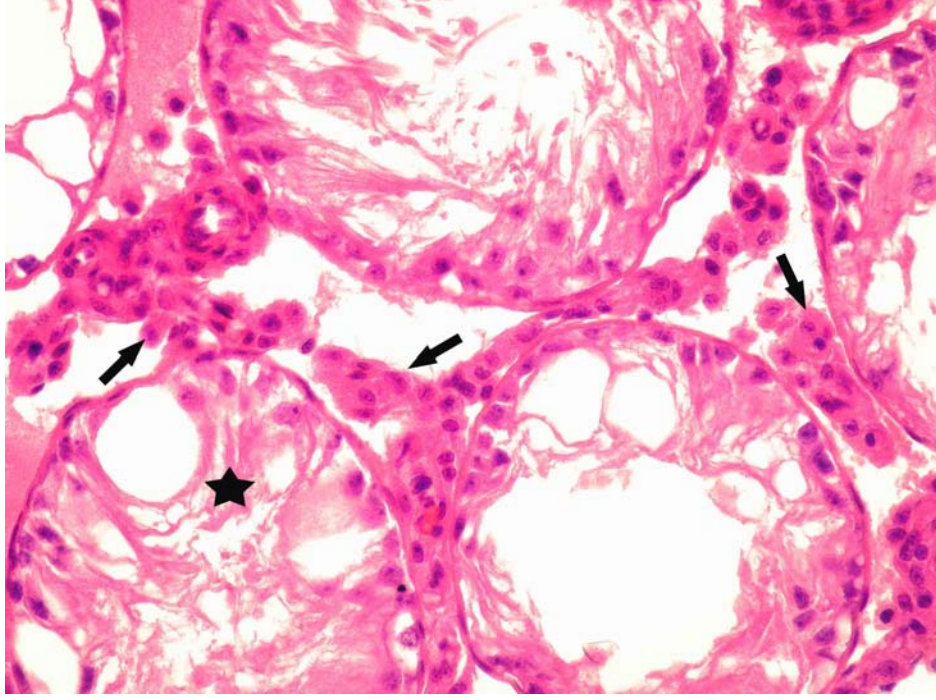
### **Işık Mikroskopik Bulgular**

Hipertermi uygulamasını takiben 14 gün sonra alınan ve rutin H+E ile boyanan testis doku kesitleri incelendiğinde, seminifer tübüllerde yer yer hafif düzensizliklere rağmen, tübül yapılarının büyük ölçüde korunduğu görüldü. Seminifer tübüllerde germ epiteline ait hücrelerin ve spermiyogenezin kaybolduğu; tübüllerin bazal kısmına yakın olarak yerleşmiş bulunan ve dejenere olmuş sertoli hücrelerinin yer yer geniş vakuoller oluşturmakla birlikte lümeneye doğru uzanan sitoplazmik uzantılarının varlığı tespit edildi. Hipertermi sonrası 1. gün grubuyla kıyaslandığında, interstisyel alandaki artışla birlikte Leydig hücrelerinin de proliferasyonu dikkat çekiciydi. Az sayıda normal görünümlü Leydig hücrelerinin yanı sıra, çoğunlukla poligonal yapıları bozulmuş ve sitoplazma kaybı sonucu büzüşerek iğ şeklini almış düzensiz Leydig hücrelerine de rastlandı (Resim 8).

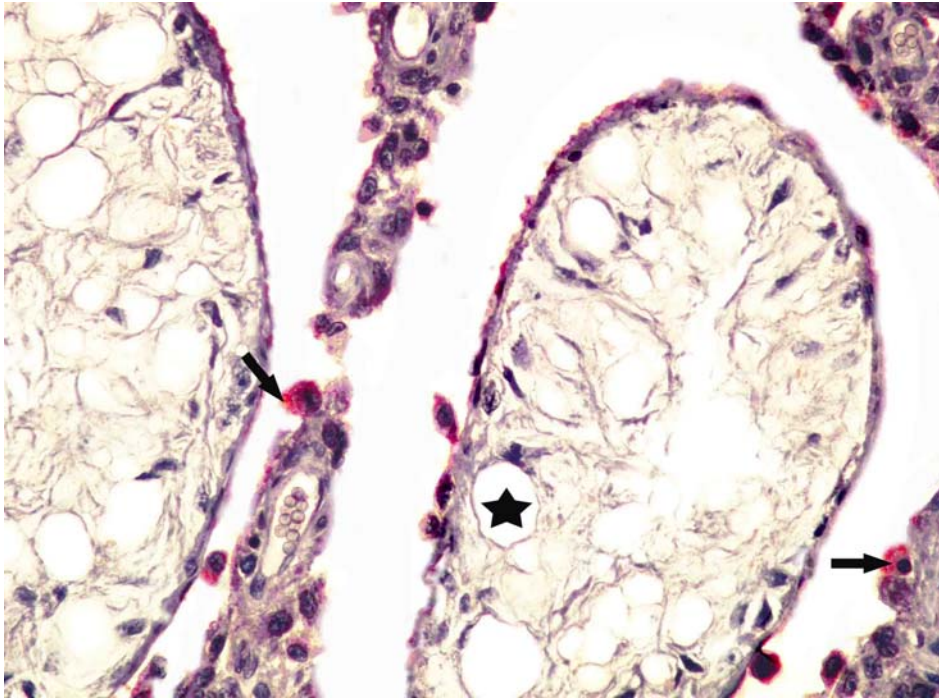
Hipertermi sonrası 14. gün grubunda immün reaksiyon veren Leydig hücrelerinin sayısında hipertermi sonrası 1. gün grubuna oranla artış olduğu gözlemlendi. İmmün pozitif reaksiyon veren az sayıda Leydig hücrelerinin interstisyel alanın periferinde lokalize oldukları ve yukarıda adı geçen düzensiz iğ şeklindeki hücrelerin ise immün reaktivite göstermedikleri tespit edildi (Resim 9).

### **Elektron Mikroskopik Bulgular**

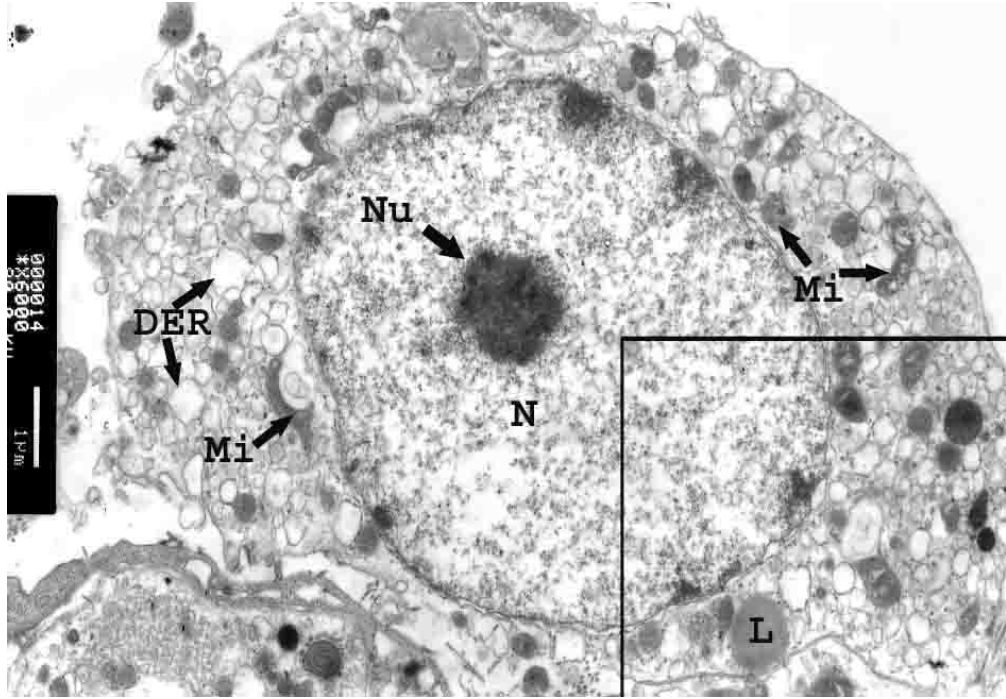
6 günlük hipertermi uygulamasından sonraki 14. günde yapılan elektron mikroskopik incelemede, Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında yoğun yerleşmiş DER sisternalarında çoğunlukla belirgin bir dilatasyonla birlikte, yer yer normal görünümde sisternalara da rastlandı. Sitoplazma içerisindeki seyrek yerleşmiş mitokondrilerin şekillerinde ve tübüler krista yapılarında bozukluklar dikkat çekiciydi. Eksentrik yerleşmiş nükleolusa sahip ökromatin yapıdaki hücrenin nükleusunda kromatin materyalin yer yer nükleer lamina altında hafif kondanse olduğu görüldü. Bazı bölgelerde nükleer lamina membranları arasında ayrılmalar izlenmekteydi. Bunların yanı sıra sitoplazma içinde çok az sayıda lipid damlacıklarına da rastlandı (Resim 10, 11).



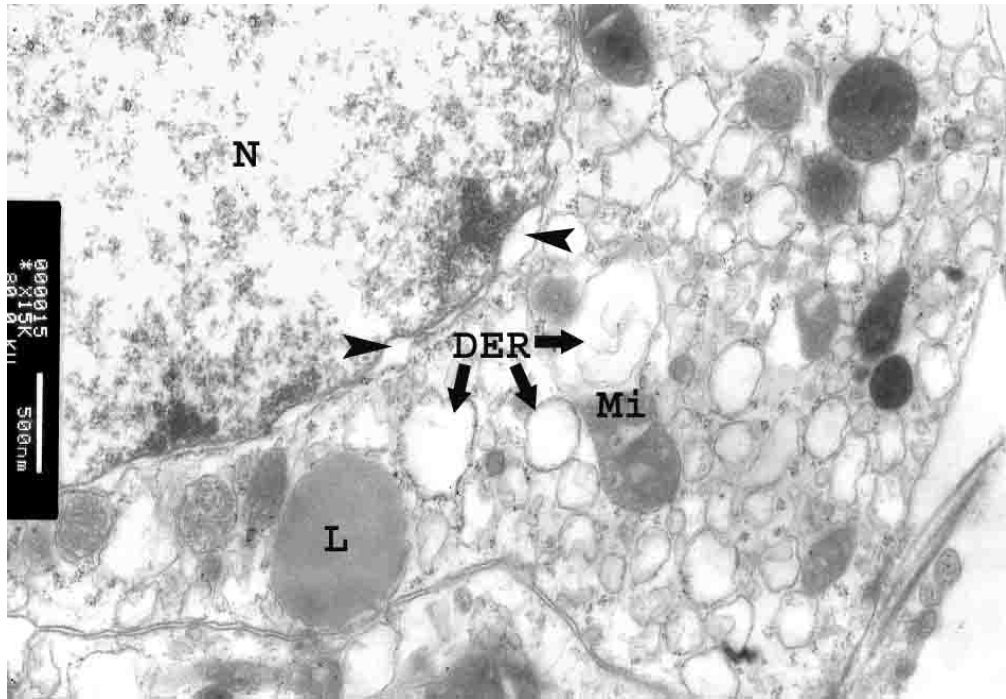
**Resim 8.** Seminifer tübüllerde yer yer hafif düzensizlikler, germinal seri hücrelerinde kayıplar, tübüllerin bazal kısımlarında sertoli hücrelerinin dejenerasyonundan kaynaklanan geniş vakuoller (\*) görülmekte. İnterstisyel alandaki artışla birlikte Leydig hücrelerinin proliferasyonu ve çoğunlukla poligonol yapıları bozulmuş ve sitoplazma kaybı sonucu büzüşerek iğ şeklini almış düzensiz Leydig hücreleri dikkati çekmekte. H+E, X400.



**Resim 9.** İmmün pozitif reaksiyon veren az sayıda Leydig hücrelerinin interstisyel alanın periferinde lokalize olduğu (→) ve düzensiz iğ şeklindeki hücrelerin immün reaktivite göstermedikleri dikkati çekmekte. Seminifer tübüllerin bazal kısımlarında sertoli hücrelerinin dejenerasyonundan kaynaklanan geniş vakuoller (\*) görülmekte. İmmünoperoksidaz, hematoxilen zıt boyaması, X400.



**Resim 10.** Eksentrik yerleşimli nükleolus içeren (Nu) ökromatin yapıdaki nükleusun (N) nükleer laminası altında kromatin materyalin yer yer kondanse olduğu görülmekte. Hücrenin sitoplazmasında belirgin şekilde dilate olmuş yaygın yerleşime sahip DER sistenaları (DER), şekilleri bozulmuş, tübüler krista yapıları düzensiz mitokondriler (Mi) ve lipid damlacığı (L) dikkati çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X6000.



**Resim 11.** Nükleer lamina membranları arasında ayrılmalar (►), DER sistenalarında (DER) dilatasyon ve mitokondri (Mi) yapısında bozukluklar dikkati çekmekte. Nükleusun hemen altında yerleşmiş lipid damlacığı (L) görülmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X15000.

## **HİPERTERMİ SONRASI 35. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

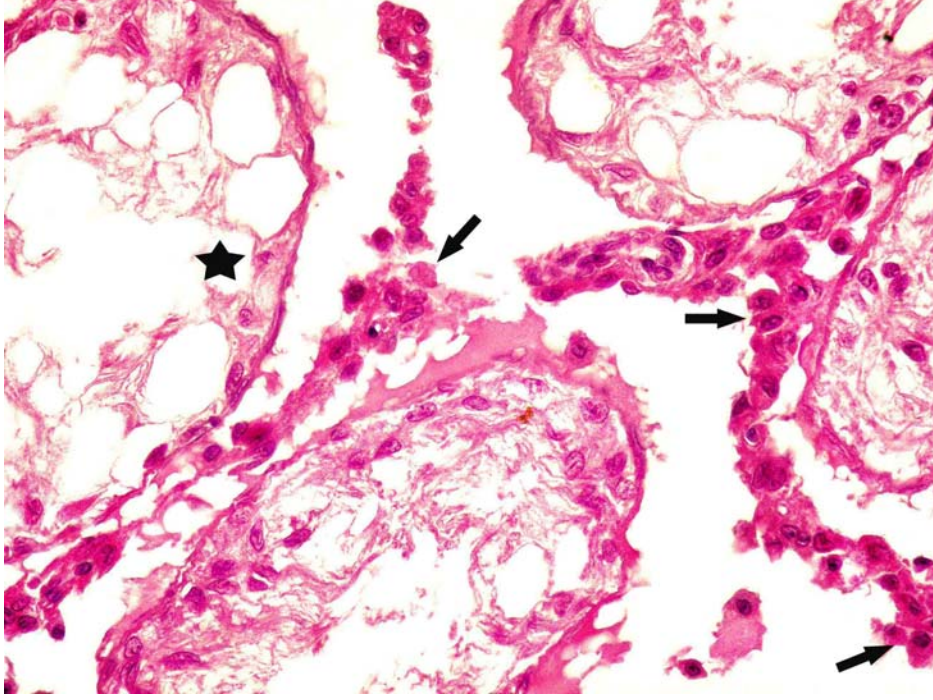
### **Işık Mikroskobik Bulgular**

Hipertermi uygulamasını takiben 35 gün sonra alınan ve rutin H+E ile boyanan testis doku kesitleri incelendiğinde, seminifer tübül duvarında sertoli uzantılarının oluşturduğu vakuollerde artış olduğu, ayrıca tübül çaplarının azalmasına bağlı olarak interstisyel alandaki boşlukların arttığı gözlemlendi. Hipertermi sonrası 14. gün grubuyla kıyaslandığında, interstisyel alandaki artış ile birlikte Leydig hücre proliferasyonunun devam ettiği tespit edildi. Pek çok sayıda eozinofilik boyanan sitoplazmaya sahip normal görünümlü Leydig hücrelerinin yanı sıra, çoğunlukla poligonal yapıları bozulmuş ve sitoplazma kaybı sonucu büzüşerek iğ şeklini almış düzensiz Leydig hücrelerine de rastlandı. (Resim 12).

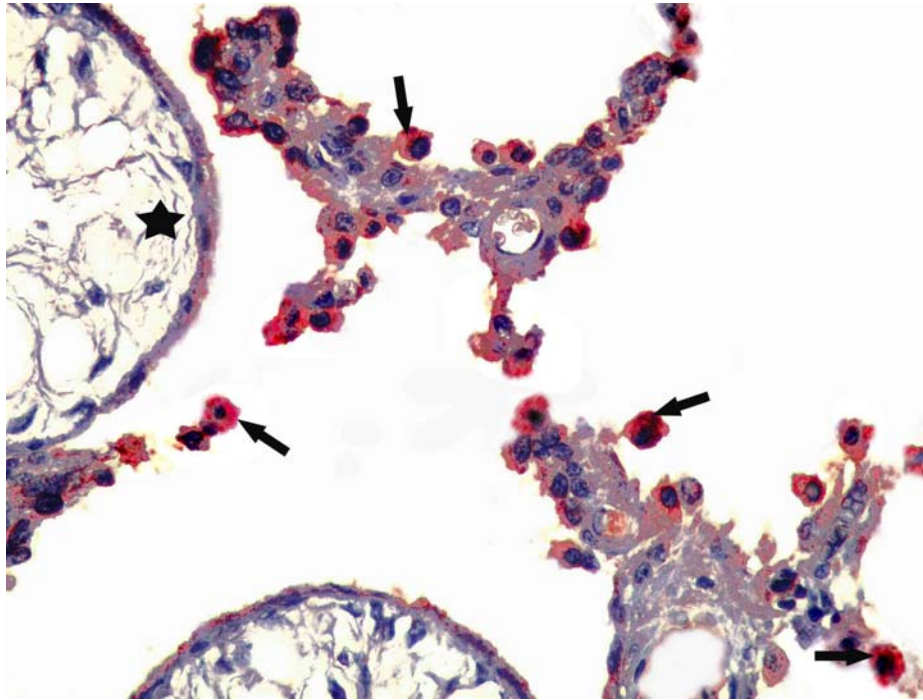
Hipertermi sonrası 35. gün grubundaki immünohistokimyasal reaksiyon veren Leydig hücrelerin de artışın devam ettiği görüldü. İmmün pozitif reaksiyon veren Leydig hücrelerinin interstisyel alanın periferinde lokalize oldukları ve interstisyel alanın merkezinde yer alan dejeneratif hücrelerin ise immün reaktivite göstermedikleri tespit edildi (Resim 13).

### **Elektron Mikroskobik Bulgular**

6 günlük hipertermi uygulamasından sonraki 35. günde yapılan elektron mikroskobik incelemede, Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında normal yapıdaki DER sisternaları arasında yer yer dilate olmuş DER sisternalarına da rastlandı. Tübüler kristal mitokondrilerin ve Golgi kompleksinin genel olarak yapılarını korudukları gözlemlendi. Hipertermi sonrası 1 ve 14. gün gruplarına nazaran, bu grup deneklerde hücre sitoplazması içerisinde dağınık yerleşmiş lipit damlacıkları daha belirgin izlendi. Hafif çentikli nükleusa sahip hücrenin ökromatin yapıdaki materyalinin yer yer nükleer lamina altında hafif kondanse olduğu, ayrıca bazı bölgelerde nükleer lamina membranları arasında ayrılmaların devam ettiği saptandı (Resim 14). Bunların yanı sıra, interstisyumda hipertermi sonucu ağır dejenerasyona uğramış, poligonal yapıları bozulmuş ve sitoplazma ile birlikte hücre organellerinin kaybı sonucu büzüşerek iğ şeklini almış düzensiz ve kondanse Leydig hücrelerine de rastlandı. Leydig hücrelerinin komşuluğunda yer alan makrofajlar dikkat çekmekteydi (Resim 15).

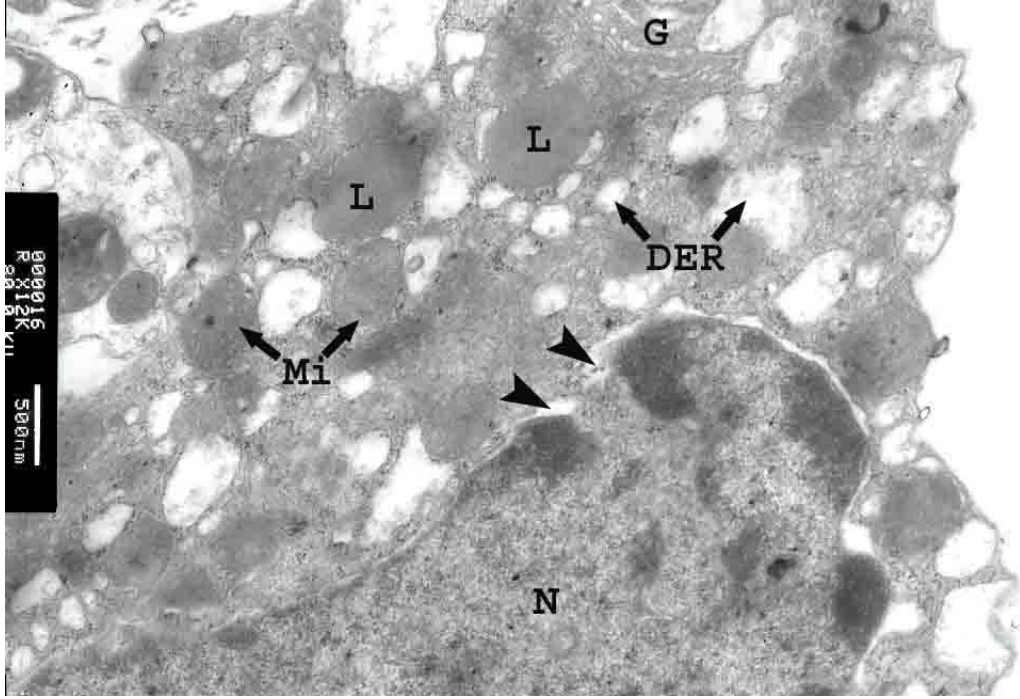


**Resim 12.** Seminifer tübüllerin duvarındaki vakuollerin sayısında artış olduğu, ayrıca tübül çaplarının azalmasına bağlı olarak interstisyel alandaki boşlukların da arttığı (\*) gözlenmekte. İnterstisyumda çok sayıda eozinofilik sitoplazmaya sahip normal görünümlü Leydig hücrelerinin (→) yanı sıra, büzüşerek iğ şeklini almış düzensiz hücreler de dikkati çekmekte. H+E, X400.

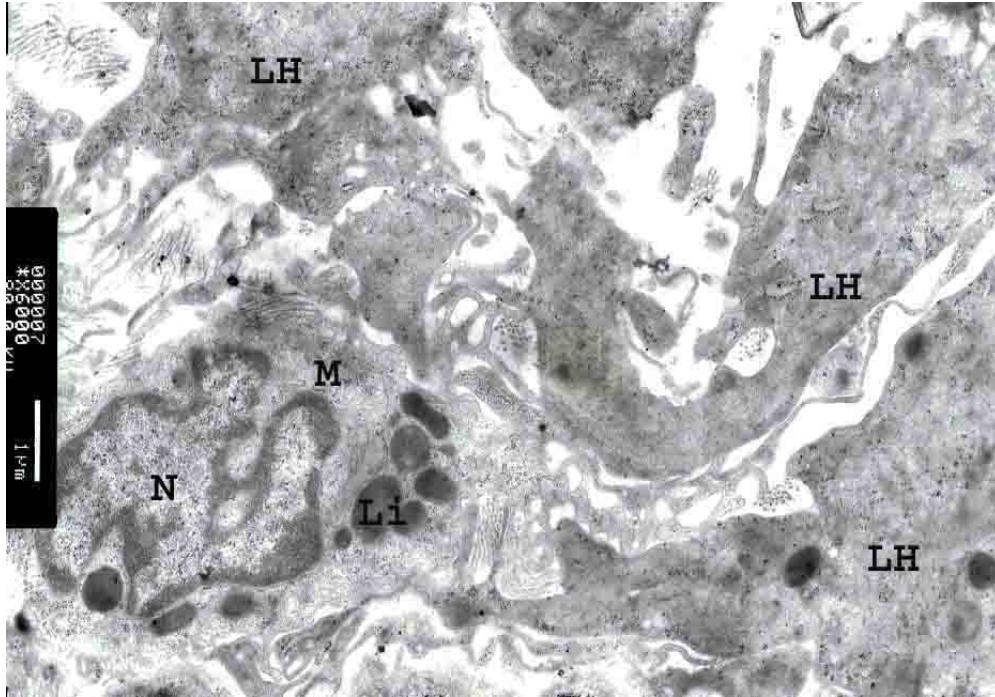


**Resim 13.** İmmün pozitif reaksiyon veren Leydig hücrelerinin interstisyel alanın periferinde lokalize oldukları (→) ve merkezde yer alan dejeneratif hücrelerin ise immün reaktivite göstermedikleri dikkati çekmekte. Çapları azalmış seminifer tübüller (\*) görülmekte. İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.





**Resim 14.** Çentikli yapıda nükleusa (N) sahip bir Leydig hücresinde, kromatin materyalin daha çok nükleer lamina altında kondanse olduğu ve bazı bölgelerde nükleer lamina membranları arasında ayrılmaların devam ettiği (►) görülmekte. Sitoplazmada normal yapıdaki DER sisternalarının (DER) arasında dilate olmuş ve şekli bozulmuş olanlar dikkati çekmekte. Ayrıca tübüler kristal mitokondriler (Mi), normal yapıda Golgi kompleksi (G) ve bir kaç lipid damlacığı (L) ayırt edilmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X12000.



**Resim 15.** Çentikli nükleusa (N) sahip, sitoplazmasında çok sayıda lizozom (Li) bulunduran bir makrofajın (M) komşuluğunda yerleşmiş, ağır dejenerasyona uğramış Leydig hücreleri (LH) dikkati çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X6000.

## **HİPERTERMİ SONRASI 70. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

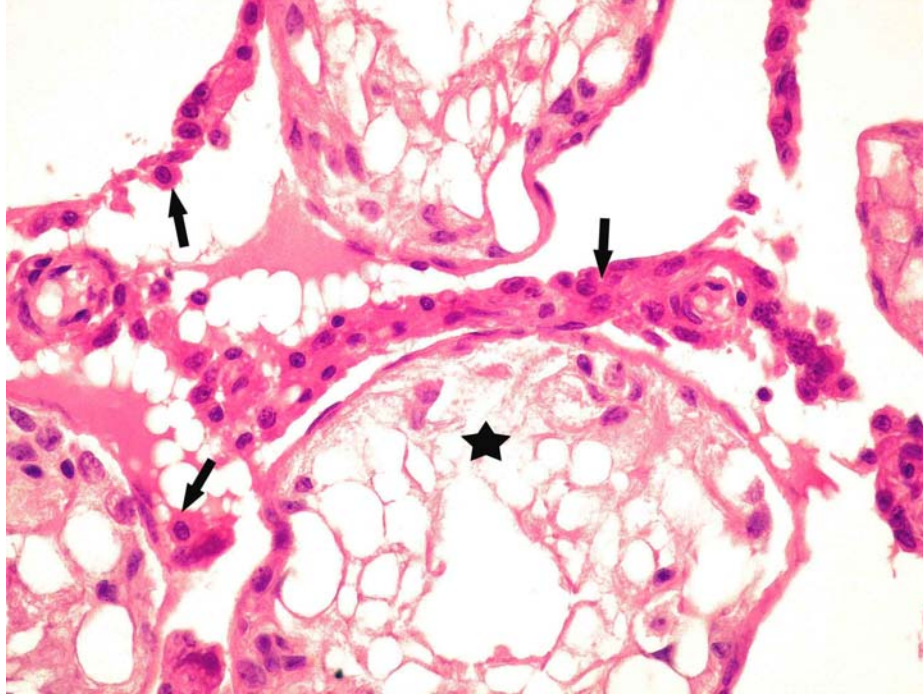
### **Işık Mikroskopik Bulgular**

Hipertermi uygulamasını takiben 70 gün sonra alınan ve rutin H+E ile boyanan testis doku kesitleri hipertermi sonrası 35. gün grubuyla kıyaslandığında, interstisyel alandaki benzerliklere rağmen, seminifer tübüllerde büzüşmelerin arttığı gözlemlendi. (Resim 16).

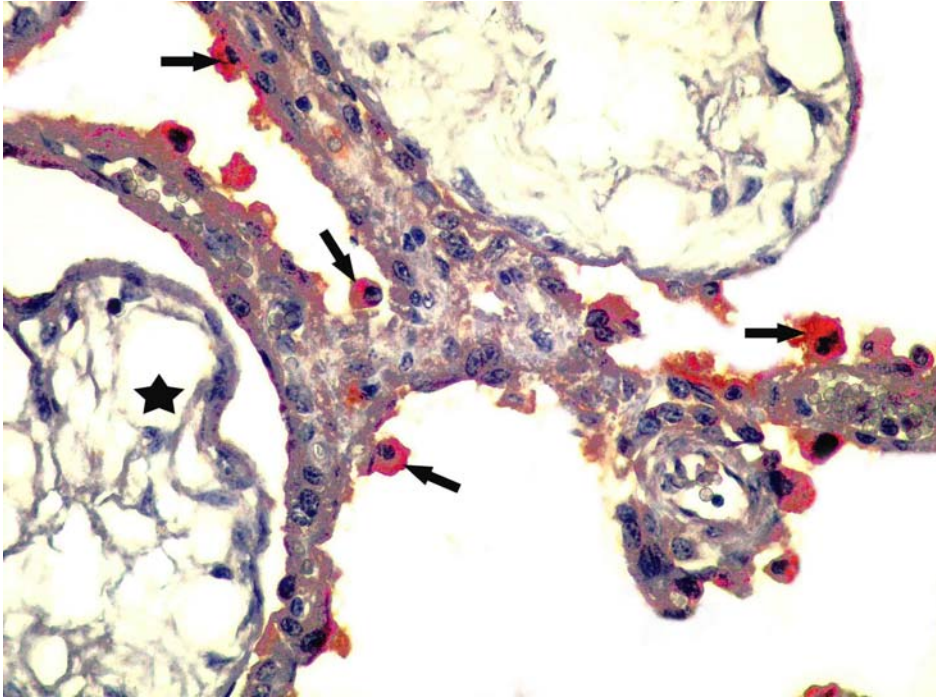
Hipertermi sonrası 70. gün grubunda ki immünohistokimyasal reaksiyon veren Leydig hücrelerinin sayısal ve lokalizasyon olarak 35. gün grubuyla benzerlik gösterdiği belirlendi (Resim 17).

### **Elektron Mikroskopik Bulgular**

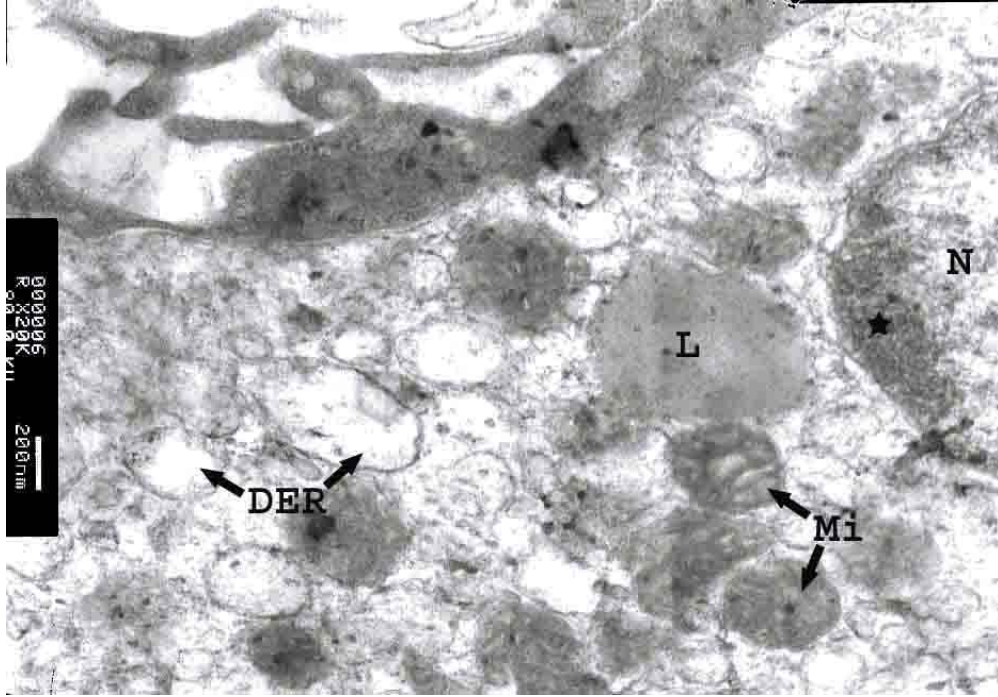
6 günlük hipertermi uygulamasından sonraki 70. günde yapılan elektron mikroskopik incelemede, Leydig hücrelerinin sitoplazmasında yoğun olarak yerleşmiş olan mitokondrilerin şekillerini ve tübüler krista yapılarını korudukları görüldü. Yer yer dilate olmuş DER sisternaları dikkat çekmekteydi. Kromatin materyalin daha çok nükleer lamina altında yoğunlaştığı ve nükleus şeklinin hafif düzensizleştiği ayırt edildi. Az sayıda lipit damlacıklarına rastlandı (Resim 18). İnterstisyumda yer yer kapiler etrafında yerleşen ağır hasara uğramış kondanse görünümde dejeneratif Leydig hücreleri bu grupta da görüldü (Resim 19).



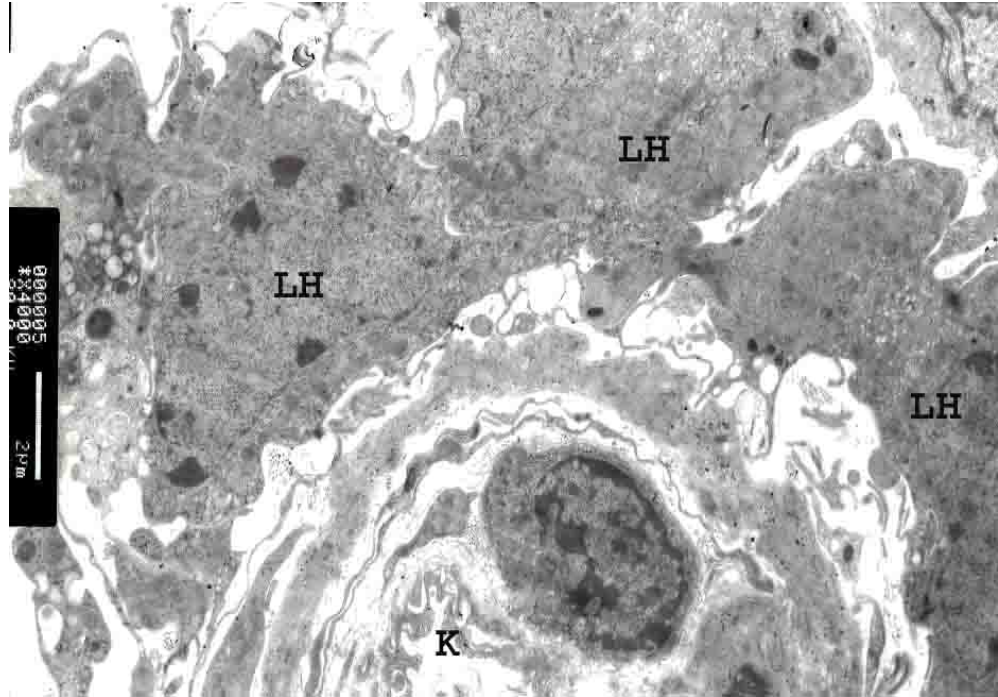
**Resim 16.** Seminifer tübüllerde büzüşmelerin ve vakuolizasyonun arttığı (\*) görülmekte. İnterstisyumun yoğunluğundaki artışla birlikte, çok sayıda eozinofilik sitoplazmaya sahip normal görünümlü Leydig hücreleri (→) ve yer yer iğ şeklini almış düzensiz hücreler de dikkati çekmekte. H+E, X400.



**Resim 17.** İmmün pozitif reaksiyon veren Leydig hücrelerinin interstisyel alanın periferinde lokalize oldukları (→) ve merkezde yer alan dejeneratif hücrelerin ise immün reaktivite göstermedikleri dikkati çekmekte. Duvarında büzüşmeler olan ve çok sayıda vakuol içeren dejenere olmuş seminifer tübüller (\*) görülmekte. İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, X400.



**Resim 18.** Nükleus (N) şeklinde hafif düzensizleşme ile birlikte nükleer lamina altında kondanse olmuş kromatin materyal (\*) dikkati çekmekte. Yuvarlak şekilli mitokondrilerin (Mi) tübüler krista yapılarını korudukları, yer yer dilate olmuş DER sisternaları (DER) görülmekte. Nükleusun komşuluğunda bir lipid damlacığı ayırt edilmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X20000.



**Resim 19.** Bir kapiler (K) komşuluğunda yerleşmiş hasara uğramış, kondanse görünümde dejeneratif Leydig hücreleri (LH) dikkati çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X4000.

## **HİPERTERMİ SONRASI 105. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

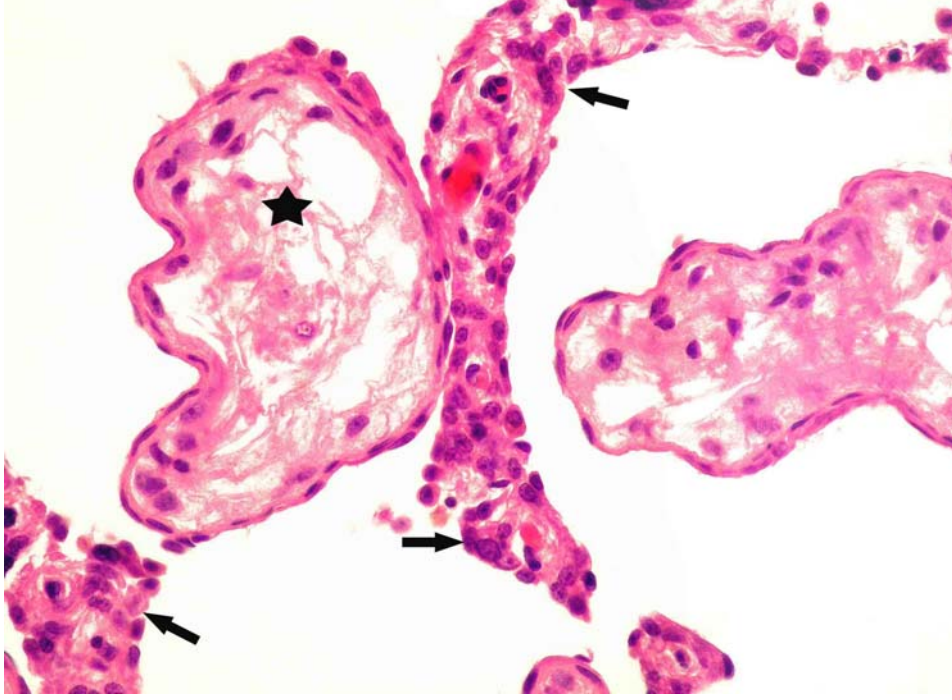
### **Işık Mikroskopik Bulgular**

Hipertermi uygulamasını takiben 105 gün sonra alınan ve rutin H+E ile boyanan testis doku kesitleri hipertermi sonrası 70. gün grubuyla kıyaslandığında, interstisyel alandaki benzerliklere rağmen, seminifer tübüllerde büzüşmelerin iyice arttığı gözlemlendi (Resim 20).

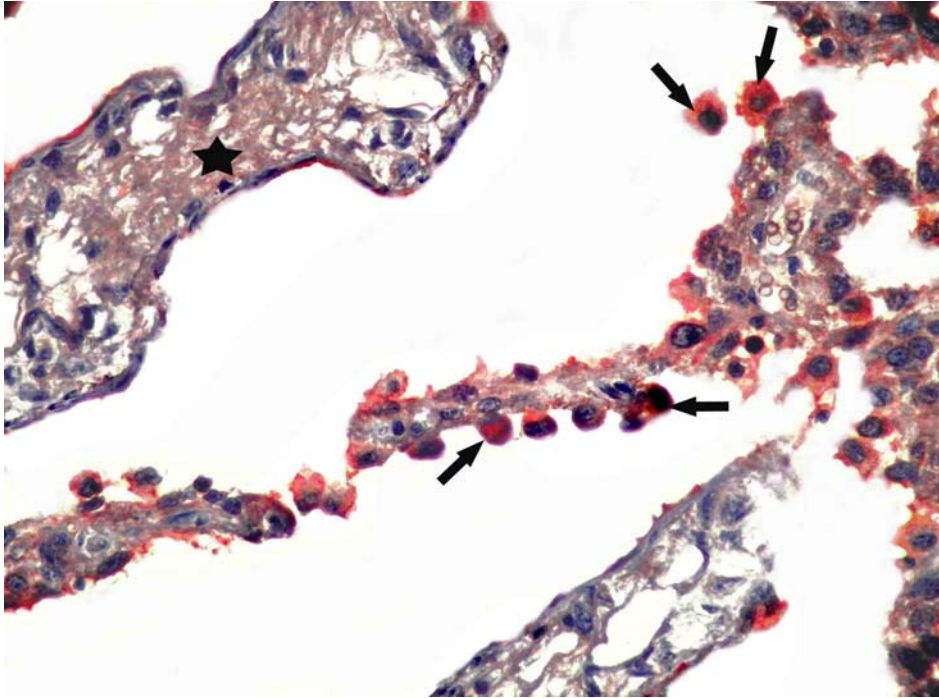
Hipertermi sonrası 105. gün grubunda ki immünohistokimyasal reaksiyon veren Leydig hücrelerinin sayısal ve lokalizasyon olarak 35 ve 70. gün gruplarıyla benzerlik gösterdiği belirlendi (Resim 21).

### **Elektron Mikroskopik Bulgular**

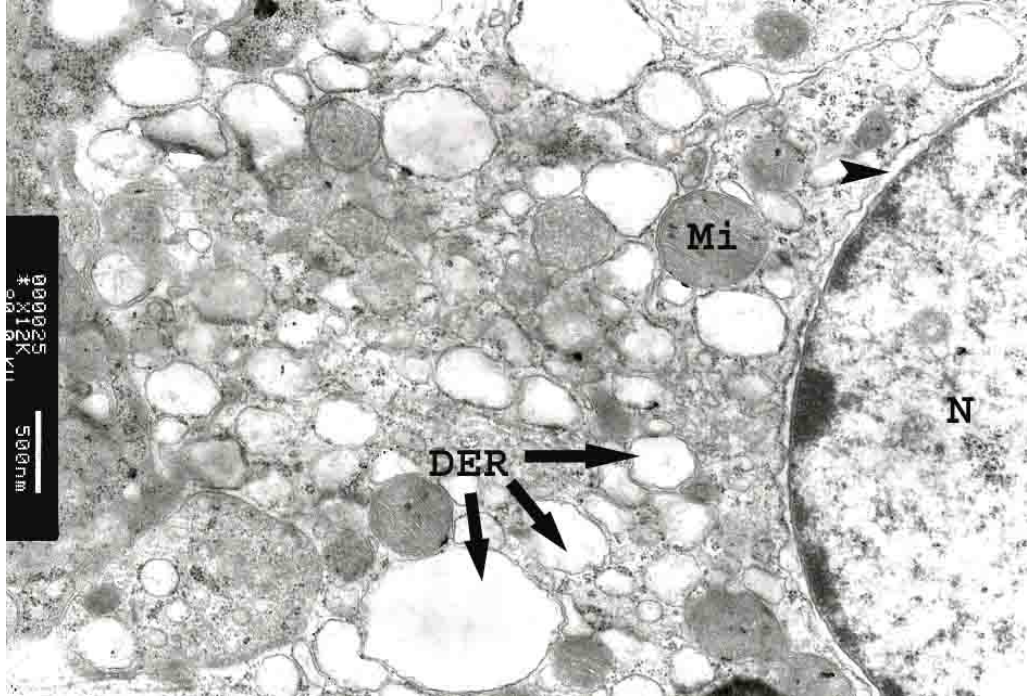
6 günlük hipertermi uygulamasından sonraki 105. günde yapılan elektron mikroskopik incelemede, Leydig hücrelerinin sitoplazmasında normal yapıdaki DER sisternaları arasında yer yer dilatasyona uğramış DER sisternalarına rastlandı. Genel olarak yuvarlak şekle sahip tübüler kristal mitokondrilerin yapılarını korudukları görüldü. Oval şekle sahip genel olarak ökromatin yapıdaki hücre nükleusunda kromatin materyalin nükleer lamina altında hafif düzeyde kondanse olduğu gözlemlendi. Ayrıca nükleer membranlar arasında ayrılmalar dikkat çekmekteydi (Resim 22). İnterstisyel alanda makrofaj komşuluğunda yerleşmiş, dejenerasyona uğramış kondanse Leydig hücreler ayırt edildi (Resim 23).



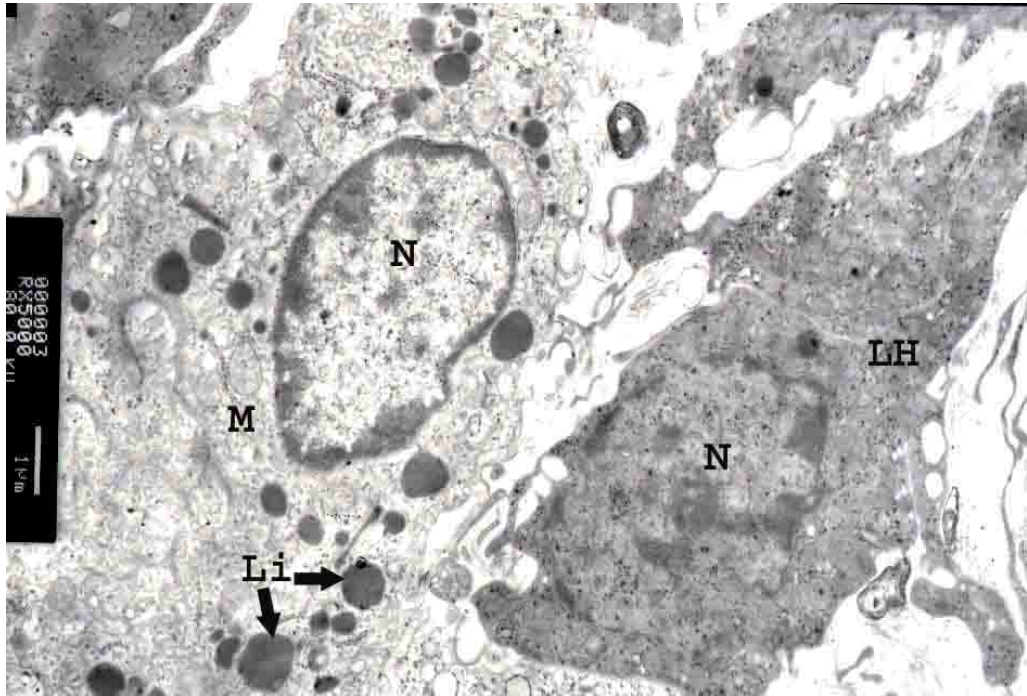
**Resim 20.** Ağır dejenerasyona uğramış, aşırı düzeyde büzölmeye uğramış seminifer tübüller (\*) dikkati çekmekte. İnterstisyel alanda yoğunluk artışı, çok sayıda eozinofilik sitoplazmaya sahip normal görünümlü Leydig hücresi (→) ve yer yer iğ şeklini almış düzensiz şekilli hücreler izlenmekte. H+E, X400.



**Resim 21.** İmmün pozitif reaksiyon veren Leydig hücrelerinin interstisyel alanın periferinde lokalize oldukları (→) ve merkezde yer alan dejeneratif hücrelerin ise immün reaktivite göstermedikleri dikkati çekmekte. Seminifer tübüllerde artan büzüşme ve şekil bozuklukları (\*) dikkati çekmekte. İmmünoperoksidaz, hematoxilen zıt boyaması, X400.



**Resim 22.** Ökromatin yapıda nükleusa (N) sahip Leydig hücresinde kromatin materyalin nükleer lamina altında hafif düzeyde kondanse olduğu, nükleer membranlar arasında ayrılmalar olduğu (►) görülmekte. Sitoplazmada belirgin şekilde dilate olmuş DER sisternaları (DER) arasında normal yapıdaki sisternalar ve yuvarlak şekilli mitokondriler (Mi) dikkati çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X12000.



**Resim 23.** Hafif çentikli nükleusa (N) sahip, sitoplazmasında çok sayıda lizozom (Li) içeren bir makrofaj (M) komşuluğunda yerleşmiş, dejenerasyona uğramış kondanse görünümde bir Leydig hücresi (LH) dikkati çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X5000.

## **HİPERTERMİ SONRASI 140. GÜN GRUBUNA AİT MORFOLOJİK BULGULAR**

### **Işık Mikroskopik Bulgular**

Hipertermi uygulamasını takiben 140 gün sonra alınan ve rutin H+E ile boyanan testis doku kesitleri incelendiğinde, seminifer tübüllerin genel histolojik görünümü germ epitelinin olmaması, tübül içinde geniş ve çok sayıda vakuollerin olması ile diğer gruplara benzerlik gösterdiği, ancak tübül yapılarında görülen büzüşmelerin özellikle hipertermi sonrası 105. gün grubuna göre çoğunlukla kaybolduğu görüldü. Hipertermi sonrası 105. gün grubuyla kıyaslandığında, interstisyel alandaki artış ile birlikte Leydig hücre proliferasyonunun devam ettiği tespit edildi. Pek çok sayıda eozinofilik boyanan sitoplazmaya sahip normal görümlü Leydig hücrelerinin yanı sıra, dejeneratif Leydig hücrelerinin azaldığı tespit edildi (Resim 24).

Hipertermi sonrası 140. gün grubundaki immünohistokimyasal reaksiyon veren Leydig hücre sayısında, diğer deney gruplarına oranla daha fazla artışın olduğu ve immün pozitif hücrelerin interstisyel alanın sadece periferinde değil, diğer kısımlarında da lokalize olduğu görüldü. Ayrıca, interstisyel alandaki immün reaksiyon vermeyen dejeneratif hücrelerin sayısında belirgin bir azalmanın olduğu tespit edildi (Resim 25).

### **Elektron Mikroskopik Bulgular**

6 günlük hipertermi uygulamasından sonraki 140. günde yapılan elektron mikroskopik incelemede, Leydig hücrelerinin sitoplazmasında genel olarak normal, oval şekilli tübüler krista yapısı belirgin mitokondrilere rastlandı. DER sisternalarında hafif düzeyde dilatasyonlar dikkat çekiciydi. Nükleolusu eksentrik yerleşmiş oval şekilli ökromatin yapıdaki nükleus, normal yapısı ile izlendi. Hipertermi sonrası 14, 35 ve 105. günlerde gözlenen nükleer membranlar arasındaki dilatasyonlara bu grupta rastlanmadı (Resim 26).



**Tablo 3. İmmünohistokimyasal olarak testosteron pozitif hücre sayıları.**

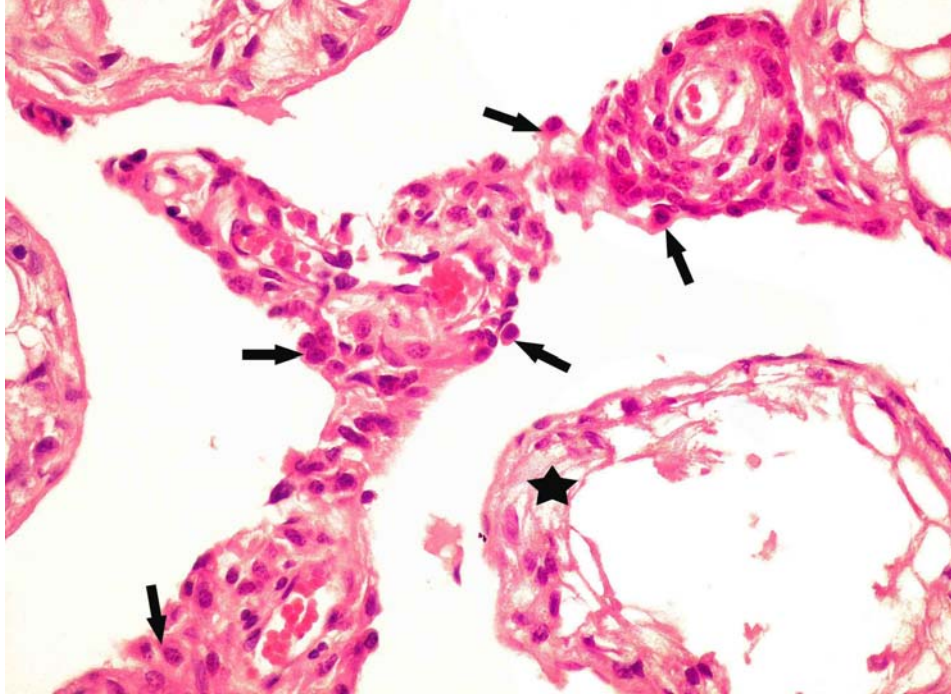
Gruplar	Leydig Hücre Sayısı Adet/625 $\mu\text{m}^2$
Kontrol (n=7)	21.6±4.1
Hipertermi sonrası 1. gün (n=7)	6.4±0.4*
Hipertermi sonrası 14. gün (n=7)	9.5±1.2†
Hipertermi sonrası 35. gün (n=7)	12.3±2.6‡
Hipertermi sonrası 70. gün (n=7)	12.7±2.4‡
Hipertermi sonrası 105. gün (n=7)	12.8±2.2‡
Hipertermi sonrası 140. gün (n=7)	16.6±3.1§

\*p<0.0001 kontrolle kıyaslandığında.

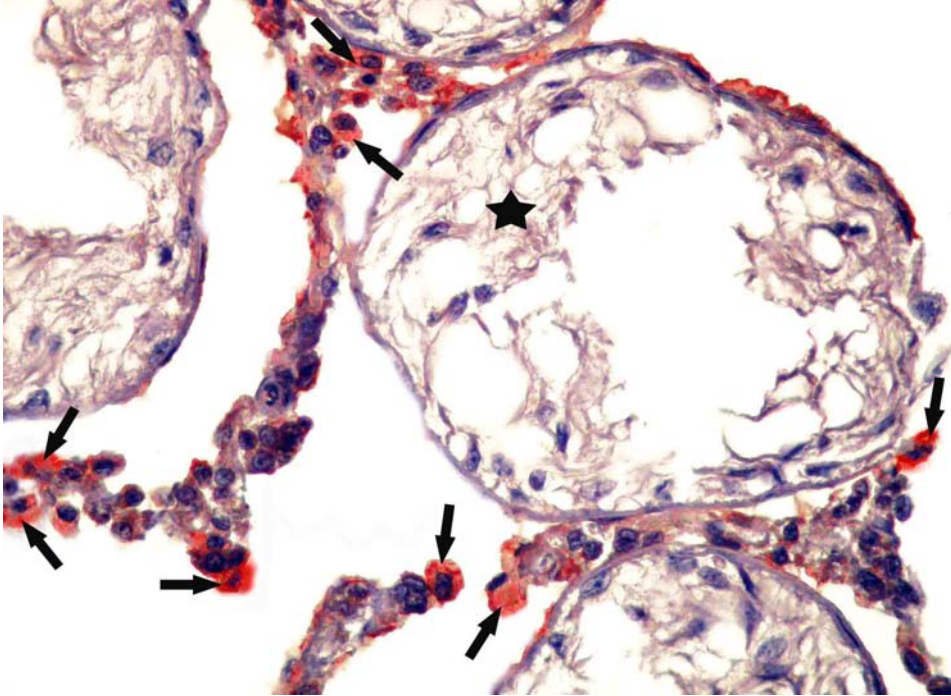
†p<0.001 kontrolle kıyaslandığında.

‡p<0.01 kontrolle kıyaslandığında.

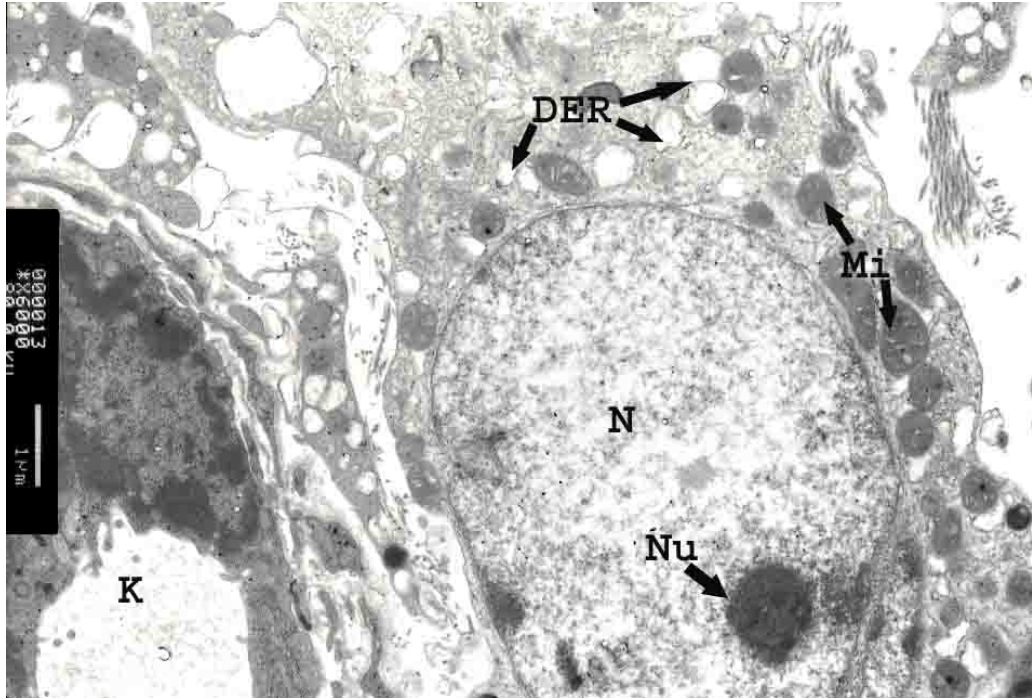
§p<0.05 kontrolle kıyaslandığında.



**Resim 24.** interstisyel alandaki artış ile birlikte Leydig hücre proliferasyonunun devam ettiği, pek çok sayıda eozinofilik boyanan sitoplazmaya sahip normal görünümlü Leydig hücrelerinin yanı sıra, dejeneratif Leydig hücrelerinin azaldığı izlenmekte. Seminifer tübüllerin duvarlarında daha hafif büzüşme olmasına rağmen, hala germinal seri hücrelerinde aşırı kayıp ve düzensizliğin devam ettiği, sertoli hücrelerinin dejenerasyonuna bağlı olarak büyük vakuollerin ortaya çıktığı (\*) görülmekte. H+E, X400.



**Resim 25.** Hafif düzeyde büzüşmüş hasarlanmış seminifer tübüller (\*) arasında yer alan interstisyumda, immün pozitif reaksiyon veren Leydig hücrelerinin (→) interstisyel alanın sadece periferinde değil, diğer kısımlarında da lokalize olduğu; ayrıca, interstisyel alandaki immün reaksiyon vermeyen dejeneratif hücrelerin sayısında belirgin bir azalmanın olduğu izlenmekte. İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, X400.



**Resim 26.** Bir kapiler (K) komşuluğunda yerleşmiş, nükleolusu eksentrik yerleşmiş (Nu), ökromatin yapıda nükleusa sahip Leydig hücrenin sitoplazmasında, genel olarak normal yapıda, tübüler krista yapısı belirgin mitokondriler (Mi) ve hafif düzeyde dilate olmuş DER sisternaları (DER) dikkati çekmekte. Uranil asetat-Kurşun sitrat, X6000.

## TARTIŞMA

Testisin, sperm üretimi ve testosteron sekresyonu olmak üzere iki önemli fonksiyonu vardır. Bu fonksiyonlarına bağlı olarak testisin anatomik olarak iki yapısı ön plana çıkar. Bunlar sırasıyla seminifer tübüller ve Leydig hücreleridir. Testisin yapısal olarak kısımlara ayrılması, fonksiyonel olarak da ayrılmaya bir sebep olur. LH kontrolü altında Leydig hücrelerinden testosteron sekresyonu ve testostereona FSH'ın eşlik etmesi ile testiste spermatogenezisin kontrolü sağlanır. Andersson ve arkadaşları (2004) yaptıkları bir çalışmada spermatogenik disfonksiyonun genelde Leydig hücrelerinin disfonksiyonu ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir (60).

Spermatogenik bozuklukları olan insanlarla ilgili yapılan birçok çalışmada, testosteron seviyesinin açık olarak çok düşük olduğu veya normal sınırların en alt limitinde olduğu ve buna yüksek seviyede LH'ın eşlik ettiği saptanmıştır (61, 62).

Leydig hücrelerinin disfonksiyonunun spermatogenetik disfonksiyona sebep olduğu rodentler üzerinde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (63, 64). Bu çalışmalarda normal ratlarda spermatogenik hasar, radyasyona maruz bırakılma, vit A eksikliği, kriptorşidizm veya hidroksiüre gibi kemoterapötik ajanların kullanılması ile oluşturulmuştur. Bu çalışmalarda düşük testosteron konsantrasyonu ile eşlik eden yüksek LH seviyeleri bulguları da tespit edilmiştir (63, 64).

Spermatogenik disfonksiyonu etkileyen diğer bir faktör termal strestir. Ayrıca sauna veya sıcak banyoların sebep olduğu testiküler ısı artışı da spermatogenezisi bozabilmektedir (12, 13). Bu çalışmada; skrotal hipertermi uygulanarak Leydig hücrelerinin vücut sıcaklığının

üstünde bir sıcaklık derecesine maruz kalması nedeniyle bu hücrelerde çeşitli hasarlar oluşmuştur.

Yapılan bir çalışmada tek doz hipertermi uygulamasının ardından testislerde ortaya çıkan hasarda geriye dönüşün ancak 40 gün sonra başladığı ve 60. gün ve sonrasına kadar sürebildiği tespit edilmiştir (65). Testise uygulanan tekrarlı hipertermi uygulamalarında testis ağırlığındaki kaybın aylarca geriye dönmeyebileceği bildirilmiştir (66). Çalışmamız hipertermi sonrasında tüm deney gruplarındaki testis ağırlıklarının kontrole oranla azaldığı ve hipertermi sonrası 140. güne rağmen ağırlık artışında herhangi bir geri dönüşün olmadığı göz önüne alındığında Setchell (65)'in çalışmasıyla zıtlık, Bowler (66)'in çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda testis ağırlıklarının geriye dönemeyişinin sebebi olarak, hipertermi uygulamamızın tek doz değil tekrarlı uygulamalardan kaynaklandığı kanaatindeyiz.

Koç ve domuzlar üzerinde yapılan kriptorşidizm çalışmalarında total Leydig hücre sayılarında azalma olduğu tespit edilmiştir (67, 68). Yapılan çalışmalarda deneysel olarak oluşturulan kriptorşidizmde Leydig hücrelerinin bozulduğu gösterilmiştir (69, 70). Leydig hücreleri sıcaklık stresine karşı çok hassastır. Leydig hücrelerinin seksüel steroidleri üretme fonksiyonları sıcaklık etkisi ile birlikte geçici olarak fakat ani olarak azalır (10, 71).

Lue ve arkadaşları (1999) yaptıkları bir çalışmada, ratların skrotumlarına 43 derecede 15 dk tek doz hipertermi uygulamışlardır ve çalışmalarının sonucunda serum testosteron seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmamakla birlikte, intratestiküler testosteron seviyesinde anlamlı bir şekilde azalma olduğunu bildirmişlerdir. İntratestiküler testosteron seviyesinin hipertermi uygulamasından 2 gün sonra azaldığını, testosteron seviyesinin hipertermi sonrası 9. günden itibaren düzelmeye başladığını göstermişlerdir (55).

Ren ve arkadaşları (2006) deneysel olarak ratlarda oluşturdukları kriptorşidizm sonrası plazma testosteron seviyesini değerlendirmek için oluşturdukları 4 gruptaki ratları cerrahi girişim sonrası 1, 3, 5 ve 7.günlerde sakrifiye ederek testosteron seviyelerine bakmışlardır. Operasyon sonrası 1. ve 3. günlerde plazma testosteron konsantrasyonunda anlamlı şekilde azalma olduğunu ve operasyondan sonraki 5. günde sakrifiye edilen ratlarda ise plazma testosteron seviyesinin düzeldiğini bildirmişlerdir (72).

Lue ve arkadaşları (2002) maymunlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, deneklerin skrotumlarını 6 gün boyunca, günde 30 dk 43 derece sıcak su banyosunda tutmuşlardır. Çalışma sonunda geçici olarak azalan serum testosteron seviyesinin 2. haftadan sonra geriye döndüğünü bildirmişlerdir (73). Lue ve arkadaşları (1999) ratlar üzerinde yaptıkları farklı bir

çalışmada tek doz hipertermi uygulaması sonunda aynı bulguları elde ettiklerini rapor etmişlerdir (55).

Çalışmamızda hipertermi uygulaması sonrası akut ve kronik dönemde yapmış olduğumuz incelemelerde, Leydig hücrelerinin hasara uğradığını ve dolayısıyla testosteron pozitif reaksiyon veren hücrelerin sayısında önemli bir şekilde azalmanın olduğunu tespit ettik. Elde ettiğimiz bulgular yukarıda adı geçen araştırmacıların elde ettiği bulgular ile uyumaktadır. Yapılan hipertermi Leydig hücresi çalışmalarında, testosteronun immünohistokimyasal yöntemle boyanarak gösterilmesine dair çalışmalara rastlanılmamıştır. Biz çalışmamızda Leydig hücrelerini hipertermi sonrası akut ve kronik dönemde testosteron üretimi açısından incelemek amacı ile immünohistokimyasal boyama yöntemini kullandık. Akut dönemde testosteronun pozitif reaksiyon veren hücre sayısının kontrole oranla oldukça azaldığı, kronik dönemde ise akut döneme ait gruplara oranla testosteron pozitif hücre sayısında artış olduğunu gözlemledik.

Damber ve arkadaşları (1980) 43 derecede 30 dakika tek doz hipertermi uygulamasından sonra yaptıkları elektron mikroskopik incelemeler sonucunda deney grubundaki ratların Leydig hücrelerinde lipit damlacıklarının arttığını bildirmişlerdir (74).

Ezasoar (1985), skrotal ve abdominal testisleri karşılaştırarak yaptığı elektron mikroskopik bir çalışmada, abdominal testiste skrotal testise oranla hücre sitoplazmasında çok sayıda lipit damlacıklarının olduğunu göstermiştir (75).

Bizim yaptığımız elektron mikroskopik incelemelerde hipertermi uygulaması sonucu gruplarda lipit damlacıklarının arttığına yönelik herhangi bir bulguya rastlanmadı.

Ezasoar (1985), abdominal testisin elektron mikroskopik incelemelerinde, Golgi aygıtının sitoplazma içinde az yer kapladığını, daha kısa ve dar sisternalar içerdiğini bildirmiştir. Tübüler kristal mitokondrilerin de abdominal testiste sitoplazmanın belli bölgelerinde lokalize olduğunu ve kristalarının matriks içinde düzensizleştiğini ve dilatasyonların oluştuğunu bildirmiştir (75). Çalışmamızda yaptığımız elektron mikroskopik incelemeler sonucunda kontrol grubunda normal yapıda görülen tübüler kristal mitokondriler, DER sisternaları, ökromatin yapıdaki nukleusun deney gruplarında hasara uğradıklarını gördük. Hipertermi sonrası 1 ve 14. gün gruplarında ağır dejenerasyona uğramış hücrelerde, mitokondrilerde tübüler krista yapılarının kısmen bozulduğunu, DER sisternalarının düzensizleştiği ve bu sisternalarda geniş dilatasyonların olduğunu gözlemledik. Hipertermi sonrası 35, 70 ve 105. gün gruplarında ise bu hasarların 1 ve 14. günlere oranla daha hafif olduğunu saptadık. Hipertermi sonrası 140. gün grubunda hasarların daha da azaldığı

belirlendi. Elde ettiğimiz bulguların yukarıda adı geçen araştırmacıların bulguları ile paralellik gösterdiği tespit edildi.

Teerds (1999) yaptığı bir çalışmada tek doz 75-100 mg/kg ethan dimethan sülfonat (EDS) enjeksiyonu ile Leydig hücrelerinin 12 saat içinde tahrip olduğunu ve bu tahribatın 72 saat içinde tamamlandığını bildirmiştir. Bu esnada Leydig hücrelerinde gerçekleşen değişiklikleri şöyle tarif etmiştir; DER dilatasyonu, Golgi aygıtında hipertrofi, kondanse olmuş nükleer kromatin ve interstisyel alandaki makrofajların fagositik aktivasyonu (76). Bütün bu işaretler Leydig hücrelerinin apoptozise gittiğini göstermektedir (36).

Kriptorşid ratlarda yapılan incelemelerde makrofajların arttığı tespit edilmiştir (77). Gaytan'ın (1994) yaptığı bir seri çalışmada interstisyel alandaki makrofajların Leydig hücre farklılaşması için gerekli olduğu bildirilmiştir. Yaptıkları çalışmada intratestiküler enjeksiyon yolu ile kullandıkları kimyasal ajanla sağ testiste makrofajların sayısında azalma sağlamışlar, uygulanan EDS ile her iki testisteki Leydig hücrelerinin rejenerasyonunu incelemişlerdir. Makrofaj sayısının azaldığı sağ testiste rejenere olan Leydig hücre sayısının daha az olduğunu göstermişlerdir (78). Araştırmacılar Leydig hücrelerinin farklılanmasında makrofajlara gereksinim duyulduğunu bildirmişlerdir (36).

Gaytan'ın (1995) yaptığı bir diğer çalışmada EDS'nin sebep olduğu Leydig hücre ölümünde makrofajların işlevleri ile ilgili olmuştur. EDS enjeksiyonunu takip eden ilk 2 günde sham ve hipofizektomi gruplarında makrofaj sayısında artış olduğunu göstermiştir. Hipofizektomi grubundaki makrofaj sayısının artışının daha yavaş gerçekleştiğini gözlemiştir. Bu grupta özellikle hipofizektomiden uzun zaman sonra makrofajların fagositik aktivitesinin azaldığını bildirmiştir. Araştırmacı makrofajların EDS'nin sebep olduğu, Leydig hücre ölümlerinde aktif olarak rol aldıklarını ortaya koymuştur (79).

Çalışmamızda yaptığımız elektron mikroskopik incelemelerde deney gruplarımızda ağır dejenerasyona uğramış Leydig hücrelerinin komşuluğunda makrofajların olduğunu gözlemledik. Bu makrofajların genelde koyu boyanan kondanse olmuş, hücre içeriği net olarak belli olmayan dejeneratif iğ şeklindeki Leydig hücrelerinin arasında lokalize olduklarını tespit ettik. Çalışmamızda hipertermi sonrasında akut dönemde azalan Leydig hücre sayısında, kronik dönemde az da olsa bir artışın olduğunu tespit ettik. İnterstisyel alanda yoğun olarak gözlemlediğimiz makrofajların apoptozise gittiklerini düşündüğümüz, koyu boyanan Leydig hücrelerinin fagositözünde ve yeni Leydig hücrelerinin gelişiminde gerekli olduğunu düşündük.

Murphy ve arkadaşları (2001) kriptorşid testisinde yaptıkları çalışmalarda androjen biyosentezinde kullanılan enzimlerin aktivitesinin azalması ve buna bağlı olarak serum testosteron seviyesinin azalması ile ilgili sonuçlar bildirmişlerdir (10).

Ren ve arkadaşlarının (2006) deneysel olarak oluşturdukları kriptorşidizmde Leydig hücrelerinde testosteron sentezinin inhibe olduğunu bildirmişlerdir. Sıcaklık stresinin Leydig hücrelerinin fonksiyonlarını inhibe ettiğini tespit etmişlerdir (72). Ayrıca yapılan bir diğer çalışmada normal skrotal ısının altındaki ve üstündeki ısılarda testis dokusunda protein sentezi inhibisyonu ile birlikte steroid sentezinin de azaldığını ortaya koymuşlardır (80). Hipertermiye maruz bırakılan testislerdeki Leydig hücrelerinde steroid sentezi sırasında kullanılan enzimlerin aktivitesi ısı ile birlikte anlamlı bir şekilde azalmaktadır (81).

Ratların testislerinde kolesterol taşınması ve testosteronun sentezi için direk olarak SR-B1, StAR, 3 $\beta$ -HSD ve 17 $\beta$ -HSD proteinleri gereklidir (82).

Shi ve arkadaşları (2007) yaptıkları bir çalışmada ratlara oral yolla perfluorododekanoik asit vermişlerdir. Uygulamanın ardından deneklerde, kolesterolün taşınması ve steroidogenezis için gerekli olan enzimlerin bozulduğunu tespit etmişlerdir (83).

Yaptığımız çalışma sonucunda hiperterminin Leydig hücrelerinde hasara sebep olduğunu ve deney gruplarında testosteron üreten Leydig hücre sayısında azalmaya yol açtığını tespit ettik. Daha önce yapılmış çalışmalar ışığında, çalışmamızda uyguladığımız skrotal hiperterminin testosteron sentezi sırasında kullanılan enzimlerin inhibisyonuna yol açtığını, protein yapısındaki enzimlerin artan sıcaklıkla birlikte denatüre olduğunu ve bunun da Leydig hücrelerinde testosteron üretiminin bozulmasına sebep olduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışmada uygulanan hipertermi neticesinde akut ve kronik dönemde Leydig hücrelerinin hasara uğrayarak sayıca azaldığını tespit ettik, buna bağlı olarak testosteron düzeylerinin azalacağını ve meydana gelen bu hasarların spermatogenezis ve dolayısı ile fertilitiyi olumsuz etkileyebileceğini düşünmekteyiz.



## SONUÇ

Tedavi veya tatil amaçlı su sıcaklığı yüksek olan termal kaplıcalara giden insanların testislerindeki Leydig hücrelerinin yüksek ısıdan nasıl etkilendiğini araştırmak amacı ile planladığımız çalışmamızda, uygulanan skrotal hipertermi sonrasında Leydig hücrelerinin ışık ve elektron mikroskopik incelemesinde hücrelerin hasara uğradıklarını gözlemledik. Elde ettiğimiz bulgular sonucunda ısıya bağlı olarak akut ve kronik dönemde, kontrole kıyasla immün pozitif reaksiyon veren Leydig hücrelerinin sayısında azalma olduğunu tespit ettik.

Sonuç olarak veriler göz önünde bulundurulduğunda, vücut sıcaklığından daha yüksek sıcaklık sağlayan sauna, banyo ve kaplıca gibi ortamların Leydig hücrelerinde hasar oluşturarak infertiliteye sebep olabileceği kanısına vardık.

## ÖZET

### SKROTAL HİPERTERMİ UYGULANAN SIÇANLARIN LEYDİĞ HÜCRELERİNİN MORFOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Cevat AKTAŞ

Memelilerde testiküler sıcaklık vücut sıcaklığından daha düşüktür. Testiküler fonksiyon ısıya bağımlı olarak değişir. Skrotal ısının artması düşük kalitede sperm üretimine ve infertiliteye neden olur. Spermatogenik disfonksiyon çoğu zaman Leydig hücrelerinin disfonksiyonu ile ilişkilidir. Testosteron normal spermatogenezisin sürdürülmesi ve fertilitate için gerekli önemli bir faktördür.

Bu çalışmada; skrotal hipertermi ile oluşturulan testiküler hasarda, Leydig hücrelerinde kısa ve uzun dönemde gözlenen morfolojik değişiklikler ışık ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmiştir. Bu amaçla çalışmamızda 49 adet Wistar-albino erkek rat kullanılmıştır. Her biri 7 denek içeren 1'i kontrol, 6'sı deney olmak üzere 7 grup oluşturulmuştur. Skrotal hipertermi oluşturmak amacı ile deney grubuna ait ratların skrotumları, 43 °C ye ayarlanmış benmaride 6 gün boyunca her gün 30 dakika, kontrol grubuna ait ratların skrotumları ise 22 °C ye ayarlanmış benmari içinde 6 gün boyunca her gün 30 dakika süre ile tutulmuştur. Hipertermi uygulanan denekler; uygulamadan 1, 14, 35, 70, 105 ve 140 gün sonra 50 mg/kg ketamin anestezisi altında sakrifiye edilerek, ışık ve elektron mikroskopik incelemeler için, testise ait biyopsi materyalleri alınmıştır. Alınan materyaller yapılacak incelemelere göre işlemlendirilmiştir.

Çalışmamızda uyguladığımız hipertermi sonucunda, skrotal hiperterminin Leydig hücrelerinde hasara neden olduğunu gözlemledik. Işık mikroskopik incelemelerde, akut

dönemde interstisyel alanda çok sayıda Leydig hücrelerinin hasara uğradığını ve testosteron pozitif reaksiyon veren hücrelerin sayıca azaldığını; kronik dönemde ise hafif bir iyileşmenin olduğunu tespit ettik. Leydig hücrelerinin elektron mikroskopik incelemelerinde ise, tübüler kristal mitokondrilerde düzensizlikler, düz endoplazmik retikulum sisternalarında belirgin dilatasyonlar dikkat çekiciydi.

Sonuç olarak, vücut sıcaklığından daha yüksek sıcaklıkların Leydig hücrelerinde hasar oluşturarak infertiliteye sebep olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Leydig hücresi, skrotal hipertermi, testosteron, infertilite, sıçan.

## **SUMMARY**

### **A MORPHOLOGICAL STUDY ON LEYDIG CELLS OF SCROTAL HYPERTHERMIA APPLIED RATS**

**Cevat AKTAS**

Testicular temperature is lower than body temperature in mammals. Testicular function varies depending on temperature. Increase in scrotal temperature causes low quality sperm production and infertility. Spermatogenic dysfunction is mostly associated with dysfunction of Leydig cells. Testosterone is a crucial factor needed for the maintenance of spermatogenesis and fertility.

In this study, morphological changes observed in Leydig cells in short and long term were examined at light and electron microscopic level in testicular damage done by scrotal hyperthermia. For this purpose, 49 Wistar-albino male rats were used in our study. 7 groups, 1 control and 6 test, were formed each with 7 subjects. In order to form scrotal hyperthermia, scrotums of rats in test groups were kept in double boiler at 43 °C for 30 minutes each day for 6 days, and scrotums of control rats were kept at 22 °C for 30 minutes each day for 6 days. Hyperthermia applied rats were sacrificed under 50 mg/kg ketamine anesthesia after 1, 14, 35, 70, 105 and 140 days, and biopsy materials of testis were collected for light and electron microscopic examinations. The collected materials were processed according to examinations to be done.

As a result of hyperthermia that we applied in our study, we observed damage on Leydig cells caused by scrotal hyperthermia. Light microscopic examinations indicated

damage of several Leydig cells in interstitial area in the acute period, decrease in number of testosterone positive Leydig cells, but little improvement in the chronic period. It was interesting to note deformation of tubular crystal mitochondria and distinct dilatations in endoplasmic reticulum cisterna in electron microscopic examinations of Leydig cells.

As a conclusion, we claim that temperatures higher than the body temperature may cause infertility by damaging Leydig cells.

Key Words: Leydig cell, scrotal hyperthermia, testosterone, infertility, rat

## KAYNAKLAR

- 1- Angelova P, Davidoff M, Bakalska M, Kanchev L. In vitro effects of substance P and arginin zasopression on testosterone production in Leydig cells of short and long photoperiodic hamsters. *Andrologia* 1996; 28:321-6.
- 2- Chowdhury AK, Steinberger E. Early changes in germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. *J Reprod Fertil* 1970; 22:205–12.
- 3- Mieusset R, Bujan L, Modinat C, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril* 1987; 48:1006–11.
- 4- Rommerts FF, de Jong FH, Grootegoed JA, van der Molen HJ. Metabolic changes in testicular cells from rats after longterm exposure to 37 8C in vivo or in vitro. *J Endocrinol* 1980; 85 (3):471–9.
- 5- Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997; 18: 294-301.
- 6- Lue Y, Hikim AP, Wang C, Im M, Leung A, Swerdloff RS. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the ‘two-hit’ approach to male contraceptive development. *Endocrinology* 2000; 141:1414–24.
- 7- Jannes P, Spiessens C, Van der Auwera I, D’Hooghe T, Verhoeven G, Vanderschueren D. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Hum Reprod* 1998; 13:372–5.

- 8- Husmann DA, Levy JB. Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology* 1995; 46:267-76.
- 9- Sharpe RM, Maddocks S, Millar M, Saunders PTK, Kerr JB, McKinnel C. Testosterone and spermatogenesis; Identification of stage-dependent, androgen-regulated proteins secreted by adult rat seminiferous tubules. *J Androl* 1992; 13:172-84.
- 10- Murphy BD, Lalli E, Walsh LP, Liu Z, Soh J, Stocco DM, Sassone-Corsi P. Heat shock interferes with steroidogenesis by reducing transcription of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Mol Endocrinol* 2001;15:1255–63.
- 11- Troiano L, Fustini MF, Lovato E, Frasoldati A, Malorni W, Capri M, Grassilli E, Marrama P, Franceschi C. Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 202:1315-21.
- 12- Mahin D, Maines F, James FE. Stress Response of the Rat Testis: In Situ Hybridization and Immunohistochemical Analysis of Heme Oxygenase-1 (HSP32) Induction by Hyperthermia. *Biol Reprod* 1996; 54:1070-9.
- 13- Lynch R, Lewis-Jones DI, Machin DG, Desmond AD. Improved seminal characteristics in infertile men after a conservative treatment regimen based on the avoidance of testicular hyperthermia. *Fertil. Steril* 1986; 46: 476–9.
- 14- Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. (Çeviri: Baflar M). Diz üstü bilgisayar kullanıcılarında skrotum ısısında artış. *Hum Reprod* 2005; 20(2):452-5.
- 15- Missuet R, Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. Effects of artificial cryptorchidism on sperm morphology. *Ferti Steril* 1987; 47:150-5.
- 16- Chowdhury AK, Steinberger A. Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. *J Reprod Fert* 1970; 22:205-12.
- 17- Junqueira LC, Carneiro J (Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S). *Temel Histoloji*. Nobel Tıp Kitabevi; 2006:431-47.
- 18- Dere F. *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı*. 5. Baskı, Adana; Nobel Kitabevi, 1997:987-1007.
- 19- Sadler TW (Çeviri: Başaklar C). *Longman's Medikal Embriyoloji*. Palme Yayıncılık; 1996:273-4.

- 20- Hassa O, Aştı RN. Embriyoloji. 3.Baskı, Ankara; Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd Şti, 1997: 133-6.
- 21- Şeftalioğlu A. İnsan Embriyolojisi Genel ve Özel. 3.Baskı, Ankara; Tıp ve Teknik Yayıncılık Ltd Şti, 1998: 348-50.
- 22- Christensen AK. Leydig cells. In: Greep RO, Astwood EB, Hahninton DW, Geiger S (Eds). Handbook of Physiology. Washington; American Physiological Society, 1975: p.57-94.
- 23- Jost A, Vigier M, Pripin J, Perchellet JP. Studies on sex differentiation in mammals. Recent Prog Horm Res 1973; 29:1-33.
- 24- Magre S, Jost A. The initial phases of testicular organogenesis in the rat. Arch Anat Microsc Morphol Exp 1980; 69:297-318.
- 25- Habert R, Picon R. Testosterone, dihydrotestosterone and estradiol 17-p levels in maternal and in fetal testes in the rat. J Steroid Biochem 1984; 21:193-8.
- 26- Warren DW, Huhtaniemi IT, Tapanainen J, Dufau ML, Catt KJ. Ontogeny of gonadotropin receptors in the fetal and neonatal rat testis. Endocrinology 1984; 114:470-6.
- 27- Lording DW, De Krester DM. Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. J Reprod Fertil 1972; 298:261-9.
- 28- Kuopio T, Tapanainen J, Pelliniemi LJ, Huhtaniemi I. Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. Development 1989; 107:213-20.
- 29- Kerr JB, Knell CM. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. Development 1988; 103:535-44.
- 30- Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL. Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. Endocrinology 1989; 124:762-70.
- 31- Kerr JB, Sharpe RM. Follicle-stimulating hormone induction of Leydig cell maturation. Endocrinology 1985; 116:2592-604.
- 32- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biol Reprod 1973; 9:500-2.



- 33- Gartner LP, Hiatt JL. Color Text of Histology, Second Edition, USA; WB Saunders Company, 2003: 496-9.
- 34- Kierszenbaum AL (Çeviri: Demir R). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık; 2006:547-8.
- 35- Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. Malatya; Pelikan Yayıncılık, 2004:310.
- 36- Haider SG. Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. *Int Rev Cytol* 2004; 233:181-241.
- 37- Ichihara I, Kawamura H, Pelliniemi LJ. Ultrastructure and morphometry of testicular Leydig cells and the interstitial components correlated with testosterone in aging rats. *Cell Tissue Res* 1993; 271:241–55.
- 38- Stocco DM. Acute regulation of Leydig cell steroidogenesis. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds). *In The Leydig Cell*. Vienna; Cache River Press, 1996: pp. 241–58.
- 39- Stocco DM. An update on the mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1999; 107:229–35.
- 40- Papadopoulos V. Peripheral benzodiazepine receptor: Structure and function in health and disease. *Ann Pharm Fr* 2003; 61:30–50.
- 41- Habert R, Lejeune H, Saez, JM. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 179:47–74.
- 42- Haider SG, Passia D, Overmeyer G. Studies on fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochem* 1986; 32: 197–202.
- 43- Phillips DM, Lakshmi V, Monder C. Corticosteroid 11 $\beta$ -dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology* 1989; 125:209–16.
- 44- Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol Reprod* 2001; 65:1252–9.
- 45- Shan LX, Zhu LJ, Bardin W, Hardy MP. Quantitative analysis of androgen receptor messenger ribonucleic acid in developing Leydig cells and Sertoli cells by in situ hybridization. *Endocrinology* 1995; 136:3856–62.

- 46- Shan LX, Bardin W, Hardy MP. Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. *Endocrinology* 1997; 138:1259–66.
- 47- O’Shaughnessy PJ, Johnsten H, Willerton L, Baker PJ. Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J Cell Sci* 2002; 115:3491–96.
- 48- Haider SG, Hettwer H, Passia D, Servos, G. Ultrastructural and enzyme histochemical changes in the rat Leydig cell induced by an antiandrogen (Flutamide). *Fertility* 1994; 10:42–47.
- 49- Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Lavellet J. Sources of estrogens in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl* 1999; 22:211–23.
- 50- Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Levallet J. Reproductive system: Aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 193:137–43.
- 51- Genissel C, Carreau S. Regulation of the aromatase gene expression in mature rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178:141–6.
- 52- Rouiller-Fabre V, Lecref L, Gautier C, Saez JM, Habert R. Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 1998; 139:2926–34.
- 53- Racine C, Forest MG, Louis F, Ferre A, Huhtaniemi I, Josso N, di Clement N. Receptors for anti-mullerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:594–9.
- 54- Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne, HBS. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 2001; 65:660–71.
- 55- Lue Y, Sinha HAP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C. Single exposure to heat induced stage-specific germ cell apoptosis in rats: Role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999; 140:1709-17.
- 56- Zhang XS, Lue YH, Guo SH, Yuan JX, Hu ZY, Han CS, Sinha HAP, Swerdloff RS, Wang C, Liu YX. Expression of HSP105 and HSP60 during germ cell apoptosis in the heat-treated testes of adult cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Front Biosci* 2005; 10:3110-21.

- 57- Wang C, Cui YG, Wang XH, Jia Y, Hikim AS, Lue YH, Tong JS, Qian LX, Sha JH, Zhou ZM, Hull L, Leung A, Ronald S. Swerdloff. Transient Scrotal Hyperthermia and Levonorgestrel Enhance Testosterone Induced Spermatogenesis Suppression in Men through Increased Germ Cell Apoptosis. *J Clin Endocrin Metab*. In press 2007.
- 58- Kus I, Akpolat N, Ozen OA, Songur A, Kavaklı A, Sarsilmaz M. Effects of melatonin on Leydig cells in pinealectomized rat: an immunohistochemical study. *Acta Histochem* 2002; 104(1):93–97.
- 59- Oner J, Oner H, Colakoglu N, Kukner A, Ozan E. The effects of triiodothyronine on rat testis: a morphometric and immunohistochemical study. *J Mol Hist* 2006; 37:9-14.
- 60- Andersson AM, Jorgensen N, Larsen LF, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:3161–67.
- 61- de Kretser DM, Burger HG, Fortune D, Hudson B, Long A, Paulsen CA, Taft HP. Hormonal, histological and genetic studies on male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 35:392–401.
- 62- Nieschlag E, Wickings EJ, Mauss J. Endocrine testicular function in vivo and in vitro in infertile men. *Acta Endocrinol* 1979; 90:544–51.
- 63- Rich KA, de Kretser DM. Effect of differing degrees of destruction of the rat seminiferous epithelium on levels of FSH and androgen binding protein. *Endocrinology* 1977; 101:959–74.
- 64- Rich KA, Kerr JB, de Kretser DM. Evidence for Leydig cell dysfunction in rats with seminiferous tubule damage. *Mol Cell Endocrinol* 1979; 13:123–35.
- 65- Setchell BP. The parkes lecture: heat and the testis. *J Reprod Fertil* 1998; 114:179-94.
- 66- Bowler K. The effect of repeated applications of heat on spermatogenesis in the rat: a histological study. *J Reprod Fertil* 1972; 28:325-33.
- 67- Van Straaten HWM., Ribbers-Der RR, Wensing CJG. Early deviations of testicular Leydig cells in the naturally unilateral cryptorchid pig. *Biol Reprod* 1978; 19:171-6.

- 68- Van Straaten HWM, Wensing CJG. Histomorphological aspects of testicular morphogenesis in the naturally unilateral cryptorchid pig. *Biol Reprod* 1977; 17:473-9.
- 69- Damber JE, Bergh A, Janson PO. Testicular blood flow and testosterone concentrations in the spermatogenic venous blood in rats with experimental cryptorchidism. *Acta endocr* 1978; 88:611-8.
- 70- Bergh A, Damber JE. Morphometric and functional investigation on the Leydig cells in experimental unilateral cryptorchidism in the rat. *Int J Andology* 1978; 1:549-62.
- 71- Liu Z, Stocco DM. Heat shock-induced inhibition of acute steroidogenesis in MA-10 cells is associated with inhibition of the synthesis of the steroidogenic acute regulatory protein. *Endocrinology* 1997; 138:2722-8.
- 72- Ren L, Medan MS, Ozu M, Li C, Watanabe G, Taya K. Effects of experimental cryptorchidism on sperm motility in adult male rats. *J Reprod Dev* 2006; 52:219-28.
- 73- Lue Y, Lasley BL, Laughlin LS, Swerdloff RS, Hikim APS, Leung A, Overstreet JW, Wang C. Mild Testicular Hyperthermia Induces Profound Transitional Spermatogenic Suppression Through Increased Germ Cell Apoptosis in Adult Cynomolgus Monkeys (*Macaca fascicularis*) *J Androl* 2002; 23:799-805.
- 74- Damber JE, Bergh A, Janson PO. Leydig cell function and Morphology in the rat testis after exposure to heat. *Andrologia* 1980; 12:12-19.
- 75- Ezeasor DN. Light and electron microscopical observations on the Leydig cells of the scrotal and abdominal testes of naturally unilateral cryptorchid West African dwarf goats. *J Anat* 1985; 141:27-40.
- 76- 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; 60:1437-45.
- 77- Bergh A. Effect of cryptorchidism on the morphology of testicular macrophages: Evidence for a Leydig cell-macrophage interaction in the rat testis. *Int J Androl* 1985; 8:86-96.

- 78- Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo C, Aguilar E, Van Rooijen N. Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of Leydig cells in the adult rat. *J Androl* 1994; 15:558–64.
- 79- Gaytan F, Romero JL, Morales C, Reymundo C, Bellido C, Aguilar E. Response of testicular macrophages to EDS-induced Leydig cell death. *Andrologia* 1995; 27:259–65.
- 80- LeVier RR, Spaziani E. The influence of temperature on spermiogenesis in the rat testis. *J Exp Zool* 1968; 169:113-20.
- 81- Farrer SH, Sikka SC, Xie HW, Constantinide D, Raifer J. Impaired testosterone biosynthesis in cryptorchidism. *Fertil Steril* 1985; 44:125-32.
- 82- Trigatti BL, Rigotti A, Braun A. Cellular and physiological roles of SR-BI, a lipoprotein receptor which mediates selective lipid uptake. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529:276–86.
- 83- Shi Z, Zhang H, Liu Y, Xu M, Dai J. Alterations in Gene Expression and Testosterone Synthesis in the Testes of Male Rats Exposed to Perfluorododecanoic Acid. *Toxicol Sci* 2007; 98(1):206–15.

## RESİMLEMELER LİSTESİ

Sayfa No

<b>Resim 1:</b> Kontrol, H+E, X400.....	17
<b>Resim 2:</b> Kontrol, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400.....	17
<b>Resim 3:</b> Kontrol, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X6000.....	18
<b>Resim 4:</b> Hipertermi sonrası 1.gün, H+E, X400.....	20
<b>Resim 5:</b> Hipertermi sonrası 1.gün, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması, X400..._	20
<b>Resim 6:</b> Hipertermi sonrası 1.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X2500.....	21
<b>Resim 7:</b> Hipertermi sonrası 1.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X20000.....	21
<b>Resim 8:</b> Hipertermi sonrası 14.gün, H+E, X400.....	23
<b>Resim 9:</b> Hipertermi sonrası 14.gün, İmmünoperoksidaz, hematoksilen zıt boyaması,X400.._	23
<b>Resim 10:</b> Hipertermi sonrası 14.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X6000.....	24
<b>Resim 11:</b> Hipertermi sonrası 14.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X15000.....	24
<b>Resim 12:</b> Hipertermi sonrası 35.gün, H+E, X400.....	26
<b>Resim 13:</b> Hipertermi sonrası 35.gün,İmmünoperoksidaz,hematoksilen zıt boyaması,X400.._	26
<b>Resim 14:</b> Hipertermi sonrası 35.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X12000.....	27
<b>Resim 15:</b> Hipertermi sonrası 35.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X6000.....	27
<b>Resim 16:</b> Hipertermi sonrası 70.gün, H+E, X400.....	29
<b>Resim 17:</b> Hipertermi sonrası 70.gün, İmmünoperoksidaz,hematoksilen zıt boyaması,X400.._	29
<b>Resim 18:</b> Hipertermi sonrası 70.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X20000.....	30
<b>Resim 19:</b> Hipertermi sonrası 70.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X4000.....	30
<b>Resim 20:</b> Hipertermi sonrası 105.gün, H+E, X400.....	32
<b>Resim 21:</b> Hipertermi sonrası 105.gün,İmmünoperoksidaz,hematoksilen zıt boyaması,X400.._	32
<b>Resim 22:</b> Hipertermi sonrası 105.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X12000.....	33

<b>Resim 23:</b> Hipertermi sonrası 105.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X5000 .....	33
<b>Resim 24:</b> Hipertermi sonrası 140.gün, H+E, X400 .....	36
<b>Resim 25:</b> Hipertermi sonrası 140.gün, İmmünoperoksidaz, hematoksilin zıt boyaması, X400	36
<b>Resim 26:</b> Hipertermi sonrası 140.gün, Uranil asetat-Kurşun sitrat, X6000 .....	37

## ÖZGEÇMİŞ

Cevat Aktaş, 1978 yılında Eskişehir’de doğdu. Eskişehir Cumhuriyet Lisesini bitirdikten sonra 1996 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimine başladı. 2000 yılında Biyolog ünvanı alarak mezun oldu. 2000 yılında Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2003 yılında “Benzenin Hemopoietik Dokular Üzerine Etkilerinin İn Vivo İncelenmesi” başlıklı tez çalışması ile uzman ünvanını aldı. 2003 yılında Anadolu Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Orta Öğretim alan Öğretmenliği Bilim Dalı Biyoloji Öğretmenliği bölümünde Tezsis Yüksek Lisans Eğitimine başladı. 2004 yılında Biyoloji Öğretmeni ünvanı ile Tezsis Yüksek Lisans Eğitimini tamamladı. 2004 yılında askere giderek, 2005 yılında vatani görevini tamamladı. 2005 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda eğitimini sürdürmektedir.