

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM
DALI**

**FERTİL VE İNFERTİL ERKEKLERİN SEMİNAL
PLAZMA VE KAN SERUM LEPTİN DEĞERLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TEZ DANIŞMANI: DOÇ.DR.N.KEMAL KUŞCU

**UZMANLIK TEZİ
DR.CAN POSTACI**

MANİSA 2007

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi, beceri ve deneyimlerinden faydalandığım anabilim dalı başkanı, hocam sayın;
Prof.Dr..Faik M. KOYUNCU'ya,

Asistanlığım ve tez çalışması sırasında bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen tez hocam sayın;
Doç.Dr.N.Kemal KUŞCU'ya,

Asistanlığım boyunca hem meslek hem de sanat olan hekimliğini öğrenmemde bilgi ve beceri açısından katkıları olan hocalarım sayın;
Prof.Dr.Semra ORUÇ KOLTAN'a
Doç.Dr.Ümit SUNGURTEKİN İNCEBOZ'a
Doç.Dr.H.Tayfun ÖZÇAKIR'a
Doç.Dr.Yeşim BAYTUR'a
Yard.Doç.Dr.Yıldız UYAR'a

Kısa sürede tezimin yazılabilmesi için leptin ölçümlerini yapan Biyokimya A.D.'dan sayın Doç.Dr.Ahmet VAR'a,

Klinikte beraber çalıştığım asistan doktor, hemşire ve tüm çalışma arkadaşlarıma,

Yaptığım ikinci ihtisasımda bana her açıdan yardımcı ve her zaman destek olan babam Yılmaz POSTACI, annem Gülser POSTACI, kardeşim Cem POSTACI ve biricik anneannem Zehra GÖZEN'e

En içten dileklerimi sunar tüm kalbimle teşekkür ederim.

Dr.Can POSTACI

Manisa/2007 Eylül

İÇİNDEKİLER

ÖZET	1
GİRİŞ	3
GENEL BİLGİLER	4
GEREÇ VE YÖNTEM	23
BULGULAR	25
TARTIŞMA	27
KAYNAKLAR	30

ÖZET

Leptin, Ob geninin genellikle adipositlerden salgılanan protein ürünü olup temel olarak; vücut ağırlığının dengelenmesinde rol oynar. Kadın fertilitesi ve pubertal gelişim üzerindeki işlevleri hakkında birçok yayın ve bulgu olmasına rağmen erkek üreme fonksiyonlarındaki işlevi hakkında elimizde sınırlı bilgi vardır. Leptin başlıca erkek germ hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonu, spermatozoaların kapasitasyonu için gereken yakıtın sağlanması (glukojen sentezi) ve spermatozoaların hareketliliğinde rol oynar.

Amacımız, kontrol ve infertil erkeklerde hem kan serumunda hem de seminal plazmada leptin seviyelerini ölçmek ve infertil erkek grubunda kontrol grubuna göre farklı seviyede olup olmadığını görmek idi.

Çalışmamıza 13 tane infertil ve 10 tane de kontrol olmak üzere toplam 23 olgu alındı. Olgulardan venöz kan örnekleri ve semen örnekleri temin edildi. RİA yöntemi ile serum ve seminal plazmadaki leptin seviyeleri ölçüldü.

Serum leptin değerleri fertil grupta kontrol grubundakilere göre anlamlı derecede yüksek olarak saptandı. Seminal plazma leptin seviyeleri ise her iki grupta da benzer düzeylerde saptandı.

Sonuç olarak infertil gruptaki hastalarda serum leptin seviyelerinin kontrol grubuna göre daha düşük olması, düşük leptin seviyelerinin spermatogenetik disfonksiyona neden olabileceğini düşündürmektedir. Normal grup ile infertil grup seminal plazma leptin seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması da leptin eksikliğinin nereden kaynaklandığı konusunda bize aydınlatıcı olmamaktadır.

SUMMARY

Leptin is the protein product of Ob gene, which is mainly expressed from the adipose tissue and regulates the weight homeostasis of the body. There are few documents related with the action of leptin on male reproduction. Up to date, leptin has been affiliated with the differentiation and proliferation of the male germ cells, providing the fuel needed for the capacitation of the spermatozoas and the development of the motility of the germ cells.

Our goal was to measure the quantity of leptin in serum and seminal plasma of the fertile and infertile men and to assess if there were any significant differences between them.

Totally 23 male volunteers, consisting 13 infertile and 10 fertile with respect to standard semen analysis, were included in our study. Both venous blood and semen samples were taken and serum from the venous blood, seminal plasma from the semen samples were obtained.

Serum leptin values are higher in fertile men with respect to the infertile group, which is statistically significant. On the other hand seminal plasma values between the fertile and infertile men are not different which are also statistically approved.

Consequently, low levels of leptin in serum of the control group does not support the concept of compensatory increase of leptin in the males who has spermatogenic dysfunction. The ambiguity of leptin levels in seminal plasma is also not leading us to the source of leptin deficiency.

GİRİŞ

Leptin; 167 aminoasit içeren bir protein olup, (OB) obezite geninin bir ürünüdür ve başlıca adipositlerden (1) olmak üzere fibroblastlardan (2) ve seminifer tübüllerden (3) salgılanır. Leptin esas olarak vücuttaki enerji ve yakıtın yeterli olduğunu, diğer hücrelere sinyal göndererek ortaya koyar ve bu yakıtın kullanılması ve dolayısı ile enerji harcanmasını teşvik eder.

Vücut yağ kitlesi, vücuttaki leptin seviyesini düzenleyen temel faktör olmasına karşın, insülin, glukokortikoidler ve prolaktin leptin sentezini artırıcı yönde, tiroid hormonları, büyüme hormonu, somatostatin, serbest yağ asitleri, uzun süre soğuğa maruz kalma ve katekolaminler ise azaltıcı yönde etki gösterirler. Östrojen adipositlerden leptin salınımını artırırken, androjen azaltır (4). Yetişkinlerde leptin; GnRH salınımını, Nöropeptid Y üzerine inhibitör etki göstererek artırır (5).

Ejakulatdaki spermatozoaların oositi dölleyebilmeleri için birtakım süreçlerden geçmeleri gerekir. Bunların arasında 'Kapasitasyon' büyük bir önem taşır. Spermatozoaların kapasitasyonu sırasında, metabolik hız ve enerji harcanması artar (6). Aquila ve arkadaşları tarafından insan ejakulatında leptin sekresyonunun saptanması (7), erkek gamet hücrelerinin kendi metabolizmalarına sistemik leptinden bağımsız olarak etki edebildiklerini ortaya koymaktadır. İnsan ejakulatındaki leptinin özellikle spermin kapasitasyonu sırasında artan enerji ihtiyacına katkıda bulunması spermatozoaların fertilitelerini koruyucu bir etki göstermektedir. Çünkü oositin döllemesine kadar geçen sürede spermatozoalar için uzun bir kalori-kısıtlı (bir çeşit açlık) dönem vardır. Leptin başlıca spermatozoaların kapasitasyonu için gereken yakıtın sağlanması (glukojen sentezi), erkek germ hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonu, ve spermatozoaların hareketliliğinde rol oynar (3,7,8,9). Özetle; erkek germ hücrelerinin olgunlaşarak oositi dölleyebilmesi için gereken basamaklar - diğer birçok faktör yanında - leptinin de etkisi altında gerçekleşir.

Çalışmamızda; leptin molekülünün bu özelliklerinden yola çıkarak fertil ve infertil (temel spermioqram parametreleri-sayı, hareket ve yapı-bozuk olan) erkeklerde hem kan serumunda hem de seminal plazmada leptin seviyelerini ortaya koyarak arada bir fark olup olmadığını görmeyi amaçladık.

GENEL BİLGİLER

İNFERİLİTE

İnfertilite, çiftlerin bir yıl süre ile korunmaksızın düzenli cinsel ilişkide (haftada en az iki gün) bulunmasına rağmen gebe kalamamasıdır. Üreme çağındaki çiftlerin %10-15'ini etkilemektedir. Normalde her adet döngüsünde sadece %25 gebelik şansı vardır. Kadınlarda fertilité 20-25 yaşlarında pik yapar, 35 yaşından sonra kaliteli oosit yapımı azalır, 40 yaşından sonra minimaldir. Erkeklerde ise 20-30 yaşlarında pik yapar, 40 yaşından sonra hafif azalır ve ileri yaşlara kadar devam eder. İnfertil çiftlerde, sadece erkek faktörü yaklaşık %20 iken, kadın ile beraber ve açıklanamayan grup da içine alındığında bu oran %50'lere varmaktadır. Üreme çağındaki erkeklerin %6'sında infertilite problemi ortaya çıkmaktadır. Bu olguların yaklaşık %90'ında da bozulmuş bir spermatogenez vardır (10).

ERKEK İNFERTİLİTESİ

ERKEK ÜREME FİZYOLOJİSİ

Erkek üreme fizyolojisi a) *spermatogenez*, b) *ejakülasyon*, c) *kapasitasyon ve fertilizasyon* olarak üç başlıkta incelenir. Erkek üreme fizyolojisinin ilk basamağı olan spermatogenezi kontrol eden genler Y kromozomunun uzun kolunun orta kesimindedir. Spermatogenez için vücuttakinden 2°C daha düşük bir skrotum sıcaklığı, arteriyel kandakinin yarısı kadar doku oksijen basıncı ve yeterince testosteron konsantrasyonuna ihtiyaç vardır. Testosteron Leydig hücrelerince luteinizan hormon (LH) etkisi altında üretilir. Testosteron reseptörleri Leydig, Sertoli ve peritubuler hücrelerde saptanmıştır ancak germ hücrelerinde saptanamamıştır. Normal seviyelerde sperm üretimi için normal seviyelerde hem FSH hem de LH olması gerekmektedir. Yaklaşık 70 gün süren spermatogenez süreci testiste, seminifer tubulusları döşeyen Sertoli hücrelerinde başlar. Bu süreç hipotalamik GnRH'nin kontrolündedir ve ön hipofizden gonadotropinleri salgılatır. LH – Leydig - Testosteron ile FSH – Sertoli - İnhibin B negatif feed-back aksları vardır. Sertoli hücresi içindeki spermatogonyaya primer ve sekonder spermatozoid basamaklarıyla bölünerek mayoza girer. Haploid yuvarlak spermatidler oluşur, bunlarda daha başka bölünme olmadan spermatozoa'ya farklılaşırlar. Akrozomal başlık yoğun DNA içeren sperm başını zarf gibi sarar. Salınan

spermatozoalar, epididimiste 2-14 günlük seyri esnasında olgunlaşırlar. Epididimiste, semen içine, hareket ve dölleme potansiyeli kazandıran proteinler sekrete edilir.

ERKEK İNFERTİLİTESİNİN NEDENLERİ

Dünya Sağlık Örgütü tarafından 7273 evli infertil çift üzerinde, infertilite nedenine göre yapılan bir çalışmada %41 oranında kadın, %24 oranında erkek, %24 kadın ile erkek beraber ve %11'inde de bir neden gösterilememiştir (11). Buradan da anlaşılacağı gibi infertil çiftlerin yarıya yakınında (%48'inde) erkek faktörü de işin içine girmektedir.

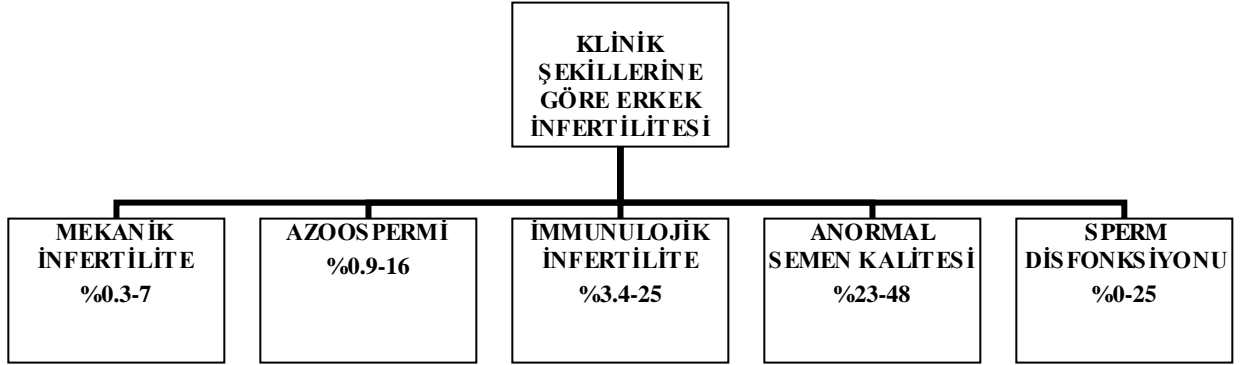
ESHRE (Avrupa Üreme ve Embriyoloji Derneği) tarafından infertil erkekler üzerinde yapılan geniş ölçekli bir çalışmada ise, yapılan tüm değerlendirmelere rağmen yaklaşık hastaların 1/3'üne tanı konulamamıştır. Bundan sonraki ikinci geniş grup ise varikozel grubudur (12). Aşağıda bu çalışmaya ait erkek infertilite nedenleri görülmektedir;

1. Nedeni açıklanamayan grup %31.1
2. Varikozel % 15.6
3. Endokrin hipogonadizm %9.0
4. Subklinik enfeksiyonlar %8.0
5. İnmemiş testis %7.8
6. Eretil disfonksiyon, hipospadias %6.0
7. İmmünojenik %4.5
8. Genel ve sistemik hastalıklar %3.1
9. Obstrüktif patolojiler %1.7
10. Jinekomasti %1.1
11. Testis tümörleri % 0.3
12. Maligen hastalıklarda semen dondurulması %6.5
13. Diğer çeşitli nedenler %5.5

Dünya Sağlık Örgütünün 'İnfertil Çiftlerin Standardize Edilmiş Araştırma ve Tanısı' ile ilgili elkitabında erkek faktörünün etiyojenik grupları şu şekilde verilmektedir;

- 1) Seksüel / Ejakülatuar disfonksiyon
- 2) İmmünolojik nedenler
- 3) Neden belirlenememiş grup
- 4) İzole seminal plazma anormallikleri
- 5) İatrojenik nedenler
- 6) Sistemik nedenler
- 7) Konjenital anomaliler
- 8) Akkiz testiküler hasar
- 9) Varikozel
- 10) Aksesuar bezlerin enfeksiyonu
- 11) Endokrin nedenler
- 12) İdiopatik oligozoospermi
- 13) İdiopatik astenozoospermi
- 14) İdiopatik teratozoospermi
- 15) Obstrüktif kriptozoospermi
- 16) Obstrüktif azoospermi
- 17) İdiopatik azoospermi

Erkek infertilitesi klınık şekıllerıne göre 5 ana grıpta sınıflandırılmaktadır (13).



Tip I- Mekanik infertilite

Yetersiz koitus söz konusudur. Bu anatomik bozukluklar, erektil veya ejakülatuar bozukluklar nedeniyle olabilir.

Tip II- Azoospermi

Ejakülatta spermin olmaması halidir. İnfertil erkeklerde %10-15 oranında gözlenir. Primer veya

sekonder testiküler yetmezlik durumlarında (nonobstrüktif) veya genital trakt obstrüksiyonlarında ortaya çıkar (obstrüktif).

Tip III- İmmünolojik infertilite

Sperm fonksiyonu antikor bağlanması ile bozulmuştur. Sperm sayısının normal olduğu izole hareket bozuklukları, sperm agglütinasyonu ya da anormal post koital test varlığında ASA (Anti Sperm Antikor) değerlendirilmesi yapılmalıdır.

Tip IV- Anormal semen kalitesi

Üç ana değişken olan sayı hareket ve morfolojide ya tek tek ya da 2'li 3'lü kombinasyonlar şeklinde bozukluk vardır.

Tip V- Sperm disfonksiyonu

Üç ana parametre olan sayı hareket ve morfolojide bir bozukluk yoktur fakat spermler dölleme olayını gerçekleştirememektedirler. (Açıklanamayan infertilite)

Semen değişkenleri (başta sayı hareket ve yapı olmak üzere) için aşağıdaki terminoloji kullanılmaktadır.

Normozoospermi: Referans değerlerle tanımlanan normal ejakülat

Oligozoospermi: Referans değerden düşük sperm konsantrasyonu

Asthenozoospermi: Hareketlilik için referans değerden daha düşük değer

Teratozoospermi: Morfoloji için referans değerden daha düşük değer

Oligoasthenoteratozoospermia: Her üç değişkenin de bozukluğuna işaret eder (sadece iki ön-ekin kombinasyonu da kullanılabilir)

Azoospermi: Ejakülatta hiç spermatozoa bulunmaması

Aspermi: Hiç ejakülat elde edilememesi

Erkek infertilitesindeki etiyolojik grupları testislere göre başka bir sınıflandırmaya tabi tutacak olursak :

A) PRETESTİKÜLER NEDENLER

1) Kromozomal

a)Klinefelter Sendromu

2) Hormonal

a)Hipogonadotropik hipogonadizm

b)Hiperprolaktinemi

3) Koital nedenler

a) Erektıl disfonksiyon (Psikoseksüel)

b) Endokrin / Nöral

i) Diabetik nöropati

ii) Parapleji

iii) İlaç nedenli

c) Ejakülatuar yetersizlik

i) Psikoseksüel

ii) Genito-üriner cerrahi

iii) Nöral

iv) İlaç nedenli

d) Koital sıklık

B) TESTİKÜLER NEDENLER

1) Konjenital

a) Kriptorşidizm

b) İmmotil silia sendromu (Kartagener

send.2 2) Enfeksiyon – Orşit

3) Vasküler

a) Torsiyon

b) Varikosele

4) Anti spermatojenik ajanlar

a) Kemoterapötikler

b) İlaçlar

c) Radyasyon

d) Isı

5) İmmünoojik

6) İdiopatik

C) POSTTESTİKÜLER NEDENLER

1) Obstrüktif

a) Epididimal

i) Konjenital

ii) Enfeksiyon

b) Vasal

i) Konjenital

ii) Akkiz

2) Epididimal geçiŖe bağlı : (Astenozoospermia)

3) Aksesuar bez enfeksiyonları

4) İmmünoojik

Erkeklerde infertiliteyi olumsuz yönde etkileyen faktörler arasında ilaçları, endüstriyel toksinleri (14) ve radyasyonu da sayabiliriz. Radyasyonun etkileri doza bağımlı olmakla beraber 600 cGy'den sonra geri dönüşümsüz olduğu kabul edilir (15).

FERTİLİZASYON SÜRECİ

Fertilizasyon, olgunlaşmasını tamamlamış, kapasite olmuş ve akrozom reaksiyonuna uğramış sperm kumulus ooforustan penetrasyonu ile başlayan bir süreçtir.

Kapasitasyon, spermi akrozom reaksiyonuna hazırlar. En belirgin değişiklik, sperm hareketliliğinde proksimal flagellumun aşırı kıvrılması olarak gözlenen hiperaktivasyondur. İn vivo koşullarda kapasitasyon, kadın alt genital organlarında meydana gelir. Kapasitasyon geridönüşümlü, biyokimyasal bir olaydır.

Akrozom Reaksiyonu ise, sperm başını bir kep gibi kaplayan akrozom adındaki organelin membranının eriyerek kaybolmasını içeren bir değişimdir. Akrozom reaksiyonu sperm oositle temas ettiği yerde meydana gelir. İn vivo olarak ise fallop tüplerinde gerçekleşir. akrozom reaksiyonu geri dönüşümsüz ve morfolojik olarak gözlenebilen bir olgudur. Gerçek akrozom reaksiyonu, yalnızca canlı spermelerde görüldüğünden, akrozomun dejenerasyonu dolayısıyla meydana gelen membran değişikliklerinden kaynaklanan '*yalancı akrozom reaksiyonu*'ndan ayırt edilmelidir. Akrozomun en önemli özelliği 'ekvatoryal segment' denilen bölümde barındırdığı akrozomal enzimlerdir. Bu enzimlerden en önemlisi *hyaluronidaz* olup sperm kumulus ooforusu geçmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Kumulusu geçen spermatozoa, zona pellicudaya sıkıca bağlanır. Zona pellicudaya bağlanmış sperm, bu sırada akrozomal kepini kaybetmeye dolayısıyla akrozom reaksiyonuna başlar. Böylece ekvatoryal segment denen akrozomal bölgenin alt kısmındaki bölümde yoğunlaşmış diğer akrozomal enzimler ve kapasitasyon ile hiperaktif olmuş sperm hareketliliği sayesinde sperm zona pellicudayı geçer.

Zona pellicudayı geçen sperm, perivitellin boşluğu geçip ooplazmaya tutunur. Bu ilk tutunma, ekvatoryal segmentin hemen üzerindeki bölümde meydana gelir. Bu tutunma sonrasında sperm ile oolemma arasındaki füzyon gerçekleşir ve sperm plazma membranı eriyerek sperm oositoplazma membranının bir parçası haline gelir. Sperm-oosit füzyonunu takiben, oosit metabolik olarak aktive olur ve kortikal granüllerin ekzositozunu takiben mayoz

bölünme tamamlanır. Kortikal granül aktivasyonu sayesinde zona proteinlerinin geçirgenliği değişir ve ek sperm girişi engellenir, buna oosit ‘**Zona Reaksiyonu**’ adı verilir.

Fertilizasyon öncesinde oosit nükleusu mayozun ikinci metafaz safhasında tutulmuştur. Redüksiyon bölünmesinden sonra oosit haploid nükleus içerir ve maternal pronükleusu oluşturur. Bu esnada sperm nükleusu decondense olur ve paternal pronükleusu oluşturur. Maternal ve paternal pronükleuslar yakın temas haline gelir ve nükleer zarfları disintegre olur. Kromozomları birleşir. Bu kromozomal birleşme fertilizasyonun sonu ve embriyonik gelişmenin başlangıcı olarak kabul edilir.

TANISAL TESTLER

İnsan sperminin fertilizasyon kabiliyeti ile ilgili yalnızca son on yıl içerisinde bile onlarca test tanımlanmıştır. Bunlardan çoğu deneysel olarak kullanılmış ve rutindeki yerini alamamıştır.

1. Klasik Semen Analizi

Erkek fertilizasyon potansiyelinin araştırılmasındaki ilk adım klasik semen analizidir

Klasik Semen Analizi

Görünüm:	Homojen, gri-opak
Viskozite:	<2cm
Likefaksiyon Süresi:	<60dk.
Volüm:	>2ml
pH:	7.2-8.0
Sperm Sayısı:	>20milyon/ml
Total Sperm Sayısı:	>40milyon/ejakulat
Total Motilite:	>%50
(a)Hızlı ileri hareket:	>%25
Morfoloji:	>%30 WHO kriteri (>%14 Kruger strict kriteri)
Beyaz küre:	<1milyon/ml
İmmünobead test:	<%20 partikülle kaplı sperm
MAR Testi:	<%10 partikülle kaplı sperm

Bioasseyler

Hemizona indeks:	>%35
HOS Test :	>%60 şişme
Sperm Penetrasyon Assay :	>%10 penetrasyon

Diğer Testler

α -Glukozidaz (nötral) :	>20mU.
Çinko (total) :	>2.4mmol
Sitrik asit (total) :	>52mmol
Asit fosfataz (total) :	>200U.
Fruktoz (total) :	>13mmol

Klasik semen analizi için incelenecek ejakülat 3 ila 8 günlük cinsel perhiz sonrasında masturbasyon ile steril bir kaba alınmalı ve en geç 30 dakika içerisinde tetkik yapılacak yere getirilmiş olmalıdır. Ejakülatın makroskopik muayenesinde görünümü, miktarı, likefaksiyon zamanı, viskozitesi ve pH'ı değerlendirilir. Semen analizinin en önemli kısmını ise mikroskopik inceleme oluşturmaktadır. Mikroskopik incelemede sperm sayısı, hareketliliği, yuvarlak hücre sayısı, aglütinasyonun varsa derecelendirilmesi, morfoloji ve yuvarlak hücrelerin sınıflandırılması incelenir.

2. İmmünolojik Testler

Spermatogenez esnasında sperm yüzeyinde antijenler oluşmaktadır. Gerek erkek, gerekse dişi üreme organlarının yapısal bütünlüğü ve epiteliyal döşemesi, sperm antijenlerinin sistemik kan ya da lenf akımına karışmasını önleyici bir bariyer oluşturur. Erkeklerde vazektomi, testiküler veya epididimal yaralanma ya da enfeksiyonlar antisperm antikoru (ASA) oluşmasına neden olabilmektedir.

Anti Sperm Antikorları (ASA) Değerlendirilmesi

Literatürde ASA değerlendirmesi için pek çok teknik tanımlanmışsa da günümüzde en çok kullanılan iki yöntem mikst antiglobulin reaksiyon testi (MAR test) ve immünobead testidir (IBT). Dünya Sağlık Örgütü'nün verdiği alt değer, sperme yapışık partikül yüzdesini %10 olması ve bu değer üzerinde olan örneklerde muhtemel bir immünolojik faktör düşünülmesidir. MAR testinin IBT testine üstünlüğü pratik bir test olması ve IBT'de 0.5 ila 2ml'ye varan semen örneği gerekirken, MAR için gereken volümün 10 mikrolitre olmasıdır. ASA değerlendirilmesi özellikle semen analizinde aglütinasyonun saptandığı ve açıklanamayan infertilite olgularında ayırıcı tanı yönünden çok değerlidir.

Sperm Servikal Mukus Etkileşimi

Değerlendirme in vivo (Postcoital test, PCT) ya da in vitro (Slide testi, Kurzok Miller testi, Kremer testi) olarak yapılır. Postkoital test 100 yıl kadar önce Sims tarafından tanımlanmış olmakla birlikte, testin pratikliği ve duyarlılığı üzerine tartışmalar günümüzde de sürmektedir. Gerek pratikliği gerekse standardizasyonu dolayısıyla günümüzde pek çok merkez Kremer testi kullanmaktadır. Olası yanlış negatif sonuçlara engel olmak açısından bovin servikal mukusu, insan donör mukusu ve donör semeni kullanılarak da in vitro testler yapılabilmektedir. Servikal mukus fizyolojik olarak, progresif hareketli ve morfolojik olarak normal olan spermi süzer. Bu nedenle öncelikle bu iki parametrenin değerlendirilmesi gerekir.

3. Bioasseyler

Kreatinin Kinaz Değerlendirilmesi

Sperm enerji sentezi ve transportu açısından anahtar enzim olan kreatin kinaz, sperm kalitesini belirleyen hücresel marker olarak tanımlanmıştır. Sertoli hücrelerindeki spermatogenezisin önemli bir anahtar enzimi sperm sitoplazmik ekstrasözöndaki defekt ile yükselir. Bu yükselme kreatin kinaz konsantrasyonları arasındaki doğru orantı tanısal test amacıyla kullanılmaktadır. Oligospermik olup da IVF ile fertilizasyon yeteneği kanıtlanmış semen örneklerindeki kreatin kinaz aktivitesinin fertilizasyon potansiyelini belirleyici özelliği ortaya konmuştur.

Akrozomal Enzim Aktivitesi Tayini

Akrozin ve hyalüronidaz sperm akrozom reaksiyonu ve fertilizasyon üzerindeki tartışılmaz yeri, bu proteinlerin aktivitesinin değerlendirilmesi ve tanısal testlerde kullanılmasına neden olmuştur. Spermatozoanın proteolitik potansiyelinin ölçülmesi, jelatin ile kaplı lamaların üzerine yayılıp inkübe edilen semen örnekleri ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemle gerek akrozin gerekse hyalüronidazın aktivitesi saptanır. Sperm başı çevresindeki halo oluşumu, aktivite göstergesi olarak değerlendirilip, sonuçlar halo oluşturan sperm yüzdesi ve oluşan haloların çapının ölçümü ve bu değerlerin ortalaması hesaplanarak değerlendirilir. Bu testlerin IVF sonuçlarını belirleyici değeri bilinmemektedir. Bu tekniğin dezavantajı, hasta grupları arasında akrozin sonuçlarının çakıştığı geniş bir aralık bulunmasıdır. Bu sebeple, globozoospermi gibi spesifik durumlarda tanımlayıcı test olarak kullanılmaktadır. Akrozomal aktivite değerlendirilmesine bir başka yaklaşım ise akrozom reaksiyonu yüzdesini ölçmektir. Her ne kadar, bunun değerlendirilmesindeki en iyi metot elektron mikroskopisi ise de, rutinde

bunu uygulamak mümkün değildir. Poliklonal antikorların yardımı ile akrozin dışında da birçok proteinin aktivitesi de değerlendirilebilmektedir.

4. Fonksiyon Testleri

Hipoosmatik Şişme Testi

Sperm membran bütünlüğünün fizyolojik ölçümü için kullanılan bir test olup Jeyendran ve ark. (16) tarafından tanımlanmıştır. Kolay uygulanabilir olmasına karşın, testin tanısal değeri konusunda ciddi soru işaretleri bulunmaktadır.

Sperm Penetrasyon Testi (SPT)

Yanagimachi ve arkadaşları (17) tarafından zonalarından arındırılmış hamster yumurtalarında insan spermlerinin penetrasyon kabiliyeti olarak tanımlanmıştır. Sperm kapasitasyonu, akrozom reaksiyonu, oolemma ile füzyonu ve ooplazmadaki dekondensasyonu ölçebilmektedir. Karşılaştırmalı çalışmalarda strict metodu ile morfoloji değerlendirilmesi uygulandığında, SPT ile normal morfolojinin yüksek derecede korelasyon gösterdiği, dolayısıyla testlerin birbirleri yerine kullanılabilir oldukları görülmüştür .

Hemizona Test (HZT)

Türe özgün özellikler nedeniyle insan spermi yalnızca insan oositlerinin zonalarıyla bağlanabilmektedir. Bu nedenle zona bağlanması yalnızca insan oositlerinin kullanımı ile test edilebilir. İkiye bölünmüş insan oositlerinden elde edilen zonalarla, gerek hastaların kendi spermleri gerekse donör spermleri kullanılarak aradaki fark değerlendirilebilmektedir. Tanısal değeri yüksek olmakla birlikte metodolojik yönden hem çok fazla materyal gerektirir hem de çok zahmetlidir.

LEPTİN

1994 yılında Zhang ve arkadaşları tarafından keşfedilen leptin, adını Yunanca leptos (ince) kelimesinden alan, sitokinlere benzeyen ve 167 aminoasit içeren protein yapısında bir hormondur (18). Molekül ağırlığı 16 kDA'dur ve vücutta birçok işlevde yer aldığı tespit edilmiştir (19). İnsanlarda 7. kromozomun uzun kolunda bulunan (7q31) Ob geninde kodlanmıştır. İlk defa ob/ob mutant farelerde (fonksiyonel olarak leptini olmayan) mutajenik gen ürünü olarak belirlenmiştir (20). Vücutta başlıca adipoz dokuda sentezlenen leptin'in, bir miktar plasenta, gastrik epitel, fibroblast, iskelet kası, hipofiz, meme bezi ve seminifer tübüller (3) tarafından da salgılandığı gösterilmiştir. Kanda iki formda bulunur; serbest ve proteine bağlı. Leptin'in aktivitesinden serbest formun sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda obez bireylerde serumdaki leptin'in büyük kısmının serbest formda olduğu tespit edilmiştir (21). Bu nedenle obez kişilerde serbest leptin formunun artışının tespit edilmesi, obezite gelişiminde asıl sorunun leptin eksikliği değil, leptin rezistansı olduğu hipotezini destekleyen kanıtlardan biri olarak görülmektedir. Leptin'in dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 30 dakikadır ve pulsatil olarak yemeklerden 2-3 saat sonra salgılanır. Diurnal ritmi vardır ve sabah erken saatlerde pik yaparken, öğleden sonra en düşük düzeylere iner. Serum düzeyleri kadınlarda erkeklere oranla daha yüksektir. Bu durum kadınlarda yağ dokusu fazlalığı ve ciltaltı / visseral yağ oranının daha fazla olması ile açıklanmaktadır (22).

LEPTİN SEKRESYONUNUN REGÜLASYONU

Leptin düzeyinin ana belirleyicisi vücut yağ kitlesi ve vücut kitle indeksi (VKİ) olsa da, bir çok faktör leptinin regülasyonunda rol almaktadır. İnsülin, glukokortikoidler ve prolaktin leptin sentezini artırırken, tiroid hormonları, büyüme hormonu, somatostatin, serbest yağ asitleri, uzun süre soğuğa maruz kalma ve katekolaminler leptin salınımını azaltırlar.

FONKSİYONLARI

Leptinin vücuttaki başlıca rolü, beyin (özellikle hipotalamus) üzerine negatif "feedback" etki ile gıda alımını ve enerji metabolizmasını düzenlemek ve obezite gelişmesini engellemektir (19). Ayrıca, metabolizmanın düzenlenmesi, cinsel gelişim, üreme, hematopoez, immünite, gastrointestinal işlevlerin düzenlenmesi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, anjiyogenez ve osteogenezis'de de önemli rolleri vardır.

LEPTİN RESEPTÖRLERİ (OB-R)

Leptin reseptörleri, sitokin ailesine olan aşırı benzerliği nedeniyle klas 1 sitokin reseptör ailesinden sayılmaktadır. Leptin IL-6 ve IL-11 ile yüksek oranda benzerlik gösterirken, leptin reseptörleri de IL-6 ile homoloji göstermektedir. Buna göre leptin reseptörleri; OB-Rb (uzun reseptörler) ve OB-Ra (kısa reseptörler) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. OB-Rb reseptörleri sinyal transdüksiyonu kapasitesine sahiptirler ve en çok hipotalamusta (nükleus arkuatus) bulunmalarına rağmen vücudun diğer dokularında da (akciğer, böbrek, karaciğer, iskelet kası, kalp, testis, hematopoetik hücreler, yağ dokusu) daha az miktarlarda saptanmışlardır. Kısa form reseptörleri (OB-Ra) ise intrasellüler sinyal iletiminde pek rol oynamazlar. OB-Ra reseptörleri, böbrek, akciğer, plexus koroideus ve beyin kapillerlerinde yoğun olarak saptanmıştır. Beyin kapillerleri ve plexus koroideus'da OB-Ra reseptörlerinin bol olarak bulunması, kısa form reseptörlerin leptinin merkezi sinir sistemine taşınmasında önemli görevleri olduğunu düşündürmektedir.

ETKİ MEKANİZMASI

Leptin vücut yağ kitlesi ile orantılı olarak dolaşımda bulunur ve santral sinir sistemine de plazma seviyeleri ile orantılı olarak geçer. Leptin'in ana etki mekanizması birçok hipo fizik hormonun düzenlenmesinde görev alan ve asıl etkisi iştahı artırmak olan Nöropeptid-Y'nin arkuat nükleus'dan salınımı ve ekspresyonunu inhibe etmektir (23). Bununla birlikte yapılan çalışmalar leptinin diğer birtakım mediyatörler ile de etkileşim içinde olduğunu ve kompleks bir iletişim ağı olduğunu göstermiştir. Bu mediyatörler başlıca anabolik ve katabolik olarak ikiye ayrılabilirler. Anabolik olanlar (Nöropeptid-Y gibi) günlük gıda alımını artırdığı gibi enerji harcanmasını da azaltarak pozitif enerji dengesine neden olurlar. Katabolik olanlar ise gıda alımını azaltırlar ve enerji harcanmasını artırırlar. Katabolik mediyatörlerden ilk tanımlanan ve en önemli olanı bir melanokortin ailesi üyesi olan α -melanosit stimulan hormon (α -MSH) dir. α -MSH, pro-opiomelanokortin (POMC) prekürsöründen oluşan bir moleküldür ve melanokortin reseptör ailesinin birçok üyesi için ligandır. Bu üyelerden en önemlileri primer olarak beyinde sentezlenen melanokortin 3 reseptörü (MC3R) ve melanokortin 4 reseptörü (MC4R) dir. Genetik olarak MC4R defektli farelerin obez olduğu ve bu reseptörün sentetik agonistinin verilmesi ile gıda alımının baskılandığının gösterilmesi, MC4R üzerinden sinyallerin gıda alımını ve yağ dokusundaki artışı sınırladığını göstermiştir. MC3R'deki genetik eksiklik vücutta fazla yağ depolanmasına neden olsa da bu etki ılımlı bir etkidir ve artmış gıda alımı söz konusu değildir. POMC nöronları nükleus arkuatus'da Nöropeptid-Y'ye oldukça yakın bulunurlar ve leptin tarafından regüle edilirler (24). Son zamanlarda tanımlanan

bir diğerk molekül de “Agouti-Related Peptide”(AgRP)’dir. AgRP hem MC3R hem de MC4R’ün endojen antagonistidir ve özellikle nükleus arkuatusdaki Nöropeptid-Y içeren nöronlarda sentezlenir (24). Nükleus arkuatus’daki POMC nöronları aynı zamanda “Cocaine-Amphetamine-Regulated Transcript (CART) adında yeni tanımlanmış bir transmitter daha salgırlar. CART hem normal hem de açlıkla indüklenmiş beslenmeyi inhibe eder. CART ayrıca Nöropeptid-Y’ye bağılı gelişen gıda alımını kompetitif olarak bloke eder. Tıpkı POMC mRNA’da olduğı gibi CART mRNA’nın da nükleus arkuatus’daki ekspresyonunun, leptin eksikliğı veya leptin sinyalinde defekt olan farelerde (obez fareler) belirgin olarak düşük olduğı gösterilmiştir (24). Enerji homeostazisinde nükleus arkuatus nöronlarının aktiviteleri de farklıdır. Örneğın paraventriküler nükleus (PVN) lezyonları obezite ile sonuçlanırken, lateral hipotalamik alan (LHA) lezyonları düşük vücut kilosunu korumaya yönelik olarak anoreksi ile sonuçlanır. Böylece nükleus arkuatus nöronları leptin sinyallerini bu iki nörona ulaştırırken, iki nöron arasında koordinasyon da sağlanmış olmaktadır. Kilo kaybına yanıt olarak LHA nöronları uygun şekilde aktive edilir ve beraberinde PVN nöronlarından anoreksijenik sinyal iletiminde azalma ile beraber gıda alımı da artırılır ve enerji harcanımı azaltılır. Böylece yağ depoları doldurularak kilo alımı sağlanmaya çalışılır. Tersine PVN nöronlarından artmış sinyal iletimi ile gıda alımı azalır (iştah kaybı), enerji harcanımı artar ve yağ depolarında azalma olur. Sonuçta leptin, beyinde kilo alımına neden olan anabolik sinyal iletimini inhibe, enerji harcanmasını arttıran katabolik sinyal iletimini aktive ederek fazla kilo alımına engel olur. Leptinden başka gastrointestinal sistemden de öğün boyutunu ve sıklığını düzenlemek için beyine sinyaller gelir. Bunların bir kısmı direkt olarak gastrointestinal kanalın gerilmesi sonucu mekanik impulslarla gelirken, büyük çoğunluğı vagus sinirinin afferent dalları ile ulaşır. Vagus’la ulaşan hormonal doygunluk sinyalinden ilk bulunanı ve en önemlisi Kolesistokin’in’dir. Leptin aynı zamanda kolesistokin’in ile uyum içinde çalışmaktadır. Leptin, kolesistokin’in’e olan duyarlılığı da arttırır ve böylece öğün hacmi azaltılmış olur (24). Nükleus Traktus Solitaryus (NTS), gastrointestinal sistemden gelen vagal afferent lifler ile ventral hipotalamus arasındaki başlıca iletişim ve integrasyon bölgesidir. Buradaki nöronlar aynı zamanda MC4R ve leptin reseptörlerini de eksprese ederler ve POMC nöronları da içerirler. Dolayısı ile NTS leptinin fonksiyonunda önemli bir merkezdir.

LEPTİN'İN DİĞER SİSTEMLERE ETKİLERİ

İmmün ve Hematopoetik Sistem

Leptin esas olarak hücrel immun yanıtta ve viral, bakteriyel enfeksiyonlara karşı savunmada rol oynar. Leptin lökosit sentezini uyarır ve eritropoietin hormonunun eritrositlere olan etkisini artırır (25). Makrofajları aktive ederek fagositozu güçlendirir ve onlardan pro ve anti-inflamatuar sitokin salınımını uyarır (26). Aynı zamanda yara iyileşmesini kısalttığı ve neovaskülarizasyonu arttırdığı da tespit edilmiştir (27).

Anjiyogenez

İnsan endotelial hücrelerinde leptin reseptörlerinin olduğu ve leptinin anjiyogenezisi hem in vitro hem de in vivo indüklediği saptanmıştır (28). Ayrıca, over foliküllerindeki fizyolojik siklik anjiyogenezlerin ve regresyonların da leptine bağlı olduğu düşünülmektedir. Zira over de, bir miktar leptin sentezleyip salgılamaktadır ve salınımın ovülasyon zamanı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (29).

Kemik Metabolizması

Leptin kemik oluşumunu stimüle edip, rezorbsiyonunu inhibe eden bir “kemik dostu” olarak çalışmaktadır.

Termogenez

Leptinin enerji harcanmasına yaptığı en önemli etki termogenezisde artış sağlamasıdır (1). Bilindiği üzere alınan gıdalardaki enerjinin büyük bir kısmı metabolizma sırasında ısı olarak açığa çıkar ve bu fenomen ‘*Termogenezis*’ olarak adlandırılır. Tiroid hormonlarının termogenezisi artırarak enerji metabolizmasında düzenleyici rol oynadıkları bilinmektedir. Leptin, tiroid hormonlarının seviyesini ve sempatik sinir sisteminin aktivasyonunu artırarak termogenezisi hızlandırır ve böylece obezite gelişiminin önlenmesi için iştahın azaltılması yanında çok önemli bir adım daha atılarak enerji harcanması da arttırılmış olur (30).

Obezite

Leptin eksikliğinin ve/veya direncinin obezite ile sonuçlandığı, günümüzde artık oldukça iyi bilinen ve kabul edilmiş bir gerçektir. Obez insanlarda leptin geninde henüz farelerdeki gibi bir mutasyon saptanamasa da, serum leptin konsantrasyonları obezite göstergeleri olan vücut kitle indeksi (VKİ) ve vücut yağ kitlesi oranı ile pozitif bir korelasyon göstermektedir. Yapılan çalışmalar, obezitede asıl sorunun leptin eksikliğinden çok leptin rezistansı olduğunu düşündürmektedir.

Obez insanların büyük çoğunluğunda serum leptin konsantrasyonları yüksektir ve kilo verimi ile tekrar azalır (31). Leptin ile vücut yağ kitlesi ve VKİ arasındaki pozitif korelasyon kadınlarda, erkeklere oranla daha belirgindir ve yapılan ölçümler sonucunda kadınlarda leptin

seviyelerinin erkeklere oranla daha fazla olduğu saptanmıştır (31). Ayrıca obez insanlardaki plazma leptin konsantrasyonları, obez olmayanlara göre 5 kat kadar yüksek olsa da, serebral sıvıdaki leptin konsantrasyonlarının sadece çok daha az yüksek olması, leptin rezistansını kolaylaştıran hız sınırlayıcı faktörün santral sinir sistemine leptin transportundaki defekt olduğunu göstermektedir.

Leptin antiobezite etkisini; enerji alımını azaltarak (iştahın azaltılması) ve enerji harcanmasını artırarak (sempatik sinir sistemi aktivasyonu, termogenezis, artmış oksijen tüketimi) göstermektedir (19,20).

Üreme

Leptinin plasenta tarafından sentezlendiğinin ve leptin reseptörlerinin plasenta ve overde eksprese edildiğinin anlaşılması leptinin üreme üzerinde de önemli etkilere sahip olabileceğini düşündüren ilk bulgular olmuştur (32,33).

Erkek çocuklarında, serum leptin seviyeleri 5-10 yaşlar arasında artar ve daha sonra düşmeye başlar. Kızlarda ise menarşe kadar sürekli bir artış söz konusudur. Bunun sebebi de- teorik olarak- menarşe kadar vücuttaki yağ dokusunun belli bir orana yükseltilmesidir ki, sonrasında gelişebilecek olan gebelik ve doğum gibi olaylarda oluşacak enerji ihtiyacı karşılanabilsin. Kadınlardaki leptin seviyeleri (vücut kitle indeksine veya yağ miktarına göre düzeltme yapılsa da) erkeklere göre daha fazladır. İn vitro olarak östrojen adipoz dokudan leptin salınımını artırırken, androjen ise azaltır. Bundan dolayı da leptin seviyesi ve androjen miktarı arasında ters bir orantı hem erkek çocukları hem de yetişkinlerinde mevcuttur (34).

Leptin molekülünün üreme fonksiyonundaki rolünü belki de en iyi gösteren bulgular obez (ob/ob-fonksiyonel leptini olmayan) farelerinin hipogonadotropik hipogonadizm göstermeleri ve steril olmalarıdır. Ayrıca steriliteleri, kilo verme ile de düzelmemektedir. Bu farelere leptin verilmesi ile puberte başlamış ve infertilite düzelmiştir. İnsanlarda düşük leptin seviyelerinin veya diüurnal ritmin bozulmasının hipotalamik hipogonadizm ve amenore ile sonuçlandığı görülmüştür (35). Hipotalamustan GnRH, hipofizden FSH, LH ve prolaktin salınımını stimüle ettiği gösterilen leptinin (5), bu etkisini Nöropeptid Y üzerinden gösterdiği sanılmaktadır. Nöropeptid-Y, yüksek konsantrasyonlarda gonadotropin aksı üzerine inhibitör etkilidir. Böylece direkt olarak düşük gıda alımı ve/veya aşırı enerji harcanması gibi koşullarda seviyesi artarak cinsel olgunlaşma ve üremeyi inhibe eder. Ayrıca leptinin gonadotropin ve seks steroid sentezini ve sekresyonunu arttırdığı da saptanmıştır (36).

Leptin'in erkek gonadları ve üreme işlevi üzerine olan etkileri net olarak bilinmemekle beraber elimizde birtakım veriler bulunmaktadır. İnsan ve kemirgenlerin testislerinde leptin reseptörlerinin olması (37,38), in vitro olarak erişkin sıçan testislerinde leptinin testosteron üzerine inhibitör etkili olması (39) ve infertil erkeklerin seminifer tübüllerinde leptinin ortaya konması (3) bunlara örnektir. Azoospermisi olan erkeklerde serum leptin düzeyleri normal gruba göre daha yüksek saptanmıştır (40). Kalori kısıtlaması olmadan, leptin tedavisi ile erkek ob/ob (fonksiyonel leptini olmayan) farelerde sterilite geri döndürülebilmektedir (41). Leptin ya da leptin-amid'in (leptinin aktif fraksiyonu) sistemik olarak verilmesi erkek fare ve sıçanlarda FSH ve LH sekresyonunu sağlamaktadır (42).

Memeli spermatozolarında tam ve işlevsel bir glukojen metabolizması mevcut olup, döllenme öncesi özellikle baş ve orta parçada glukojen birikimleri oluşur. Glukojenin de, döllenme öncesi ve sırasında farklı süreçlerden (özellikle kapasitasyon ve zona pelusida penetrasyonu, oosit-sperm füzyonu) geçmesi gereken sperm için enerji kaynağı olduğu belirtilmiştir (43). Leptin ve insulin somatik hücrelerde (kas hücreleri, hepatosit, adiposit ve pankreas β hücreleri) olduğu gibi spermatozolar da glukojen sentezinde önemli rol oynar ve kapasitasyon sırasında salınımları en üst düzeye çıkar (9). Aquila ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, kapasitasyon geçirmemiş spermatozolar da leptin seviyesi özellikle orta ve baş kısmında kapasite olmuş spermatozolarla göre çok daha fazla olarak saptanmıştır. Diğer bir deyişle sperm için leptin sentezinin yapıldığı alternatif bir yer olup, erkek üremesinde enerji substratlarının birikimini sağlayarak erkek gametlerinin döllenme kapasitesi kazanmalarında koruyucu bir mekanizmadır (7).

Glukojen sentezi üzerine insulin benzeri etki ile arttırıcı yönde etki eden leptin, serbest yağ asidi oksidasyonunda insuline göre tam ters etki yaparak arttırıcı yönde etki gösterir. Bu da spermatozoldan salındığı gösterilen leptin hormonunun kapasitasyon öncesi glukojen sentezi yapmasına benzer ek bir enerji birikimi yaptığını ortaya koymaktadır (9).

Glander ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise hareketli spermatozolar ile seminal plazmadaki leptin seviyeleri arasında ters bir ilişki saptanmıştır. Bu da sperm motilitesinin kazanılmasında leptinin etkili (olumsuz yönde ?) olabileceğini ortaya koyar. Serum leptin düzeylerinin sperm hareketlerinin üzerine etkisi olmadığı sonucuna varmışlardır (3). Leptin'in testislerden testosteron sekresyonunu azaltıcı etkisi olması hareket kapasitesinin azalmasının bir nedeni olabilir (39). Glander'in yaptığı yayında bir başka önemli bulgu ise, seminal

plazmadaki leptinin, diğer dokulardakinin aksine bağlayıcı bir proteine büyük oranda bağlı olmasıdır (3).

Ishikawa ve ark. çalışmasında, leptinin esas olarak germ hücrelerinde (spermatositler) eksprese edildiği saptanmış ve sperm konsantrasyonu, Johnsen skoru ve serum testosteron miktarı ile ters” orantı gösterdiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada leptin reseptörlerinin esas olarak Leydig hücrelerinde yer aldığı da saptanmıştır. Leydig hücrelerindeki leptin reseptörlerinin miktarı testosteron konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Spermatogenetik disfonksiyon gösteren olgularda ise leptin düzeylerinin artmış olduğu gözlemlenmiştir (8).

İnfertil erkeklerin seminifer tübüllerinde leptinin bulunması, bu molekülün erkek gonadal işlevleri üzerinde merkezi nöroendokrin sistem üzerinden dolaylı olarak (40) ve aynı zamanda periferdeki membran reseptörleri vasıtasıyla doğrudan etkili olduğunu gösterir (38,39).

Sonuç olarak, leptinin erkek gonadal aksında fonksiyonel olarak düzenleyici etkisi olduğunu söyleyebiliriz. Bu düzenleme, hipotalamo-hipofizer-testiküler aksın farklı basamaklarında ve de hem uyarıcı hem de inhibe edici özelliktedir. Caprio tarafından önerildiği üzere;

1. *Hipotalamusta fizyolojik sınırın biraz üzerinde olması ile uyarıcı etki*
2. *Testiküler seviyede belirgin olarak arttığı durumlarda (obezite gibi) doğrudan inhibitör etki olarak tarif edilebilir (38).*

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda toplam 23 erkek olgu araştırılmıştır. Olgular CBÜ Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniği İnfertilite bölümü ve Üroloji polikliniğine başvuran hastalar arasından gönüllülük esasına göre seçilmişlerdir. Her olguya yapılan araştırma hakkında bilgi verildikten sonra soruları olup olmadığı sorulmuş şayet varsa yanıtlanmıştır. Olgulardan bilgilendirilmiş onam alındıktan sonra, kimlik bilgileri, adres, telefon numarası, yaşı, mesleği, boy, kilo, alkol-sigara kullanıp kullanmadığı, özgeçmiş, soygeçmiş, varsa geçirdiği operasyonlar, sürekli kullandığı ilaç olup olmadığı, evli ve çocuk istemi varsa infertilite tipi ve süresi, cinsel ilişki sıklığı, varsa yapılmış olan ürolojik muayenedeki patolojik bulgular ve daha önce yapılmış ise semen analizi sonuçları değerlendirmeye alınmıştır. Semen analizi bulunmayan olguların semen tetkiki, kliniğimizde Histoloji AD'dan gelen ilgili tarafından değerlendirilmiştir.

Olgulara yapılan semen analizi sonuçlarına göre infertil (1. grup) ve kontrol (2. grup) olmak üzere 2 ayrı gruba ayrılmıştır. Klasik semen analizi sonuçları Dünya Sağlık Örgütü'nün 1999'da yayınladığı 'WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction-1999' kitapçığına göre değerlendirilmiş ve 3 temel parametreden herhangi birinde - Sperm Sayısı: >20milyon/ml, Total Motilite: >%50 ve Morfoloji: >%30 WHO kriteri (>%14 Kruger strict kriteri) - veya birkaçında anormallik olması durumunda, olgu 1.gruba alınmıştır. Semen analizi sonuçları normal olan olgular 2.gruba dahil edilmişlerdir. Grup1'de 13 olgu ve grup 2'de de 10 olgu yer almıştır.

Her olgunun semen örneği ortalama 3 günlük cinsel perhiz sonrası, masturbasyon ile elde edilmiş ve plastik Petri kutusuna konmuştur. Olgular semen örneklerini en geç 1 saat içinde laboratuara iletmişlerdir. Semen örneği 37°C 'de 30-45 dakika likefiye olması için bekletilmiş ve likefaksiyon zamanı, görünümü ve vizkozitesi değerlendirilip daha sonra mikroskopik muayenesi yapılmıştır. Mikroskopik muayene, kliniğimizdeki ışık mikroskopunda ve Makler sayma camı kullanılarak 3 temel parametre (sayı, hareket ve yapı) değerlendirilmiştir. Bundan sonra seminal plazma eldesi için semen örneği plastik tüplere

aktarılmış önce 1000 devir/dakikada-10 dakika ve daha sonra tekrar 4000 devir/dakikada-20 dakika olacak şekilde kliniğimizdeki TD3 Centrifuge cihazında santrifüje tabi tutulmuş ve tüpün içindeki, dipteki çökeltiye göre nispeten berrak, sıvı kısmı altta kalan çökelti hareket ettirilmeden cam tüpe aktarılmış ve parafilm ile tüpün ağzı kapatılmıştır. Elde edilen seminal plazma örnekleri en son olarak mikroskopta hücre içerip içermediğini saptamak için tekrar değerlendirilmiştir. Seminal plazma örnekleri analiz gününe kadar Biyokimya laboratuvarındaki -80°C koşullarındaki dondurucuda (ULT Freezer-Thermo Electron Corp. USA) saklanmıştır.

Olgulardan, semen örneğini verdiği günün sabahında, en az 12 saatlik açlık sonrası üst ekstremitte venlerinden 6 ml venöz kan alınarak kırmızı kapaklı tüplere (Vacuette 8 ml-Z serum Sep. Clot Activator) konmuş ve daha sonra venöz kan örnekleri Biyokimya lab.'da 3500devir/dakikada-5 dakika satrifüje (Rotina 35R-Hettich Zentrifugen Tutlingen Germany) tabi tutulmuş ve üstte kalan kan serumları plastik eppendorf tüplere aktararak daha önce seminal plazma örneklerinin bulunduğu -80°C'deki dondurucuya saklanmak üzere konmuştur.

Serum ve seminal plazma leptin düzeyleri ticari kit kullanılarak (Biosource Nivelles, Belgium Katalog No:KIPMR44) tayin edildi. Kitin analitik sensitivitesi 0,1 ng/mL'dir. Kitin ölçüm içi (intraassay) varyasyon değeri %5, ölçümler arası varyasyon değeri %7,6 olarak bildirilmiştir. Sonuçlar ng/ml olarak verilmiştir.

Olgulardan elde edilen serum ve seminal plazmadaki leptin düzeyleri ng/ml olarak bildirilmiştir. Kontrol ve hasta gruplarının gerek kan serumu gerekse seminal plazma leptin değerlerinin karşılaştırılmasında '*Mann-Whitney U testi*', olguların yaşlarının ve vücut kitle indekslerinin birbirleri ile karşılaştırılmasında ise '*t test*'i kullanılmıştır. $P < 0,05$ olduğunda aradaki fark istatistikî olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda 13 tane infertil (1. grup) ve 10 tanede kontrol olgusu (2. grup) olmak üzere toplam 23 olgu vardır.

Olguları yaşlarına göre değerlendirdiğimizde; birinci grupta en genç olgu 25 ve de en yaşlı olgu 47 yaşında olup, yaş ortalamaları 32,2 yıldır. İkinci grupta ise en genç olgu 19 ve de en yaşlı olgu 39 yaşında olmak üzere ortalama yaşları 28,6 yıl olarak hesaplanmıştır.

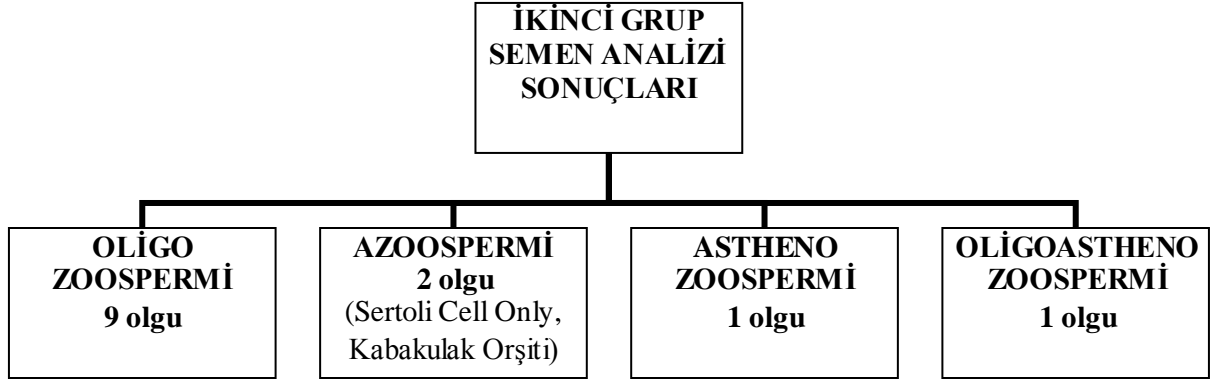
Vücut kitle indekslerine (VKİ) göre; kontrol grubunun ortalaması 24.4 kg/m², infertil grubun ortalaması ise 24.3 kg/m²'dir. Her iki grubun ortalaması normal sınırlardadır. Birinci grupta 3 olgu fazla kilolu (%30) varken 2. grupta 7 olgu fazla kilolu olarak (%54) saptanmıştır.

	OLGULARIN YAŞ ORT.	VÜCUT KİTLE İNDEKSİ ORT.	SİGARA KULLANIMI
İNFERTİL GRUP (13)	32.2 ± 6,65 yıl	24.3 kg/m ²	8 olgu (%20)
KONTROL GRUBU (10)	28.6 ± 5,72 yıl	24.4 kg/m ²	2 olgu (%62)

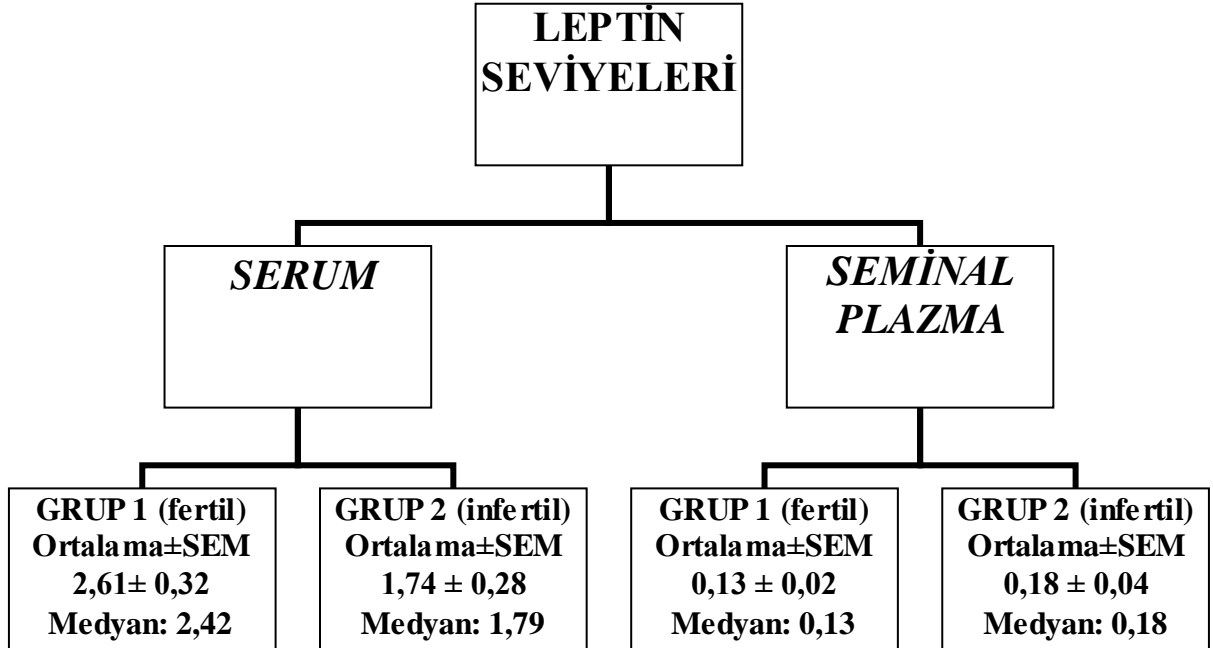
İnfertil gruptaki olguların 12 tanesi çocuk sahibi olma isteği ile Kadın Hastalıkları ve Doğum İnfertilite bölümü ve Üroloji polikliniğine başvuran olgulardır. Bu 12 olgunun 7 tanesi primer infertil ve 5 tanesi de sekonder infertildir. Üç olgu kabakulak geçirdiğini ifade etmiştir. Bunlardan bir tanesi şu anda 30 yaşında olup 24 yaşında geçirdiği Kabakulak sonrası orşite bağlı olarak semen analizinde anormallik (azoospermi) geliştiğini bildirmiştir. Bu gruptaki hastaların 3 tanesi varikozel nedeni ile opere (%23) olmuşlardır. Bunlardan 2 tanesi tek taraflı ve solda olup, 1 tanesi bilateral varikozele sahipti. Olgular cinsel disfonksiyon yönünden değerlendirildiğinde koitus sıklığı haftada ortalama 2 olup, 1 olguda erken boşalma ve diğer bir olguda da ereksiyon güçlüğü olduğu olguların kendisi tarafından belirtilmiştir.

Kontrol grubundaki olguların 8 tanesi bekar 2 tanesi evli ve çocuk sahibidir. Tüm olguların yapılan semen analizinde parametreleri normal sınırlardadır. Üç olgu çocukken kabakulak geçirdiğini belirtmiştir. Bir olgu hem varikozel ve akabinde hidrosel nedeni iki kez opere olmuştur.

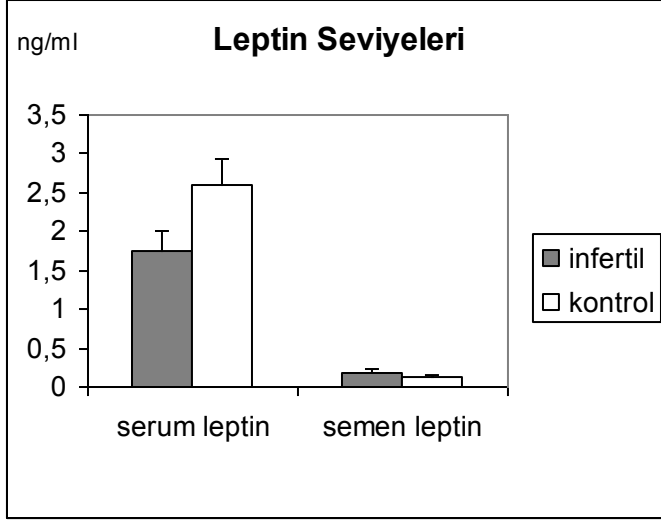
Spermatogenetik disfonksiyonu olan olgular (infertil grup) aşağıda gösterilmiştir;



Olguların gerek kan serumundaki gerekse seminal plazmadaki leptin seviyeleride aşağıdaki gibidir;



Mann-Whitney U testi ile değerlendirildiğinde infertil grubun serum leptin değerleri kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalmış olarak saptandı ($P=0,026$). Seminal plazma leptin miktarları ise kontrol grubunda, infertil gruba göre daha az olarak saptanmasına rağmen, istatistiki olarak anlamlı değildi ($P=0,61$).



Grafik 1. Serum ve seminal plazma leptin seviyeleri (ortalama \pm SEM)

TARTIŞMA

Leptin genelde vücuttaki yağ kitlesi ile uygun oranda bulunmakta ise de (45) çalışmamızdaki infertil grubun VKİ ortalaması 24,3 kg/m² olup, sadece 1 olgunun serum leptin düzeyi ortalamanın üzerinde saptanmıştır (VKİ:27,2kg/m²-serum leptin:3,54ng/ml). Erkeklerde leptin seviyesinin kadınlar kadar VKİ ile orantılı olmadığı, bel çevresi kalınlığı ile daha çok örtüştüğünü gösterilmiştir (4). Ayrıca androjenlerin yağ dokusundan leptin salınımını azaltması da erkeklerde VKİ ile leptin arasındaki bağıntının daha zayıf olmasının bir nedeni olabilir.

Olgularımızın serum leptin değerlerinin, kontrol grubunda, infertil olanlara göre anlamlı derecede yüksek olması (P=0,026) von Sobbe'nin ve Steinmann'ın bulguları ile uyumsuzdur (40,46). Her iki çalışmada hasta grubunu hipergonadotropik hipogonadizm kaynaklı azospermik hastalar oluşturmuşken çalışmamızdaki hasta grubunda yalnızca 2 olguda azospermi saptanmıştır. Spermatogenetik disfonksiyonu olanlarda artması beklenen serum leptin düzeyleri kuvvetle muhtemel mevcut bozukluğu normale döndürebilmek içindir (8). Bu çalışmada azospermik hastalarda leptin artışının testis üzerine spermatogenez için olumlu etki yapması beklendiği ifade edilmiştir. Bu da bozukluğun uç noktası olarak kabul edilen azospermide serum leptin seviyelerinin neden artıp, çoğunluğu nispeten daha ılımlı oligozoospermik olgular içeren çalışmamızda artmadığını açıklayabilmektedir. Kontrol grubunda serum leptin seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olması, Caprio'nun da belirttiği gibi leptinin hipotalamusta erkek genital sistemini uyarıcı etkisi olması ve dolayısı ile bu grubun semen analizlerinin normal olmasına olanak tanımaktadır (38). Bu bilgiler ışığında infertil grupta düşük çıkan leptin seviyesi hipotalamusta yeterli uyarı yapmaya olanak sağlamamakta ve sonuçta bu grup hastanın semen analizleri normalden farklı bulunabilmektedir.

Çalışmamızda seminal plazma leptin seviyelerinin infertil grupta, kontrol grubuna göre daha yüksek ama istatistiksel yönden anlamlı olmaması (P=0,61), von Sobbe arkadaşlarının yaptığı çalışma ile istatistiksel açıdan uyum göstermemektedir. Adı geçen yayında spermatogenetik disfonksiyonu olanlarda seminal plazma leptin seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmış olarak saptanmıştır. Ishikawa ve arkadaşlarının yaptığı yayında ise spermatogenetik disfonksiyonu olanların testiküler seviyede, en çok

spermatozoidlerde artmış leptin miktarı olduğu bulunmuştur (8). Bu da bize seminal plazmalar arasında bariz fark olmasa da testiküler seviyede fark olacağını ve bunu göstermek içinde testiküler dokunun incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. İnfertil olgularımızın sayısal yönden nispeten az olması bu sonucun olası bir başka nedeni olabilir.

Leptinin testiküler androjen sentezini azaltarak spermatogeneze olumsuz etkisi olabileceği ve buna bağlı olarak sperm sayısında azalma olabileceği söz konusudur. (39). Von Sobbe ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise spermatogenetik disfonksiyonu (özellikle yüksek dereceli oligozoospermi) olanlarda seminal plazma leptin düzeyi artmış olarak saptanmıştır (46). Çalışmamızda, infertil grubun ortalama seminal plazma leptin değeri kontrol grubuna göre yüksek olmasına karşın yüksek dereceli oligozoospermi olarak tariflenen (sperm sayısı < 1 milyon/ml) olgu sayısının az olması diğer çalışmalar ile anlamlı bir tartışmayı kısıtlamaktadır.

Glander ve ark.'ları yaptığı çalışmada serum leptin değerlerinin semen analizi ile ilgisi olmadığını ortaya koymuşlar, ancak seminal plazma leptin düzeyleri normal grupta patolojik gruba göre daha düşük bulmuşlardır (3). Çalışmamızda ise, kontrol grubunun (temel parametrelerin normal olduğu) serum leptin değerleri infertil gruba göre anlamlı derecede artmış olarak saptanmıştır. Çalışmamızda düşük bulunan kontrol grubu seminal plazma leptin değeri Glander ve ark.'larının sonuçları ile uyumlu olmakla birlikte aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Gerek kontrol gerekse infertil hasta grubundaki olgu sayısının sınırlı olması bu sonuçta rol oynayabilir. Glander ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada semendeki leptinin spermatozoidlerin motilitesi üzerine olumsuz etkili olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda hareket problemi olan sadece 2 olgu olması leptinin motilite üzerine olan olumsuz etkisi açısından karşılaştırma yapmaya olanak tanımamaktadır (3).

Testiküler parankim harabiyeti ne kadar fazla olursa sperm sayısı ve üretilen leptin miktarı azalacağını yine von Sobbe'nin yaptığı çalışmadan biliyoruz. Serimizde sırasıyla bir olgu bilateral varikoselektomi, bir olgu 2 kez sol taraftan ve son olarak bir olgu da sadece 1 kez varikoselektomi olmuştur. Operasyon sayısı ve yaygınlığı ne kadar fazla ise, sperm sayısı ve seminal plazma leptin düzeyleri orantılı olarak azalmaktadır. Yine de bu önermeyi destekleyecek daha çok olgu içeren ve istatistiksel olarak anlam taşıyan çalışmaların da gerekliliği aşikardır.

Erkek genital sisteminde leptin temelde seminal plazma ve seminifer tübüllerde bulunmaktadır (3). Ejakulattaki spermatozoalar da kapasitasyona uğramadan hemen önce yüksek miktarda leptin sekresyonu yaparlar. Somatik hücrelerde olduğu gibi spermatozolarda da glukojen birikimi ve ilerleyen dönemlerde bu enerjinin kullanılarak kapasitasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesine olanak tanır. (7). Leptin, kapasitasyon için enerji eldesi açısından glukojen sentezine ek olarak yağ asidi oksidasyonun da devreye sokarak enerji depolanmasında rol oynar. (9). İnfertil olguların seminal plazma leptin düzeylerinin artmış olması (her ne kadar istatistiksel olarak önemsizse de), testiküler seviyede fertilit  açısından bir koruyucu ve spermatogenetik disfonksiyonu olan bu olgularda doğal bir kompanzasyon mekanizması olabilir.

Sonuc olarak, incelediğimiz literatür ışığı altında leptin germ hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu ve özellikle spermatozoların kapasitasyonunda rol oynamaktadır. Yaptığımız çalışmada infertil gruptaki hastalarda serum leptin seviyelerinin kontrol grubuna göre daha düşük olması, düşük leptin seviyelerinin spermatogenetik disfonksiyona neden olabileceğini düşündürmektedir. Normal grup ile infertil grup seminal plazma leptin seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmaması da leptin eksikliğinin nereden kaynaklandığı konusunda bize aydınlatıcı olmamaktadır. Spermatogenetik disfonksiyonu olan ve artmış leptin seviyesi bildirilen çalışmaların çoğunluğunda olgular azospermik olup, yaptığımız çalışmada ki olguların çoğunun oligospermik olması da bulgularımız arasındaki farklılığın nedenlerinden biri olabilir.

KAYNAKLAR

1. Campfield LA, Smith FJ, Burn P. The OB protein (leptin) pathway –a link between adipose tissue mass and central neural networks. *Horm Metab Res.* 1996;28:619-632.
2. Glasow A, Kiess W, Anderegg U, Berthold A, Botnerr A, Kratzsch J. Expression of leptin (Ob) and leptin receptor (Ob-R) in human fibroblasts: regulation of leptin secretion by insulin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:4472-4479.
3. Glander H.-J, Lammert A, Paasch U, Glasow A, Kratzsch J. Leptin exists in tubuli seminiferi and in seminal plasma. *Andrologia.* 2002;34:227-233.
4. Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol.* 2000;143:293-311.
5. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, Mccann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94:1023–1028.
6. Visconti PE, Galantino-Homer HE, Moore GD, Bailey JL, Fornes M, Kopf GS. Molecular basis of sperm capatitation. *J Andrologia.* 1998;19:242-248.
7. Aquila S, Gentile M, Middea E, Catalano S, Morelli C, Pezzi V, Ando S. Leptin secretion by human ejaculated spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(8):4753-4761.
8. Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, Takenaka A. & Fujisawa M. Expression of leptin and leptin receptor in the testis of fertile and infertile patients. *Andrologia.* 2007;39:22-27.
9. Ando S, Aquila S. Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. *Mol and Cell Endocrinol.* 2005;245:1-6
10. Jégou B, Pineau C, Toppari J. Spermatogenesis in vitro in mammals. In *Assisted Reproductive Technology.* Jonge CD, Barratt CLR, eds. Cambridge University Press: Cambridge 2002;3-25.
11. WHO; *Manual for the Standardized Investigation and Diagnosis of the Infertile Couple.* 1993; P: 7, Cambridge University Press.
12. The ESHRE Capri Workshop. *Guidelines to prevalence, diagnosis, treatment and management of infertility.* 1996. Milan: Oxford University Press.
13. Anthony V Hirsh. The investigation and therapeutic options for infertile men presenting in assisted conception units. In: *In vitro fertilization and assisted reproduction: the Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice.* Second ed, Brinsden PR, ed. New York: Parthenon Publishing. 1999;27-52.

14. Özdiler E. Erkeklerde infertiliteye neden olabilen sistemik hastalıklar ve gonadotoksinler. In: Klinik Androloji. Özdiler E, Aydos K, eds. Ankara Üniversitesi Basımevi: Ankara. 2000;525-36.
15. Brinkworth MH, Handelsman DJ. Environmental influences on male reproductive health. In: Andrology: Male reproductive health and dysfunction, Nieschlag E, Behre HM, eds. Springer-Verlag: New York. 2001;253-70.
16. Jeyendran RS, Ven van der HH, Perez Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*. 1984;70:219-224.
17. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1976;15:471-473.
18. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372:425-432 1994
19. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 1995; 269: 540-3.
20. Friedman JM. Role of leptin and its receptors in the control of body weight. In: (Blum WF, Kiess W & Rascher W eds.) *Leptin-the voice of adipose tissue*. Johann Ambrosius Barth Verlag, Germany; 1997:3-22.
21. Brabant G, Horn R, von zur Mühlen, Mayr B, Wuster U, Heidenreich F, Schnabel V, Feldt Rasmussen U. Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia*. 2000;43(4):438-42
22. Ostlund RE Jr, Yang JW, Klein S, Gingerich R. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(11):3909-13.
23. Spitzweg C, Heufelder AE. More clues from fat mice: leptin acts as an opponent of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Eur J Endocrinol*. 1997;136:590-1.
24. Daniel P, Denis G, Baskin D, Michael WS. Leptin and Insulin Action in the Central Nervous System. *Nutr Rev* 2002; 60: 20-9.
25. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394: 897-901.

26. Lee FYJ, Li Y, Yang EK. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient obese mice. *Am J Physiol* 1999; 276: 386- 94.
27. Bouloumie A, Dresler HCA, Lafontan M. Leptin, the product of the Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res.*1998; 83: 1059- 66.
28. Iwaniec UT, Heaney RP, Cullen DM, Yee JA. Leptin increases the number of mineralized bone nodules in vitro. *J Bone Miner Res* 1998;13: 2-12.
29. Riad-Gabriel MG, Jinagouda SD, Sharma A, Boyadjian R, Saad MF. Changes in plasma leptin during the menstrual cycle. *Eur J Endocrinol* 1998;139: 528-31.
30. Marcin K. Thyroid hormones in the pathogenesis and treatment of obesity. *Eur J Phar* 2002; 440: 85– 98.
31. McConway MG, Johnson D, Kelly A, Griffin D, Smith J,Wallace AM. Differences in circulating concentrations of total, free and bound leptin relate to gender and body composition in adult humans. *Ann Clin Biochem* 2000; 37: 717-23.
32. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci* 1997; 94: 11073- 8.
33. Karlsson C, Lindell K, Svensson E, Bergh C, Lind P, Billig H, Carlsson LMS, Carlsson B .Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4144-8.
34. Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. *Moll Cell endocrinol.* 2002;188:9-13.
35. Laughlin GA, Yen SS. Hypoleptinemia in woman athletes: absence of diurnal rhythm with amenorrhea. *J Clin Endoc Metab.*1997; 82: 318-21.
36. Kiess W, Blum WF. Leptin, puberty and reproductive function: lessons from animal studies and observations in humans. *Eur J Endoc* 1997;138: 26 - 29.
37. Cioffi JA, Shafer AW, Zupancic TJ, Smith-Gbur J, Mikhail A, Platika D, Snodgrass HD. Novel B219/OB receptor isoforms: possible role of leptin in hematopoiesis and reproduction. *Nat Med.* 1996; 2: 585-589
38. Caprio M, Isidori AM, Carta AR, Moretti C, Dufau ML, Fabbri A.Expression of functional leptin receptors in rodent Leydig cells. *Trends Endocrinol Metab.* 1999; 140: 4939-4947
39. Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez CL, Dieguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone from adult rat testis in vitro. *J Endocrinol.* 1999; 161: 211-218

40. Steinmann N, Gamzu R, Yogev L, Botchan A, Yavetz H. Serum leptin concentrations are higher in azoospermic than normospermic men. *Fertil Steril*. 2001;75:821-825
41. Mounzih K, Lu R, Chebabb FF. Leptin treatment rescues genetically obese *ob/ob* males. *Endocrinology*. 1997;138:1190-1193.
42. Gonzalez LC, Pinilla L, Tena-Sempere M, Aguilar E. Leptin stimulates prolactin and LH secretion in fasted adult male rats. *Neuroendocrinology*. 1999;70:213-220.
43. Ballester J, Fernandez-Novell JM, Rutlant J, Garcia-Rocha M, Jesus Palomo M, mogas T, Pena A, Rigau T, Guinovart JJ, Rodriguez Gil JE. Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Mol reprod Dev*. 2000;56:207-219
44. Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A. Leptin in reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2001;12:65-72.
45. El-Hefnawy T, Ioffe S, Dym M. Expression of the leptin receptor during germ cell development in mouse testis. *Endocrinology*. 2000; 141:2624-2630
46. Von Sobbe H.-U, Koebnick C, Jenne L, Kiewewetter F. Leptin concentrations in semen are correlated with serum leptin and elevated in hypergonadotrophic hypogonadism. *Andrologia*. 2003;35:233-37