

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOĞUM SONRASI GELİŞİM DÖNEMLERİNDE
SIÇAN TESTİSİNDE GHRELİN
İMMUNOHİSTOKİMYASININ İNCELENMESİ

Tezi Hazırlayan
Tuğba RIHTİM

Tezi Yöneten
Prof.Dr.Birkan YAKAN

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Ocak 2011
KAYSERİ

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞUM SONRASI GELİŞİM DÖNEMLERİNDE
SIÇAN TESTİSİNDE GHRELİN
İMMUNOHİSTOKİMYASININ İNCELENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Tuğba RIHTİM**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Birkan YAKAN**

**Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSY-09-778 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ocak 2011
KAYSERİ**

Prof.Dr.Birkan YAKAN Danışmanlığında **Tuğba RIHTİM** tarafından hazırlanan “**Doğum Sonrası Gelişim Döneminde Sıçan Testisinde Ghrelin İmmunohistokimyasının İncelenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi **Histoloji-Embriyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..... / / 2010

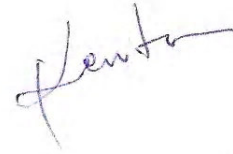
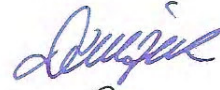
JÜRİ

Başkan : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Üye : Prof.Dr.Birkan YAKAN (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Kenan AYCAN

İmza



ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....


Prof.Dr.Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, planlanması ve yürütülmesinde bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım sayın Prof. Dr. Birkan YAKAN'a, yüksek lisans eğitimim boyunca hoşgörü ortamı içerisinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR ve bölüm hocalarımdan sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı yaparken boyama yöntem ve teknikleri için bilgisini ve yardımını esirgemeyen Biyolog Münevver BARAN, Uzm.Dr. Funda SELVİ, Araş. Gör. Arzu YAY, Araş. Gör. Esra BALCIOĞLU'na, çalışmamın başlangıcında sonuna kadar bütün bölümlerinde en büyük destekçim olan yüksek lisans öğrencisi arkadaşım Derya AKKUŞ'a , Ayşegül Burçin TÜRKMEN'e, yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bana destek ve yardımcı olan enstitü personeline, tanıştığımız günden bugüne her konuda desteğini benden esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşım Hemş. Nurten DUMAN'a çok teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren,benden sevgilerini ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim canım anneme, sevgili babama ve kardeşlerim Göktürk ile Asena'ya sonsuz teşekkür ederim.

Eğitim-Öğretim hayatımda ve yaşamıma girdiği günden bugüne kadar her konuda yanımda olan beni hiç yalnız bırakmayan sevgili eşim Fatih RIHTİM'a ve yaşama sevincim biricik oğlum Yusuf'a sonsuz teşekkür ederim.

DOĞUM SONRASI GELİŞİM DÖNEMİNDE SIÇAN TESTİSİNDE GHRELİN İMMUNUHİSTOKİMYASININ İNCELENMESİ

ÖZET

Testisler embriyonik gelişimi, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen endokrin ve ekzokrin fonksiyonlu bileşik tübüler bir çift bezdir. Ghrelin, gastrointestinal sistem tarafından üretilen, santral etkiyle yeme davranışı ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde görev alan bir peptit hormondur. Ghrelin ilk kez 1999 yılında farelerin midesinde tanımlanmıştır. Daha az miktarda ise bağırsak, böbrek, hipofiz bezi, plasenta, testis ve hipotalamus tarafından da üretilip dolaşıma verilmektedir.

Bu çalışmanın amacı değişik yaş gruplarındaki erkek sıçanların testislerinde ghrelin immüno lokalizasyonunu ortaya koymaktır.

Çalışmada 70 adet değişik yaş gruplarında Wistar-albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her birinde on hayvan bulunan yedi gruba ayrıldı. Sıçanlar ketamin anestezisi altında dekapite edildi. 1, 5, 15, 20, 30, 45, 75. günlerde testisleri çıkarıldı. Testisler parafin bloklara gömüldü ve Avidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile ghrelin immunohistokimyasal boyaması yapıldı.

1-5 günlük gruptaki sıçan testisinde çok hafif şiddette, 15-20 günlük grupta orta şiddette, 30-45 ve 75 günlük gruplarda yoğun şiddette immun reaksiyon gözlemlendi. Bu çalışma sonunda sıçan testisinde ghrelin miktarının yaşa göre artış gösterdiği deneysel ve istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ghrelin, Testis, Sıçan.

AN ANALYSIS OF GHRELIN IMMUNOHISTOCHEMISTRY IN RAT TESTIS OF POSTNATAL DEVELOPMENTAL PERIOD

ABSTRACT

Testises are compound tubular glands with endocrine and exocrine functions to affect embryonic development, sexual maturity and reproduction functions. Ghrelin is a peptide hormone produced by gastrointestinal system to regulate eating behavior and body weight. Ghrelin was defined first in 1999 in rat stomach. It is also added to the cardiovascular system after being produced in small quantities in intestines, kidneys, pituitary gland, placenta, testicles and hypothalamus.

The aim of this study is to present the ghrelin immunolocalization in male rat testicles from different age groups.

70 male Wistar-albino rats from different age groups were used in this study. Rats were placed in seven groups containing ten, each. Rats were decapitated under ketamine anesthesia. Testises were cut out on day 1,5,20,30,45,75. Testicles were immersed in paraffin blocks and ghrelin immunohistochemically stained by avidin-biotin-preksidaz method.

It was observed that rats in 1-5 day group showed very slight, 15-20 day group showed moderate, 30-45 and 75 day group showed intense immune reaction. The results of the study reveal clinically and statistically that the amount of ghrelin in rat testicles shows an increase with respect to age.

Keywords: Ghrelin, Testis, Rat.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	VII
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. TESTİS	4
2.1.1. Testisin Embriyolojisi	4
2.1.2. Anatomi ve Fizyolojisi	6
2.1.3. Histolojisi	7
2.1.3.1. Testisler	8
2.1.3.1.1. Tübülü Seminiferi Kontortiler (Seminifer Tübüller)	9
2.1.3.1.2. Sertoli Hücreleri	10
2.1.3.1.3. Spermatogenez	11
2.2. GHRELİN	16
2.2.1. Ghrelin Hormonunun Dokulardaki Dağılımı	18
2.2.2 Ghrelin Sekresyon Mekanizması	20
2.2.3 Ghrelinin Etkileri	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. DENEY PLANI	23
3.2. İMMUNOHİSTOKİMYA	26
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
6. KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	
EKLER	

KISALTMALAR

ABP	: Androjen Binding Protein
AMH	: Antimüllerien Hormon
ARC	: Arkuat Nükleus
EDS	: Etilen Dimetan Sülfonat
FSH	: Folikül Stimüle Hormon
GH	: Growth Hormon
GHRH	: Growth Hormon Releasing Hormon
GnRH	: Gonodotropin Releasing Hormon
hCG	: Human Coryonic Gonodotropin
IGF-1	: İnsulin Like Growth Factor
İcv	: İntra Cerebro Ventriküler
İp	: İntra Peritoneal
İu	: İntra Uterin
İv	: İntra Venöz
LH	: Luteinizan Hormon
MIF	: Müllerien İnhibitör Factor
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
PCR	: Polimeraz Chain Reaktion
RIA	: Radyo İmmuno Assay
SSS	: Santral Sinir Sistem,
TDF	: Testis Determine Factor

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan sıçanların gruplara göre dağılımı	24
Tablo 3.2. Parafin doku takip yöntemi aşamaları	24
Tablo 3.3. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi	25
Tablo 3.4. İmmunohistokimyasal Boyama Basamakları.....	36
Tablo 4.1. Grupların Gelişme Dönemlerine Göre Boyanma Şiddetleri	32
Şekil 2.1. Primordial germ hücrelerinin primitif gonadlara göçü.	4
Şekil 2.2. Primordiyal germ hücrelerinin gonadal kabartıya yerleşmesi.....	5
Şekil 2.3. Testisin Kısımları	8
Şekil 2.4. Testiste Seminifer Tübüller.....	9
Şekil 2.5. Seminifer Tübülde Gelişmekte Olan Spermatojenik Hücreler Sertoli Hücreleri.	11
Şekil 2.6. Ghrelin Reseptörü	17
Şekil 2.7. Açillenmiş Ghrelinin İnsan Ve Sıçandaki Aminoasit Dizilimi	17
Şekil 2.8. Ghrelin Sentezi.....	18
Şekil 4.1. Yaşa Göre Leydig Hücrelerinin İmmunohistokimyasal Boyanma Şiddeti.....	32
Şekil 4.2. 1 günlük testis dokusu. Sertoli hücreleri (ince ok), spermatogonium (kalın ok) myoid hücreler (yıldız), kapillerler (beyaz ok). H-E (x100).....	34
Şekil 4.3. 1 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (++) immunohistokimya (x100)	34
Şekil 4.4. 5 günlük testis dokusu. Sertoli hücreleri (ince ok), spermatogonium (kalın ok) myoid hücreler (yıldız), Leydig hücreleri (beyaz ok). H-E (x100).....	35
Şekil 4.5. 5 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+) immunohistokimya (x100).....	35
Şekil 4.6. 15 günlük testis dokusu. spermatogonium (kalın ok) spermatosit (ince ok), myoid hücreler (yıldız), Leydig hücreleri (beyaz ok). H-E (x100).....	36
Şekil 4.7. 15 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (++) immunohistokimya (x40).....	36
Şekil 4.8. 15 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (++) immunohistokimya (x100).....	37
Şekil 4.9. 20 günlük testis dokusu. Spermatogonium (kalın ok) spermatosit (ince ok), Leydig hücreleri (beyaz ok) H-E (x100)	37
Şekil 4.10. 20 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (++) immunohistokimya (x40).....	38

Şekil 4.11.	20 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (++) immunohistokimya (x100).....	38
Şekil 4.12.	30 günlük testis dokusu. Spermatogonium (kalın ok), primer spermatosit (beyaz ok), sekonder spermatosit (ince ok) H-E (x100).....	39
Şekil 4.13.	30 günlük testis. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x40)	39
Şekil 4.14.	30 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x100).....	40
Şekil 4.15.	45 günlük testis dokusu. Spermatogonium (kalın ok), primer spermatosit (beyaz ok), spermatid (yıldız), spermiyum (ince ok). H-E (x40).....	40
Şekil 4.16.	45 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x40).....	41
Şekil 4.17.	45 günlük testis dokusu Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x100).....	41
Şekil 4.18.	45 günlük testis dokusu seminifer tübül Sertoli hücreleri immunohistokimyasal reaksiyonu (beyaz ok) immunohistokimya (x40)	42
Şekil 4.19.	45 günlük testis dokusu seminifer tübül Sertoli hücreleri immunohistokimyasal reaksiyonu (beyaz ok) immunohistokimya (x100)	42
Şekil 4.20.	75 günlük testis dokusu. Spermatogonium (kalın ok), spermatosit (beyaz ok), spermatazoon (ince ok), Leydig hücreleri (yıldız). H-E (x40)	43
Şekil 4.21.	75 günlük testis dokusu dokusu Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x40).....	43
Şekil 4.22.	75 günlük testis dokusu dokusu Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x100).....	44

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Ghrelın, gastroıntestinal sistem tarafından üretilen, santral etkiyle yeme davranışı ve vct ağırlığının düzenlenmesinde görev alan bir peptit hormondur. Ghrelın ilk kez 1999 yılında Kojima ve ark tarafından farelerin midesinde tanımlanmıştır (1). Ghrelın midenin oksintik mukozasında yer alan, endokrin fonksiyonlara sahip X/A hücreleri tarafından üretilmekte ve 28 amino asit içermektedir (2,3). Daha az miktarda ise bağırsak, böbrek, hipofiz bezi, plasenta ve hipotalamus tarafından da üretilip dolaşıma verilmektedir (4-7).

Enerji homeostazisi üzerine olan etkileri, üretim yerinden bağımsız olup, santral sinir sisteminde (SSS) hipotalamus düzeyinde ortaya çıkmaktadır (8). Hipofiz bezindeki büyüme hormonu (GH) salgılatıcı etkisinden bağımsız olarak ghrelının kemiricilerde intra serebro ventriküler (icv) ve intra peritoneal (ip) uygulamalarından sonra besin alınmasını potansiyel olarak uyaran bir bağırsak-beyin peptidi gibi hareket ettiği gösterilmiştir (9-12).

Uzun süreli uygulamalar ile fareler ve sıçanlarda ghrelın'ın vct ağırlığı ve yağlanmayı artırdığı gösterilmiştir (10,11). İnsanlarda intra venöz (iv) ghrelın uygulanması kendi başına alınan öğünlerdeki besin alımında %28'lere kadar yükselen bir iştah artışına yol açabilmektedir (11). Ghrelın'ın iştah açıcı etkisi; kemiricilerde

periferik uygulanmasına bağlı olarak hipotalamik bölgedeki c-Fos nöronların anlamlı bir artışına bakılarak hipotalamik arkuat nukleusların (ARC) uyarılması sonucunda muhtemelen ortaya çıkmaktadır (13,14). Spiegelmer NOX-B11, daha önceleri yapılan çalışmalarda ghrelin'i bağladığı gösterilen sentetik bir L-oligonklotittir. Bu maddenin uygulanmasıyla ghrelin'in yol açtığı besin alımı ve sıçanlardaki arkuat nukleuslardaki c-Fos etkisinin baskılandığı gösterilmiştir (9).

Büyüme hormonu salgılatıcı hormonun salınımını uyaran ghrelin hemen hemen her hücre üzerinde direkt olmasa da dolaylı olarak etkilidir. Somatotrop hormon, somatotropin gibi isimlerde verilen büyüme hormonu, n hipofizin somatotrop hücrelerinden salgılanır. Başta kemik, kıkırdak ve iskelet kası olmak üzere vücudun büyüme yeteneğinde olan hemen bütün doku hücrelerine etki eder. Hücrelerin hem büyümesini hem de mitoz bölünme ile çoğalmasını artırarak çok sayıda hücrenin gelişimini sağlar. Ghrelinin büyüme hormonu salgılatıcı etkileri hem in vitro olarak, hem de sıçanlarda yapılan icv ve ip çalışmalarda gösterilmiştir (15,16).

Ghrelin'in GH ve insülin eksenindeki rolü değerlendirildiğinde sadece insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ile ghrelin arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (17). Aynen ghrelin düzeylerinde olduğu gibi IGF-1 düzeyleri de erişkin döneme yaklaştıkça azalmakta, GH'dan bağımsız olarak nütrisyonel durumdan etkilenmekte ve ayrıca intra uterin (iu) büyüme geriliğinde düzeyleri artmaktadır (18,19). Östrojen, GH ve IGF-1 ile ilgili yapılan pek çok çalışmada bu hormonların doğrusal (lineer) bir büyüme ile yakın ilişki gösterdikleri ifade edilmektedir. GHRH, somatostatin ve ghrelin; GH ekseninde yer almakla birlikte, seks steroid hormonlarının ve özellikle de östrojen'in bu konudaki önemi iyi bilinmektedir (20,21). Çünkü GH salınımını düzenlemektedirler ve insan hayatının belirli dönemlerinde her iki cinsiyette de GH salınımını baskılamaktadırlar. Kanda dolaşan GH düzeyleri yaşa bağlı olarak değişiklikler gösterir; plazma GH konsantrasyonu puberte döneminde belirgin bir şekilde artarken, yaşın ilerlemesiyle birlikte ve seks steroidlerinin de etkisiyle bu değişiklikler belirgin hale gelir (20-22). Üstelik GH salınımı erişkin sıçanda dimorfizm gösterir ve bu seks steroidleri GH salınımı üzerinde önemli bir rol oynarlar (23). Hatta erişkin erkek sıçanların kastre edilmesi (testislerinin çıkarılması); hipotalamik GHRH ve somatostatin'in mRNA miktarlarında anlamlı bir şekilde azalma ortaya çıkartır (20,24). Bu durum, seks

steroidlerinin GH eksenini düzenleyen GHRH ve somatostatin ile ilgili nöronlarının etkilendiğinin bir işaretidir (25).

Ghrelinin ekspresyonu (ifadesi) tıpkı GH'a benzer bir şekilde yaşla ilgili değişiklikler ve seksüel dimorfizm gösterir. Bu konuda Liu ve ark (26), Northern blot yöntemiyle yaptıkları çalışmada ghrelin'e ait mRNA'yı farklı yaşlardaki farelerin midelerinde incelemişler ve ghrelin düzeylerinin embriyonik 18,5. günde düşük düzeydeyken; doğumdan sonra hızla arttığını ve sonra kademeli bir şekilde tekrar azaldığını göstermişlerdir. Matsubara ve ark (25) yeni doğan döneminden erişkin döneme kadar olan sıçanlarda ghrelin immüno pozitifliğini ve bunu gösteren hücrelerin sayılarını incelemişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada ghrelin salgılayan hücrelerin seksüel olarak dimorfik bir yapı gösterdiklerini ve farklı bir şekilde ortaya çıktıklarını gözlemişlerdir. Ayrıca Barkan ve ark (27) siklusun geç folliküler evresinde bulunan kadınlarda, plazma ghrelin konsantrasyonlarının erkeklerdeki düzeylerine göre daha yüksek olduğunu iddia etmektedirler. Bu bulgular seks steroidlerinin GH'a benzer bir şekilde ghrelin salınımının düzenlenmesinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ratlarda Leydig hücrelerinde (28), insanlarda Leydig ve Sertoli hücrelerinde (29), koyunlarda ise bu hücrelere ilave olarak özellikle seminifer tubuller içerisinde, germ hücrelerinde (30) ghrelin ekspresyonu görülmüştür. Bu çalışmalar, ghrelinin reproduktif sistem üzerinde, özellikle Leydig hücrelerinden testosteron sentezinin ayarlanmasında, bir regülatör olarak görev alabileceğini göstermektedir.

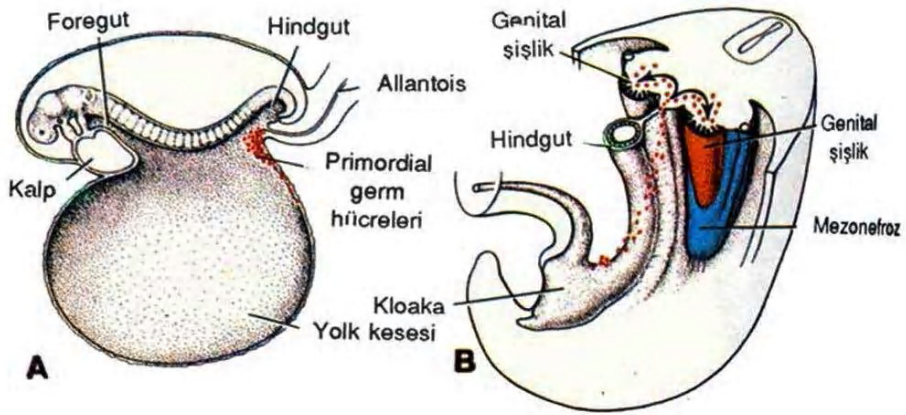
Gonadal fonksiyonlar üzerinde son yıllarda ghrelin'in giderek artan önemine dair çalışmalar yapılmaktadır (31-36). Bu noktaları açıklığa kavuşturabilmek ve literatüre katkıda bulunabilmek amacıyla değişik yaş gruplarındaki erkek sıçanların testislerinde ghrelin immüno lokalizasyonunun araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS

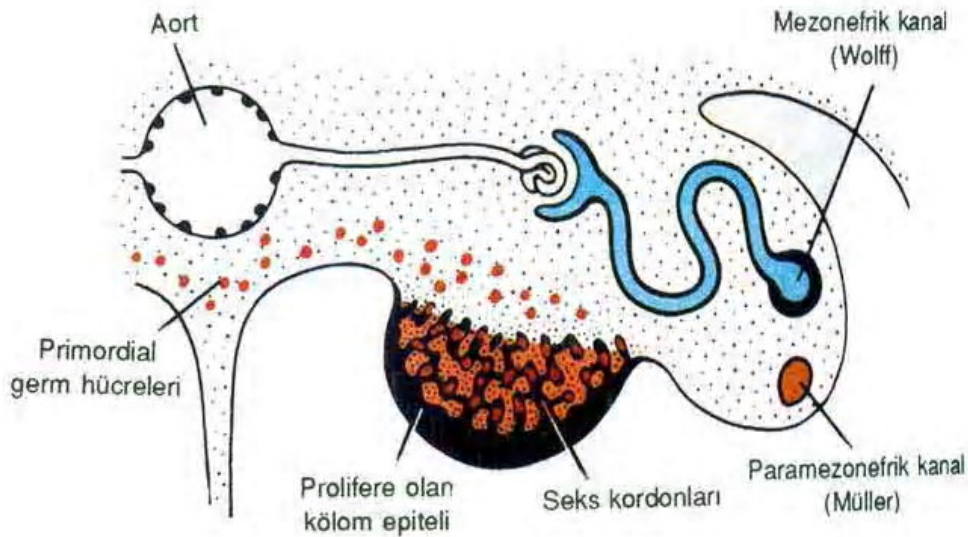
2.1.1. Testisin Embriyolojisi

İlkel cinsiyet hücreleri büyük, yuvarlak hücrelerdir ve 4. haftanın başında vitellüs kesesinin endoderm hücreleri arasında bulunurlar. Embriyonun katlanması sırasında ilkel cinsiyet hücreleri arka bağırsağın arka mezenteri boyunca gonad kabartılarına göç ederler (37) (şekil 2.1) .



Şekil 2.1. Primordial germ hücrelerinin primitif gonadlara göçü (37).

Altıncı haftada ilkel cinsiyet hücreleri embriyonel bağ dokuya girer ve primitif cinsiyet kordonlarına ulaşır. Burada germ kordonları gelişir ve artık farklılaşmamış evre sona erer. Erkek ve dişi üreme organlarının yapısal farklılaşması embriyonun 7. haftasına kadar başlamaz ve bu dönem gonadların “farklaşmamış evresi” olarak bilinir. Testisler ve yumurtalıklar; mezoderm epiteli, embriyonel bağ dokusu ve ilkel germ hücreleri olmak üzere 3 kaynaktan gelişirler. Gonad gelişiminin ilk belirtileri sölom epitelinin çoğalması ve embriyonel bağ dokusunun yoğunlaşması ile meydana gelir. İnsanda 5. haftada ortaya çıkan bu yapı genital kabartı olarak bilinir (Şekil 2.2). Parmağa benzer şekilde alt mezenkime doğru inen epitelsi kordonlar birincil cinsiyet kordonlarını andırırlar. Farklılaşmamış gonad yapısında dışta korteks, iç kısımda ise medulla bulunur. Embriyo XY cinsiyet kromozomlarına sahipse medulla testise dönüşür, korteks bir takım kalıntıları dışında dejenere olur (37).



Şekil 2.2. Primordiyal germ hücrelerinin gonadal kabartıya yerleşmesi (37).

Testislerin gelişimi, birlikte çalışan bir takım genler ile sağlanır. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici etkenler için SRY geni, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde oldukça önemlidir. Testis belirleyici etken (TDF) primitif cinsiyet kordonlarını uyarır ve farklılaşmamış gonadın medullasının derinlerine doğru uzamasına neden olur. Kordonlar burada dallanır ve anastomoz yaparlar. Böylece ağsı yapıdaki rete testis gelişir. Cinsiyet kordonlarının (seminifer kordonların) kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları

kaybolur. 12. haftada yoğun tunika albuginea'nın gelişimi testis gelişimi için oldukça belirleyicidir.

Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklılaşırlar. Seminifer tübüller, intersitisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenkimden ayrılırlar. 8. haftadan başlayarak Leydig hücreleri, androjen hormonlarını (testosteron ve androstenediyon) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar dış üreme organlarının erkek yönünde farklılaşmasını uyarmaktadır. İnsan koryon gonadotropin hormonu (hCG) testosteron üretimini uyarır.

Testosteron hormonunun miktarı 8-12 haftalık dönemde en yüksek değerine ulaşır. Testosterona ek olarak fetal testisler glikoprotein yapısında bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIF) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. Seminifer tübüllerin, ergenliğe kadar olan dönem boyunca lümenleri bulunmaz. Ergenlikten başlayarak lümen gelişir ve seminifer tübülleri oluştururlar (37) .

2.1.2. Anatomi ve Fizyolojisi

İnsanda bir çift testisin her biri yaklaşık 10-15 gr ağırlıkta, 4.5 cm boyunda ve 2.5 cm çapındadır. Testisler skrotum (scrotum) içerisinde korunmaya alınmıştır. Spermi üreten testisler için gerekli sıcaklık, vücut ağırlığından 2-3 °C daha düşüktür. Optimum sıcaklık 34 °C'dir. Skrotum sıcakta gevşeyerek sarkar ve vücuttan uzaklaşır. Soğukta ise büzülerek toplanır ve vücuda yaklaşarak testislerin optimum sıcaklıkta tutulması sağlanır. Bu hareketleri skrotumun kremaster (cremaster) kası gerçekleştirir. Testis ısısının korunmasında ter bezlerinin de rolü vardır (38,39).

Her bir testis 800-1000 kadar seminifer tübüllerden (tüpçüklerden) meydana gelmiştir. Bu seminifer tübüller sperm yapım yeridir. Bu tübüllerden genellikle 1-3 tanesi, sayısı 200-300 arasında değişen her bir lobül (lobcuk) içerisinde bulunur. Tübüllerin her biri yaklaşık 8 cm kadardır ve testis içerisine kıvrılmış yapıdadır.

Seminifer tübüllerin duvarı germinal doku ile kaplıdır. Bu germinal dokuda spermatojenik hücreler ve destek hücreleri (Sertoli hücreleri) olmak üzere farklı hücreler bulunmaktadır.

Spermatogenik hücreler: Spermatogonia, spermatosit ve spermatiddir. Destek hücreleri germinal spermin olgunlaşmasını sağlayan besleyici hücrelerdir. Bu destekleyici, besleyici Sertoli hücreleri aynı zamanda androjen bağlayıcı protein ve inhibin hormonu salgılar. İnhibin hipofizden salgılanan folikül stimülan hormon (FSH)'nu kontrol altında tutar (38).

Spermiler seminifer tübüllerden, yaklaşık 6m boyunda bir başka kıvrımlı tüpe iner ki bu yapı epididimdir. Epididim vas deferense açılır. Vas deferens prostat bezine girmeden vas deferens ampullası denen bir genişleme gösterir. Prostatın her iki tarafında yer alan seminal veziküller ampullanın prostat girişine açılırlar ve hem ampullanın hem de seminal vezikülün içerikleri ortak bir ejakülator kanalla prostat gövdesinden geçerek, internal üretraya boşalır. Prostat bezinden çıkan prostat kanalcıkları da ejakülator kanala açılmaktadır. Testisleri vücut dışına bağlayan zincirin son bölümü üretradır (40).

Seminifer tübüllerin arasında intertisyel endokrinositler veya Leydig hücreleri adı verilen androjenleri salgılayan endokrin faaliyet gösteren hücreler bulunur. Androjenlerin en önemlisi testosterondur.

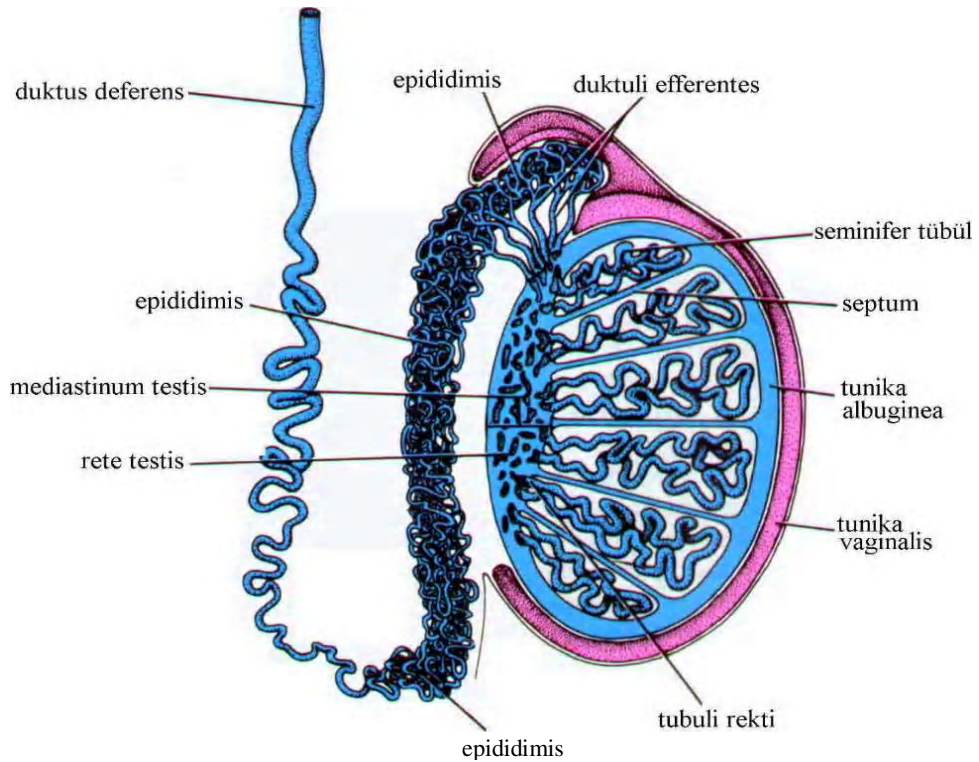
Testisler abdominal aortadan çıkan testiküler arterle kanlanır. Testislerin venöz kanı sağda V. Cava inferiore, solda V. Cava renalise dökülür. Testislerin innervasyonu otonom sinirlerle gerçekleştirilir. Testislerin skrotuma inişleri doğumdan 3-4 hafta önce tamamlanır. Bazı nedenlerden ötürü bu iniş gerçekleşmez ve genellikle sağ testisler inguinal kanalda kalır. Bu durum kriptorşidizm olarak adlandırılır. Abdominal boşlukta kalan testisler sperm oluşturma yeteneğini kaybeder. Bunda en önemli etkenlerden biri spermier için gerekenin üzerindeki ısıdır. Çocuk küçükken iki yaşına kadar uygulanan testisleri aşağı indirme operasyonları çocuğun ileride kısır olmasını engeller. Operasyon 5 yaşından sonraya kalırsa spermatogenez zarar görür (38).

2.1.3. Histolojisi

Erkek genital sistemi iki gonaddan (testisler), genital kanallar ile bu yollara açılan yardımcı bezler ve penisten oluşur. Genital kanal sistemi, tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejaculatorius ve hem genital hem de idrar boşaltım yolu olarak kullanılan üretradan oluşur. Yardımcı bezler ise, vesikula seminalis, prostat ve glandula bulboürethralistir (39,41).

2.1.3.1. Testisler

Testisler embriyonik gelişimi, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen endokrin ve ekzokrin fonksiyonlu bileşik tübüler bir çift bezdir (41,42). Bir çift testisin her biri yaklaşık 10-15 gr ağırlıkta, 4.5-5 cm boyunda ve 2.5 cm çapındadır. Testisler skrotum denen deri ve fibromüküler kesemsi bir yapı içinde asılı durumdadır. Skrotum içindeki testisler üç tabakalı kalın bir kapsülle kuşatılmıştır. Kapsülün dış tabakası tunika vaginalis, orta tabakası tunika albuginea ve iç tabakası tunika vasküloza olarak isimlendirilir. Tunika vaginalis iki yapraklıdır; parietal ve visseral yapraklar. Visseral yaprak tunika albugineaya yapışır, parietal yaprak ise skrotum iç yüzüne dayanır. Tek katlı mezotel hücrelerden oluşan tunika vaginalis genelde preparatlarda izlenemez. Kapsülün en kalın ve belirgin tabakası yoğun bir fibro elastik bağ dokusu olan tunika albugineadır. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Burada bezin içine giren fibröz septalar bu yapıyı testiküler lobüller denen yaklaşık 250 adet primidal bölmeye ayırırlar. Her testis lobülü kan damarlarını, sinirleri ve intertisyel hücreleri içeren gevşek bağ dokusu ile sarılı seminifer tübüllerden oluşur (39,41,42) (Şekil 2.3).

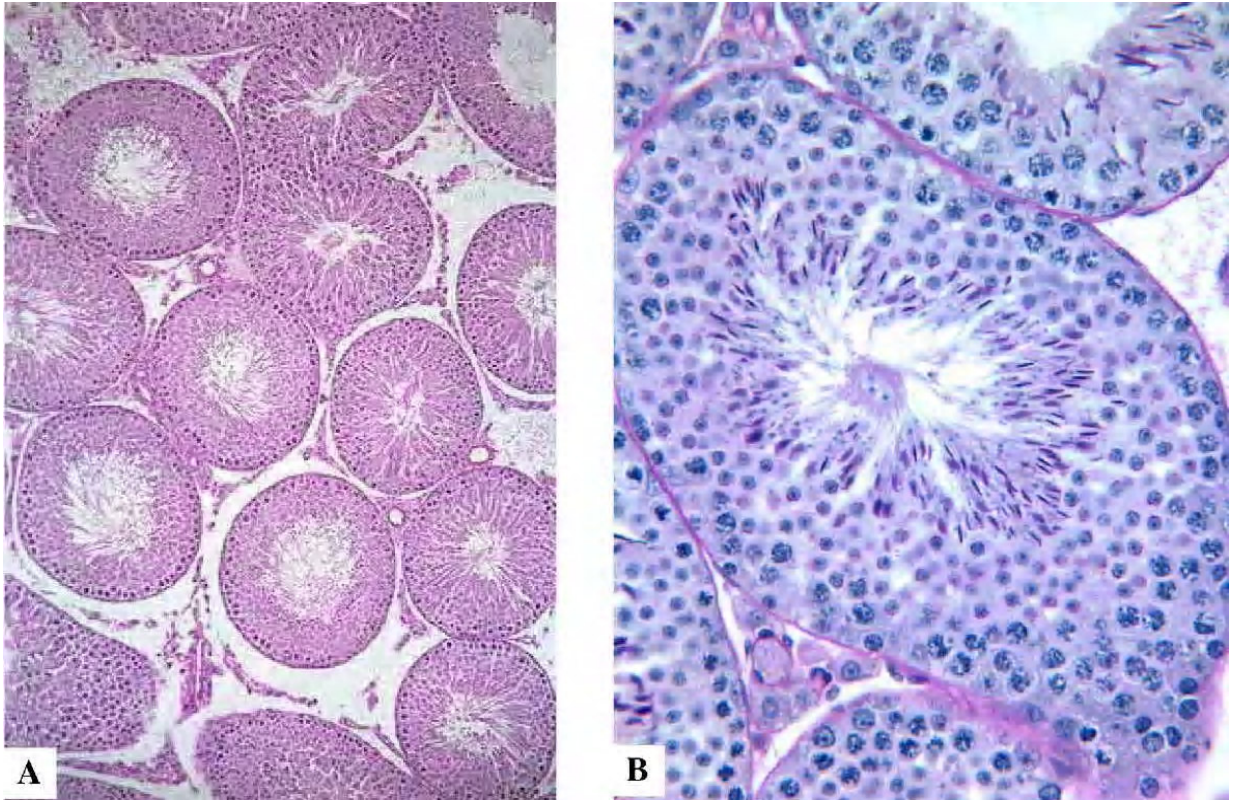


Şekil 2.3. Testisin Kısımları (43).

2.1.3.1.1. Tübüli Seminiferi Kontortiler (Seminifer Tübüller)

30-70 cm uzunluğunda, 150-200 mikron genişliğinde çok kıvrıntılı kanalcıklardır. Her iki testiste yaklaşık 500 kadar seminifer tübül bulunur (Şekil 2.4).

Kıvrımlı tübüller lobülün apeksine doğru kıvrımlarını kaybederek düz tüp biçimi alır. Bunlar tubuli rekti olarak adlandırılırlar. Tubuli rektiler boşaltıcı duktusların ilkidir. Düz tübüller mediastinumda bulunan anastomozlaşan kanallar olan rete testis ile devam eder. Rete testis, duktus deferens ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır (38,39). Seminifer tübüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, iyi bir bazal lamina ve kompleks bir germinal veya seminifer epitelden oluşur. Seminifer epitelde yer alan hücre gurubundan biri germ hücreleri olan spermatogenik hücrelerdir.



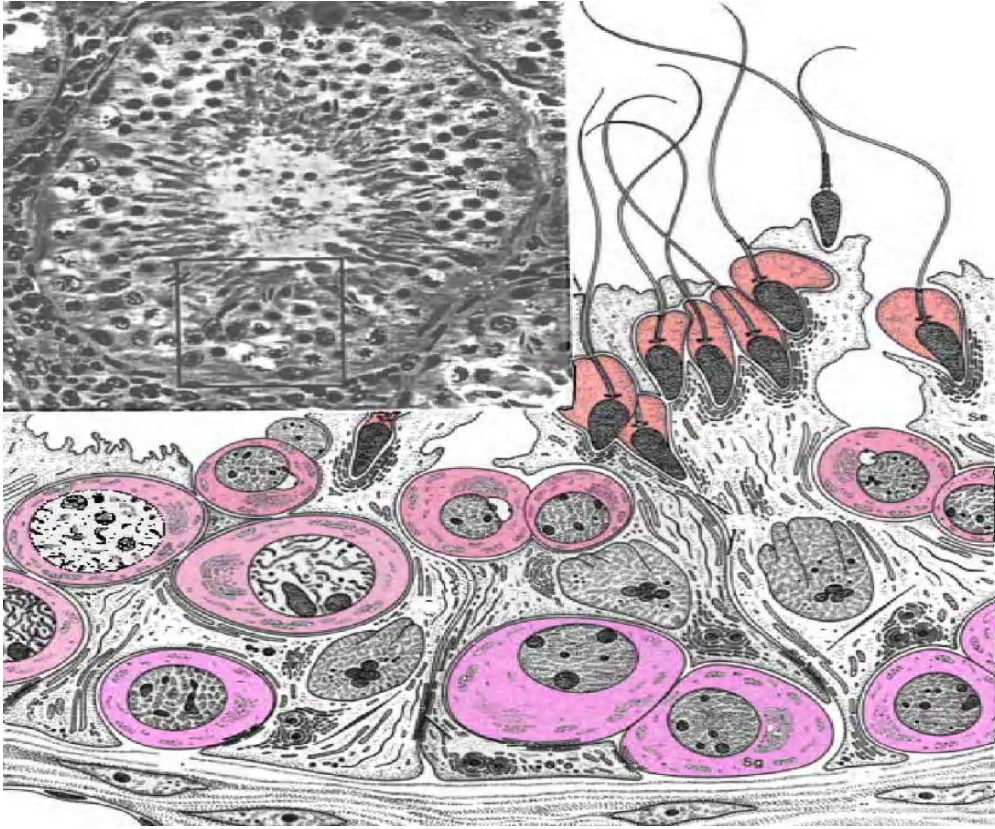
Şekil 2.4. Testiste Seminifer Tübüller. **A:** Genel Görünüm; **B:** Bir Seminifer Tübülün Enine kesiti (43).

Diğer hücreler ise germ hücrelerine destek olan ve onları besleyen Sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri bazal membrandan tübül lümenine kadar uzanan prizmatik hücrelerdir. Spermatogenetik hücreler ise birbiri üzerine sıralanmış farklı gelişim aşamasında olan

hücrelerdir. Bunlardan bazal membrana en yakın olanı spermatogonyumlardır. Lümene en yakın bulunan, daha olgun hücreler ise spermatidlerdir. Lümente spermiyumlar izlenir. Spermatogenik hücrelerin biçimleri farklı olduğundan tübül lümeni düzensiz görünümlüdür (39,41).

2.1.3.1.2. Sertoli Hücreleri

Bazal laminadan lümene doğru uzanan çok yönlü hücrelerdir. Yan yüzleri tohum hücrelerine uyum sağlayacak şekilde girintili çıkıntılıdır. Enine kesitlerde zor seçilirler. Eozinofilik sitoplazmaları, bazale yerleşmiş bir iki çentikli oval çekirdekleri vardır, çekirdekçik belirgindir (Şekil 2.5). Sertoli hücreleri iyi bir hücre iskeletine sahiptir ve tohum hücrelerine göre daha dayanıklıdır. Sertoli hücrelerinin mitotik aktiviteleri yoktur, bu nedenle çoğalamazlar. Komşu Sertoli hücrelerinin uzantıları birbirlerine sıkı bağlantılarla bağlanmıştır. Bu bağlantılar kan-testis bariyerini oluştururken epitel tabakayı bölmelere (kompartman) ayırır. Sertoli hücreleri bu bağlantılarla immünolojik koruma sağlar, tohum hücrelerinin beslenmesinde görev alır ve mekanik destek vererek hücrelerin lümene doğru hareketine aktif olarak katılırlar. Ayrıca spermiyogenez sırasında ortaya çıkan sitoplazma artıklarını fagosite ederler. Androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimini ve salgılanmasını sağlarlar. Embriyogenez sırasında Anti-Müllerian hormonunu üretirler. İnhibinin üretiminde ve salgılanmasında görevlidirler. Testiküler transferrin üretimi ve salgılanması yaparlar. Fruktozdan zengin, spermatozoonları besleyici ve taşınmasını kolaylaştırıcı salgıyı üretirler.



Şekil 2.5. Seminifer Tübülde Gelişmekte Olan Spermatojenik Hücreler Sertoli Hücreleri (43).

Androjen bağlayıcı hormon Sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronu bağlayarak seminifer tübül lümenine oradan da epididimise iletilmesine yardımcı olur.

Anti-müllerian hormon Sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Müller kanalının oluşumunu baskılar ve böylece embriyo gelişimi erkek olarak tayin edilir (43).

2.1.3.1.3. Spermatogenez

Primitif erkek germ hücreleri olan spermatogoniumlar seksüel olgunluğa ulaşmamış erkeklerin gonatlarında nadiren bulunurlar. Puberteden sonra olgun erkek germ hücrelerinin oluşması spermatogenez olarak bilinir. Spermatogoniumdan spermatozoon oluşumuna kadar erkek tohum hücrelerinin gösterdiği histolojik süreç spermatogenez olarak adlandırılır. Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarını ve DNA miktarını yarıya düşürerek spermatidleri oluşturduğu evre mayoz adını alır. Primer spermatosit birinci mayoz bölünmesi ile iki adet sekonder spermatosite bölünür. Bu bölünme ile primer spermatositin diploid kromozom sayısı haploide inmiş olur. Sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi sonucunda ise

spermatidler oluşur. Bu hücreler haploid kromozom ve DNA içeriğine sahiptirler. Spermatidlerin farklılaşarak hareketli spermatozoonlara (sperm) dönüşmesine spermiyogenez denir (41).

İnsanlarda spermatogenez ve spermiyogenez yaklaşık 9 haftalık bir sürede tamamlanır. Tübül bazal membranının hemen üzerinde yer alan spermatogoniumlar mitoz bölünme ile diğer spermatogenik hücreleri oluşturan ana hücrelerdir (41). Bunlar çekirdeğin büyüklüğü, kromatin dağılımı ve histokimyasal özelliklerine göre iki tipdir (42).

1. **Tip A (Stem cell):** seminifer tübülün bazal laminası üzerine oturmuş yassı çekirdekli hücrelerdir. Kromatin içeriğine göre koyu ve açık olarak ayrılmakta ve koyu olanlar rezerv hücreler olarak kabul edilmektedir. Mitozla çoğalınca yarısı Tip A olarak kalır, yarısı büyüyerek Tip B 'ye dönüşür. Yani Tip A, spermatogoniumların kaynağıdır.
2. **Tip B:** ana spermatogoniumlardan daha büyük hücrelerdir. Çekirdeği çok yuvarlaktır, koyu boyanır. Tip B'nin mitozla çoğalmasıyla oluşan hücrelerin hepsi farklılaşarak spermatosit 1'i yapar. Spermatosit 1 bazal laminadan uzaklaşır, hacmi artar (42).

Spermatosit 1 (primer spermatosit): seminifer epitelin orta bölümünde bulunan, küre ya da oval biçimli hacmi en büyük olan hücredir. Oluşur oluşmaz 1. mayoz bölünmeye uğrar.

Spermatosit 2(sekonder spermatosit): spermatosit 1'in mayoz bölünmesi sonucu oluşan haploid kromozomlu küçük hücrelerdir. Hemen 2. mayoz bölünmeyi geçirerek spermatidleri oluştururlar (42).

Spermatid

Haploid kromozomludur. Primer, sekonder spermatosit ve spermatidlerin aralarındaki sitoplazmik köprüler spermatogenezin düzenlenmesinde rol oynarlar. Spermatogenez tamamlanınca bu köprüler kaybolur ve hücreler serbestleşir. Spermatid bölünmez , şekil değişikliği ile spermiuma dönüşür. Spermatogoniumdan spermium oluşumuna kadar iki evre bulunur; spermatogoniumdan spermatid oluşması; spermatositogenezis, spermatidin şekil değiştirerek spermiumu oluşturması; spermiyogenezistir (42).

Spermiyogenezde seminifer tübüllerde yer alan Sertoli hücreleri önemli rol oynar. Değişim süresince spermatidler Sertoli hücre membranına bağlı kalırlar.

Spermiyogenezde hücrelerin yeni özellikler kazanarak değişmesi dört dönemde incelenir (41):

A- Golgi Fazı: Golgi bölgesindeki PAS+ proakrozomal granüllerin birleşmesiyle tek büyük bir granül oluşur. Glikoproteinden zengin içerikli bu pro akrozomal granüller nüklear kılıf yakınındaki membranla sınırlı akrozomal veziküllerle birleşirler (39,41,42). Akrozomal veziküllerin bulunduğu bölge gelişen spermin ön kutbunu belirler. Bu dönemde sentrioller de arka kutba doğru göç eder. Burada sperm kuyruğunun aksonemini oluşturacak olan mikrotübüller sentriolden başlayarak yapılırlar (41).

B- Başlık (Cap) Dönemi: Akrozomal vezikül nükleusun ön bölümünü kaplayacak şekilde genişleyip şapka gibi bu bölümü kuşatır (akrozomal kep). Nüklear kılıfın buraya bakan bölümünün porları kaybolur, kılıf kalınlaşır, nükleus yoğunlaşır (41).

C- Akrozom Dönemi: Bu dönemde belirgin bir şekil değişikliği yaşanır. Sperm başı Sertoli hücrelerinin sitoplazmasının derinlerine gömülür. Kuyruk flagellumu iyice uzayarak lümende belirgin olarak görülmeye başlar. Yoğunlaşmış nükleus yassılaşır ve uzar. Akrozom apikal plazma membranına iyice yaklaşır. Sitoplazmik mikrotübüller akrozomun arka yüzünden spermatidin arka kutbuna uzanan silindirik bir kılıf şeklinde organize olurlar (41). Akrozomal vezikül çekirdeğe doğru ilerleyerek çekirdek dış zarına yapışır. Akrozomal vezikülün içerdiği sıvı resorbe olunca, büzülür ve çekirdeği kep gibi saran iki yapraklı bir kese durumuna geçer. Akrozomda birçok hidrolitik enzim bulunur. Bu nedenle akrozom özel tip lizozom olarak yorumlanabilir. Bu enzimlerin hücreleri korona radiatadan ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir (39,42).

D- Ogunlaşma Dönemi: Sitoplazma miktarının azaldığı son dönemdir. Fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır. Spermatidler birbirleri ile olan bağlantılarını kaybederler, Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümene düşerler (41).

Lümene bırakılan spermiumlar morfolojik olarak matür, fakat fonksiyonel olarak immatürdür. Hareketsizdir ve ovumu dölleme yeteneği sınırlıdır. Ogunlaşmanın son

kısmı olan kapasitasyon ejakülasyondan sonra kadın organizması içinde, döllemeden kısa bir süre önce spermde görülen enzimatik değişikliktir. Spermiumlar seminifer tübül ve boşaltıcı duktus sistemi içindeyken hareketli değildir (42).

Spermatozoon

Yaklaşık 60 mikrometre kadar boyda ve en kalın yerinde 1 mikron çapında olan spermde üç bölge ayırt edilir.

Baş kısmı; DNA ile akrozom denilen lizozom benzeri bir yapıyı ihtiva eder. Akrozom hiyaluronidaz ve proteinaz gibi enzimleri ile spermin sekonder oosit içerisine girebilmesine yardım eder.

Boyun kısmında; spermin hareketleri için gerekli olan enerjiyi sağlayan çok sayıda mitokondri bulunur.

Spermin hareketini sağlayan kuyruk kısmı ise; 55 mikron ile en uzun kısımdır. Esas ve distal parça olmak üzere iki kısma ayrılır. Başlangıç kısmında flagellum, flagellumun çevresinde fibröz kılıf, ince bir sitoplazma ve plazmalemma görülür. Kuyruğun son kısmında fibröz kılıf bulunmaz. Bu kuyruk sayesinde sperm dakikada yaklaşık 4 mm yol alır (38).

İnterstisyel Doku

Seminifer tübüllerin arasında yer alan interstisyel bağ dokusu, kollajen lifler, kan ve lenfatik damarlar, sinirlerden zengin gevşek bağ dokusudur (41,44). Bu dokuda fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve farklılaşmamış mezenşimal hücreler bulunur (44). Leydig hücreleri veya interstisyel hücreler olarak adlandırılan yuvarlak veya poligonal şekilli, yuvarlak nükleuslu, asidofil sitoplazmalı hücreler bağ dokusu içerisinde tek tek veya gruplar şeklinde görülürler. Bu hücreler testisleri meydana getiren lobüller arasındaki bağ dokusu bölmelerinde bulunurlar (45). Leydig hücreleri testosteron hormonu üretimi ve salgılanmasından ve ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden sorumludur (46-49). Bu hücreler salgıladıkları testosteron hormonu (toplam testosteronun % 95'ini üretir, geri kalan %5 surrenal kortekste üretilir) ile spermatogenezi devam ettirir (48, 50).

Steroid sentezleyen hücre özelliği gösteren bu hücrelerin sitoplazmalarının en tipik özelliği çok sayıda lipid damlasının bulunmasıdır. Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında yaygın agranüler endoplazmik retikulum bulunur. Sitoplazmada ayrıca çok miktarda

mitokondri, lipofuksin pigmenti, çubuk şeklinde bir inklüzyon olan Reinke Kristalleri görülür. Yaşla birlikte Reinke kristalleri ve lipokrom pigmentinin miktarları çoğalır (41). Bu kristaller genel histolojik boyalarla boyanmazlar ve ışık mikroskobunda görülmezler. Elektron mikroskobu ile yapıları ayrıntılı olarak görülebilir (44).

Leydig hücreleri, diğer iç salgı bezleri gibi bir epitel yüzeyinden değil, mezenkim kaynaklı stromadan gelişen, iyi damarlanma gösteren bir iç salgı bezi meydana getirir. Testislerin iç salgı işlevi Leydig hücreleri tarafından yürütülür (51,52). Androjen bağımlı olan testiste hormon salgılanması Leydig hücrelerinin sayıca çoğalması, yapısal değişim geçirmeleri ve testosteron üretebilme yeteneğini kazanmalarına bağlıdır. Burada LH, Leydig hücre işlevlerinde düzenleyici bir anahtar gibidir ve bu hücrelerinin farklılaşma ve çoğalması için vazgeçilmez bir hormondur (53).

Leydig hücreleri sentezledikleri testosteron hormonunu birlikte bulundukları kan veya lenf kapillerlerine boşaltarak endokrin sekresyon yaparlar. Leydig hücrelerinin hem etkinlikleri ve hem de miktarları hormon uyarımlarına bağlıdır. İnsanda gebelik sırasında üretilen plasenta gonadotrop hormonu anne kanından fetüse geçerek bol miktardaki androjen hormonunu üreten farklılaşmamış Leydig hücrelerini uyarır.

Hormonların bulunması embriyonel farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Farklılaşmamış Leydig hücreleri gebeliğin 4 ½ ayına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra bu hücreler gebelik boyunca hipofizden salınan LH uyarısı ile testosteron sentezini yeniden yapmaya başlayacakları ergenlik öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (45). Testosteron ve diğer androjenler, embriyoda erkek fetusun gonatlarının gelişmesi için esastır. Pubertede sperm üretiminin ve aksesuar bezlerin sekresyonunun başlaması ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi için gereklidir. Erişkinlerde ise spermatogenezin, bezlerin sekretuar aktivitelerinin ve sekonder seks karakterlerinin devam etmesi için gereklidirler (41).

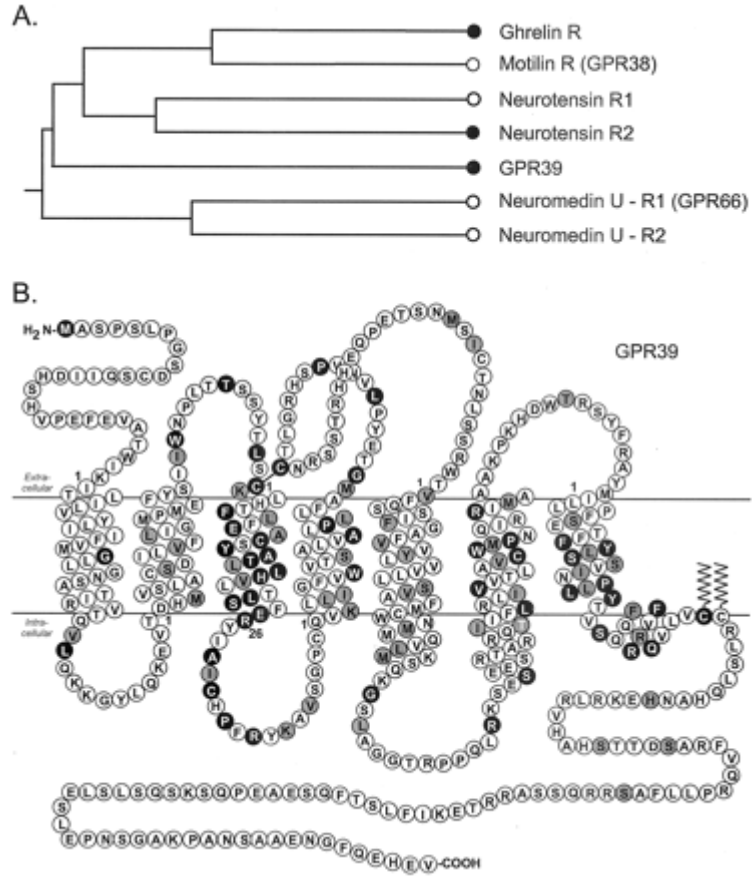
Olgun Leydig hücreleri doğumdan sonraki birkaç hafta dışında, normal olarak çocuk testisinde 10 yaşına kadar bulunmaz. Leydig hücrelerinin sayıları ergenlikle çoğalırken ileri yaşta azalır.

20 yaşındaki bir erkekteki Leydig hücre sayısı 60 yaşındaki bir erkekteki Leydig hücre sayısının 2 katından fazladır (54).

2.2.GHRELİN

Ghrelin, gastrointestinal sistem tarafından üretilen, santral etkiyle yeme davranışı ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde görev alan bir peptit hormondur. Ghrelin ilk kez 1999 yılında Kojima ve ark (1) tarafından farelerin midesinde tanımlanmıştır. Ghrelin ismi, Hint-Avrupa dilleri ailesindeki gelişim anlamına gelen “grow” sözcüğünün kökü olan “ghre” ile salgılatma anlamına gelen “relın” sözcükleri birleştirilerek türetilmiştir. Ghrelin, in vivo ve in vitro olarak GH (büyüme hormonu) salınımını uyaran GHRH (büyüme hormonu salgılatıcı reseptör) için spesifik endojen bir ligandır. Ghrelin midenin oksintik mukozasında yer alan, endokrin fonksiyonlara sahip X/A hücreleri tarafından üretilmekte ve 28 amino asit içermektedir (2,3) (Şekil 2.6). Midenin yanı sıra daha az miktarda bağırsak, böbrek, hipofiz bezi, plasenta, testis ve hipotalamus tarafından da üretilip dolaşıma verilmektedir (4-7). Memelilerde ghrelin homologları insan, sıçan (1), köpek, koyun, domuz, sığır, rhesus maymunu (55) ve farelerde de tanımlanmıştır (56). Moleküler ağırlığı yaklaşık 3300 Dalton olan memeli ghrelinleri birbirine tamamen benzer değildir. Fare ve sıçan ghrelini de aynı yapıya sahiptir ve insanda olduğu gibi 117 amino asitten oluşur (1).

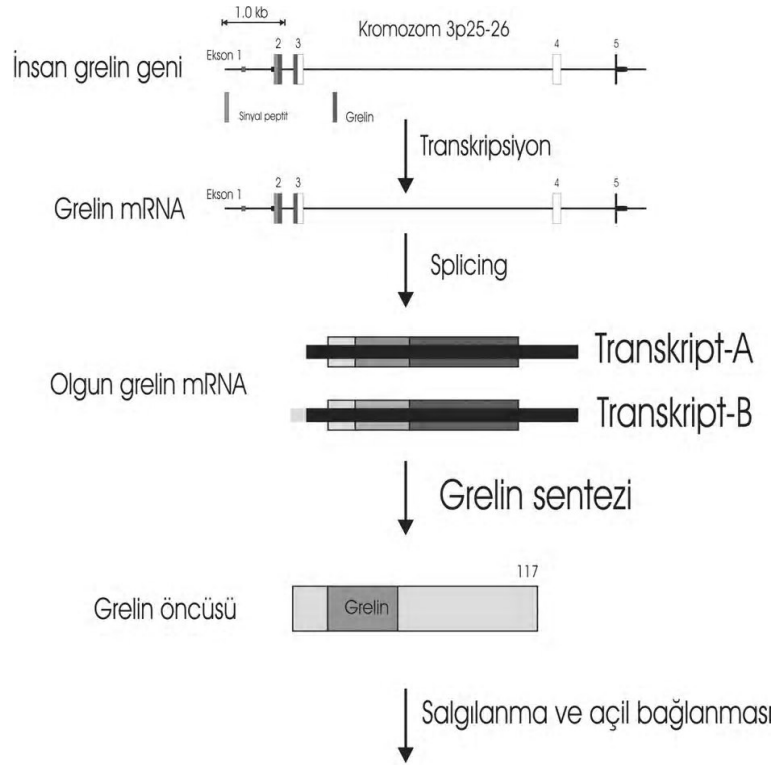
Ghrelin öncülü olan preproghrelin 117 aminoasitten oluşur. Salınmadan önce sitoplazmada enzimatik bir işlemde geçer, üçüncü pozisyonundaki serin'e n-octanoyl eklenir bu da ghrelin'in GH salgılatıcı etkinliğini aktive etmek için gereklidir. Bu post translasyonel değişim, ghrelin molekülüne kazandırdığı hidrofobik özelliğiyle kan-beyin bariyerini kolayca geçer. Özel olarak da hipotalamus ve hipofize geçişine imkan sağlamaktadır. Hücre biyolojisinde ilk defa, salınan bir proteinde açıl bağlanması işlemi gözlenmiştir. Bu orijinal sentezin sonunda olgun ghrelin oluşur. Açıl grubu taşımayan ghrelin formu olan des-octanoyl-ghrelin'in hipotalamik ve hipofizer reseptörlere bağlanamadığının görülmesi, n-octanoyl grubunun moleküle kazandırdığı hidrofobik özelliğin, ghrelin'in GHRH ile bağlanmasında da çok önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir (57). Bu arada testise spesifik ghrelin kökenli bir transkript (GGDT) bulunmuştur. Bu molekül 12 aminoasit büyüklüğündedir (58) (Şekil 2.7, 2.8).



Şekil 2.6. Ghrelin Reseptörü (1)



Şekil 2.7. Açillenmiş Ghrelinin İnsan Ve Sıçandaki Aminoasit Dizilimi (1).



Açıllanmış grelin

Şekil 2.8. Ghrelin Sentezi (1).

2.2.1. Ghrelin Hormonunun Dokulardaki Dağılımı

Vücutta ghrelin üretimi ile ilişkili iki hücresel alan bulunmaktadır. Birincisi oksintik bez (midenin asit salgılayan parçası); ikincisi ise nöronal hücre gruplarının sinaptik ileti ile ghrelin salınımı yaptığı santral sinir sistemi. Ghrelin çoğunlukla mide fundus mukozası oksintik bezleri içerisindeki X/A-benzeri hücreler tarafından üretilir (1). Ghrelin mRNA'sının ekspresyonu revers transkripsiyonu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle az miktarda da testis (32), prostat (58), plasenta, hipofiz, ince barsak, beyin (59), böbrek (60), pankreas (61) ve diğer birçok organda gösterilmiş olması, onun birçok biyolojik aktivitede düzenleyici rol oynayan bir peptid olduğunu göstermektedir .

Dolaşımda bulunan grelinin büyük miktarı mideden salgılanır. Yüzde otuz kadarı gastrointestinal kaynaqlıdır (62). Bağırsakta duodenumdan kolona indikçe ghrelin konsantrasyonu azalır. Santral sinir sisteminde ghrelin mRNA ve immunoreaktif peptid düzeyleri çok düşüktür. Hipotalamusta ghrelin peptidi ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. ARC'de sentezlenir, ancak ghrelin-pozitif nöronların sayısı düşüktür (1,63). Kalp

ventriküllerinde bulunan GHRH reseptörü ghrelinin kardiovasküler etkileri olabileceğini düşündürmektedir.

Nöroendokrin tümörler tiroid ve medüller tiroid karsinomaları ve akciğer tümörleri gibi değişik tümör dokularında da ghrelin saptanmıştır.

Ghrelinin kan-beyin bariyerini geçebileceği hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir. Fare ghrelini insan ghrelininden 2 aminoasit farklı olduğundan beyinden kana geçebilir ancak kandan beyine geçiş çok azdır; insan ghrelini ise her iki yöne de geçebilir.

Ghrelin önemli miktarda böbrek dokularında da tespit edilen bir hormondur. Sıçanların böbrek dokularında pre-proghrelin gen ekspresyonu belirlenmiştir (64). Ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi ve Radyo İmmuno Assay (RIA) yöntemi ile fare böbreğinin ghrelin ürettiği tespit edilmiştir. Sıçan mezengial hücre ve fare podosit hücre kültüründe pre-proghrelin gen ekspresyonu da belirlenmiştir (6).

Meme dokusunun ghrelin sentezlediği bildirilmiştir. Anne sütündeki miktarları RIA ile saptanmıştır (65,66). Laktasyonun farklı aşamalarındaki (kolostrum) anne sütünde ghrelin konsantrasyonunun da farklılık gösterdiğine işaret edilmektedir (65).

Ghrelin hormonunun, reproduktif sistemde de bulunduğu bildirilmiştir. Üremenin kontrolünü, üreme ile ilgili hormonların salınımına etki ederek yaptığı düşünülmektedir (36,67). Bazı çalışmalarda, ghrelin hormonu farklı deney modellerinde LH'nın salgılanmasını, GnRH'yı inhibe ederek engellediği belirtilmektedir. Aynı zamanda FSH'da artırmaktadır (68). Gonadektomize yapılmış dişi ve erkek sıçanlardaki ghrelin seviyelerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır (34,69).

Ghrelin aynı zamanda testisin Leydig hücrelerinde de eksprese edilmektedir. Ghrelinin fonksiyonel reseptörü olan GHRH 1a da testislerdeki Sertoli ve Leydig hücrelerinde tespit edilmiştir (35). Ghrelin, LH ile uyarılmış testosteron ile inhibe edilmektedir (27). Merkezi olarak ghrelin uygulanması LH/FSH seviyelerini değiştirmemektedir (4). Hipogonadal erkeklerde eşleştirilmiş kontrollere göre ghrelin düzeyleri düşük bulunmuştur ve testosteron idame tedavisi ile eski düzeylerine geldiği gösterilmiştir (70).

Bilindiği gibi LH ön hipofizdeki gonadotrop hücrelerden salınarak, erkeklerde de Leydig hücrelerini etkileyerek bu hücrelerde testosteron oluşumunu ve salınımını uyarır (71). Bu bilgiler ışığında ghrelinin spermatogenezis üzerinde dolaylı ve hipofiz üzerinde

de LH salınımının ayarlanması açısından da doğrudan etkili olabileceğini düşündürmektedir. Sıçanlarda, Leydig hücrelerinde (28), insanlarda Leydig ve Sertoli hücrelerinde (29), koyunlarda ise bu hücrelere ek olarak özellikle seminifer tübüller içerisindeki germ hücrelerinde ghrelin ekspresyonu görülmüştür (30). Tüm bu çalışmalar, ghrelinin reproduktif sistem üzerinde, özellikle Leydig hücrelerinde ve testosteron sentezinin ayarlanmasında düzenleyici olarak görev aldığını göstermektedir (72).

Ghrelinin endometriyumda ekspresyonu ve plasentada da sentezlendiği gösterilmiştir. Gebelik boyunca sıçan overinde ghrelin mRNA ekspresyonu olduğu görülmüş ve gebeliğin erken döneminde geç döneme göre daha fazla ghrelin bulunduğu tespit edilmiş. Ghrelin verilen sıçanların yavrularının daha büyük olmasından dolayı fetal büyümede ghrelinin rolü olabileceği düşünülmüştür (7,73,74). Embriyonik implantasyon konusunda da ghrelin ve GHRH'lerin muhtemel otokrin ve parakrin rolleri olabileceği üzerinde durulmaktadır (4).

2.2.2. Ghrelin Sekresyon Mekanizması

Ghrelin pozitif hücreler kapillerlere yakın yerleşimlidir ve oksintik bez lümeni ile irtibatı yoktur. Bu da salınımın gastrointestinal kanala değil, gastrik damarlara olduğunu göstermektedir. Böylelikle de tüm vücudu dolaşır (75).

Gastrik ghrelin sekresyonu lokal veya merkezi uyarım ile düzenlenebilir. Bu da mekanik uyarı, mide lümenindeki sindirim ürünlerinin hareketi, sistemik dolaşımdaki maddeler ve merkezi sinir sisteminden gelen uyarıları kapsar. Ghrelin hipotalamusda lateral, arkuat (besin alınınının düzenlendiği merkez), ventromedial, dorsomedial ve paraventriküler hipotalamik çekirdekler arasında bulunan bir takım nöronlardan da salınır.

Ghrelin'in yarı ömrü 60 dakikadan kısadır (76) çünkü plazma esteraz'ı tarafından kolayca yıkılır ve des-octanoyl-ghrelin'e dönüşür ki bu molekül inaktiftir (59). Plazma konsantrasyonu 200-600 ng/L'dir fakat %80'i deamide ghrelindir, yani biyolojik aktiviteden yoksundur.

2.2.3. Ghrelinin Etkileri

Ghrelinin organizmada çok çeşitli sistemler üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir

1. Yemek yeme ve uyku üzerine etkisi

- 2.Hücre proliferasyonu üzerine etkisi
- 3.Kardiovasküler etkiler
- 4.Karbonhidrat metabolizması ve enerji metabolizması üzerine etkileri
- 5.Pankreatik ekzokrin ve endokrin fonksiyonu üzerine etkisi
- 6.Gastrointestinal sistem üzerine etkisi
- 7.Diğer endokrin etkiler

Enerji homeostazisi üzerine olan etkileri, üretim yerinden bağımsız olup, santral sinir sisteminde (SSS) hipotalamus düzeyinde ortaya çıkmaktadır (8). Hipofiz bezindeki büyüme hormonu (GH) salgılayıcı etkisinden bağımsız olarak ghrelin'in kemiricilerde icv ve ip uygulamalarından sonra besin alınmasını potansiyel olarak uyaran bir bağırsak-beyin peptidi gibi hareket ettiği gösterilmiştir (9-12).

Uzun süreli uygulamalar ile fareler ve sıçanlarda ghrelin'in vücut ağırlığı ve yağlanmayı artırdığı gösterilmiştir (10,11). İnsanlarda iv ghrelin uygulanması kendi başına alınan öğünlerdeki besin alımında %28'lere kadar yükselen bir iştah artışına yol açabilmektedir (11). Ghrelin'in iştah açıcı etkisi; kemiricilerde periferik uygulanmasına bağlı olarak hipotalamik bölgedeki c-Fos nöronların anlamlı bir artışına bakılarak hipotalamik arkuat nukleusların uyarılması sonucunda muhtemelen ortaya çıkmaktadır (13,14). Spiegelmer NOX-B11, daha önceleri yapılan çalışmalarda ghrelin'i bağladığı gösterilen sentetik bir L-oligonüklottir. Bu maddenin uygulanmasıyla ghrelin'in yol açtığı besin alımı ve sıçanlardaki arkuat nukleuslardaki c-Fos etkisinin baskılandığı gösterilmiştir (9).

Ghrelin'in GH ve insülin eksenindeki rolü değerlendirildiğinde sadece insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ile ghrelin arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (15). Aynen ghrelin düzeylerinde olduğu gibi IGF-1 düzeyleri de erişkin döneme yaklaştıkça azalmakta, GH'dan bağımsız olarak nütrisyonel durumdan etkilenmekte ve ayrıca iu büyüme geriliğinde düzeyleri artmaktadır (16,17). Östrojen, GH ve IGF-1 ile ilgili yapılan pek çok çalışmada bu hormonların doğrusal (lineer) bir büyüme ile yakın ilişki gösterdikleri ifade edilmektedir. GHRH, somatostatin ve ghrelin; GH ekseninde yer almakla birlikte, seks steroid hormonlarının ve özellikle de östrojen'in bu konudaki önemi iyi bilinmektedir (18,19). Çünkü GH salınımını düzenlemektedirler ve insan hayatının belirli dönemlerinde her iki cinsiyette de GH salınımını baskılamaktadırlar. Kanda dolaşan GH düzeyleri yaşa bağlı olarak değişiklikler gösterir; plazma GH

konsantrasyonu puberte döneminde belirgin bir şekilde artarken, yaşı ilerlemesiyle birlikte ve seks steroidlerinin de etkisiyle bu değişiklikler belirgin hale gelir (18-20). Üstelik GH salınımı erişkin sıçanda dimorfizm gösterir ve bu seks steroidleri GH salınımı üzerinde önemli bir rol oynarlar (21). Hatta erişkin erkek sıçanların kastre edilmesi (testislerinin çıkarılması); hipotalamik GHRH ve somatostatin'in mRNA miktarlarında anlamlı bir şekilde azalma ortaya çıkartır (18,22). Bu durum, seks steroidlerinin GH eksenini düzenleyen GHRH ve somatostatin ile ilgili nöronlarının etkilendiğinin bir işaretidir (23).

Ghrelinin merkezi sinir sistemi aracılığı ile reproduktif sistemin kontrol edilmesinde de rol oynadığı düşünülmektedir. Organizmanın gelişiminde ve vücut ağırlığının korunmasında anahtar rol oynayan birçok faktörün (GHRH, leptin, IGF gibi) testiküler fonksiyonların ayarlanmasında da etkin olduğu gösterilmiştir (35). İnsan, sıçan ve koyunlarda yapılan çalışmalar, ghrelinin ve reseptörünün erkek gonadlarında özellikle Leydig hücrelerinde, Sertoli hücrelerinde ve tübüller içindeki spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerde eksprese edildiğini göstermektedir (29, 30).

Ayrıca ghrelinin ve onun fonksiyonel reseptörü (GHRH tip1a) sıçan ve insanda immunreaktif olarak ve gen ekspresyonu sonucunda, reproduktif sistemin kontrolünde önemli yeri olan hipotalamus bölgesinde bulunmuştur (1,4,77). Dişi sıçanlarda merkezi sinir sistemine (MSS) icv olarak uygulanan ghrelinin, LH sekresyonunu baskılamıştır (36,67). Bir başka çalışmada, erkek prepubertal sıçanlarda kanda hormon düzeylerine bakıldığında, iv uygulanan ghrelinin LH sekresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Prepubertal sıçanlara icv olarak verilen ghrelinin LH salınımını belirgin derecede azalttığını, FSH salınımını ise etkilemediği bildirilmiştir. Ayrıca doku kültürü çalışmalarında in vitro uygulanan ghrelinin her iki gonadotrop hormonun salınımını artırdığı açıklanmıştır (71).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, yerel etik kurulu onayı alındıktan sonra Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde üretilmiş olan Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar için önerilen uygun çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlandı ve sıçanlar ışıklandırması 12 saat aydınlık-12 saat karanlık (19:00-7:00 saatleri arası karanlık), havalandırması (%60-70 nem), oda ısısı (20-24 °C) kontrol edilen bir odaya yerleştirildi.

3.1. DENEY PLANI

Sıçanlar seksüel gelişimlerini düzenlemede, 1 (neonatal), 5 (infantile), 15 (prepubertal), 20 (prepubertal), 30 (pubertal-early adult), 45 (pubertal-early adult) ve 75 (adult) günlük olmak üzere yedi guruba ayrıldı. Yeni doğanlar 1 günlük olarak hesaba katıldı. Her grupta n:10 olmak üzere 70 hayvan kullanıldı. Grup ve deneklerin dağılımı Tablo 3.1’de gösterilmektedir. Bu yedi grup hayvana hiçbir işlem uygulanmadı. Deney grupundaki her hayvan deneyde planlanan döneme geldiğinde ketamin + xylazin uygulanarak sakrifiye edildi. Sıçanların testisleri hızlıca çıkarılarak %10’luk nötral formalin solüsyonunda bir gece fikse edildi. Tüm gruplara ait fare testislerinde genel prosedüre uygun histolojik takip yapıldı ve parafin bloklara gömüldü (tablo 3.2). Parafin bloklardan 4-5µ’luk kesitler alındı ve normal histolojik yapının incelenmesi için

Hematoksilen- Eozin ile boyandı (Tablo 3.3). Yine parafin bloklardan alınan 4-5µ'luk kesitlere immunohistokimya boyama (Tablo 3.4) yapılarak incelendi.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan sıçanların gruplara göre dağılımı

Grup	N	Gelişim Basamağı
Grup I	10	1 Günlük (Neonatal)
Grup II	10	5 Günlük (İnfantil)
Grup III	10	15 Günlük (Prepubertal)
Grup IV	10	20 Günlük(Prepubertal)
Grup V	10	30 Günlük(Pupertal)
Grup VI	10	45 Günlük(Pupertal)
Grup VII	10	75 Günlük(Adult)

Tablo 3.2. Parafin doku takip yöntemi aşamaları

Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	%10'luk nötral formalin	1 gece
2	Akarsu	1 saat
3	% 50'lik etil alkol	2 saat
4	% 70'lik etil alkol	2 saat
5	% 90'lik etil alkol	2 saat
6	% 96'lik etil alkol-I	2 saat
7	% 96'lik etil alkol-II	2 saat
8	Absolu alkol-I	2 saat
9	Absolu alkol-II	2 saat
10	Ksilen	2 saat
11	57 0C'de etüvde eriyik parafin	1 gece
12	Gömme	

Tablo 3.3. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	Bir saat
2	Ksilen-I	20 dak
3	Ksilen-II	20 dak
4	Ksilen-III	20 dak
5	Absolu alkol-I	20 dak
6	Absolu alkol-II	20 dak
7	% 96 Alkol	20 dak
8	% 80 Alkol	20 dak
9	% 70 Alkol	20 dak
10	% 50 Alkol	20 dak
11	Akarsu	5 dak
12	Hematoksilen	7-8 dak
13	Akarsu	5 dak
14	Eozin	4-5 dak
15	Akarsu	5 dak
16	% 50 Alkol	10 dak
17	% 70 Alkol	10 dak
18	% 80 Alkol	10 dak
19	% 96 Alkol	10 dak
20	Absolu alkol-I	10 dak
21	Absolu alkol-II	10 dak
22	Ksilen-I	10 dak
23	Ksilen-II	10 dak
24	Kapatma	

3.2. İMMUNOHİSTOKİMYA

Testis dokusunda ghrelin immunohistokimyasal reaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi kullanıldı. Boyama metodu tablo 3.4 'de ayrıntılı olarak verilmiştir. Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. 60 °C'lik etüvde bir saat deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için %1,5'lik normal tavşan serumuyla muameleden sonra primer antikor (*Ghrelin goat poliklonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, California, U.S.A*) ile oda ısısında 1saat inkübe edildi. Sekonder antikor (*goat-rabbit IgG, Santa Cruz Biotechnology, California, U.S.A*), strepavidin HRP (Horse Radish Peroksidaz) ve DAB (Diaminobenzidine) kromojeni uygulandıktan sonra Gill hematoksilenle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine PBS (phosphate buffer saline) kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı.

Alkol ve xylol'den geçirilen dokular entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BX51) incelenerek fotoğraflandı.

Tablo 3.4. İmmunohistokimyasal Boyama Basamakları

Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Xylol	15 Dk
2	%100 Alkol	5 Dk
3	%90 Alkol	5 Dk
4	%70 Alkol	5 Dk
5	Distile Su	5 dk
6	EDTA Buffer	20 dk
7	Distile Su	5dk
8	H ₂ O ₂	10 dk
9	PBS	10 dk
10	Primer Antikor (Ghrelin)	1 sa (oda ısısı)
11	PBS	10 dk
12	Sekonder Antikor	10 dk
13	PBS	10 dk

Tablo 3.4. İmmunohistokimyasal Boyama Basamakları (devamı)

Sıra	Yapılan işlem	Süre
14	Streptavidin HRP	10 dk
15	PBS	10 dk
16	DAB Kromojen	10 dk
17	Distile Su	10 dk
18	Gill Hematoksilen	2-3 dk
19	Distile Su	5 dk
20	% 70 Alkol	5 dk
21	% 96 Alkol	5 dk
22	% 100 Alkol	5 dk
23	Xylol	15 dk
24	Kapatma	

4.BULGULAR

Çalışmadaki testis dokularının yapısının incelenmesi için Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yapıldı. Yapılan boyama sonucunda dokularda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmadı.

Ghrelın antikoru ile yapılan immunohistokimyasal boyama sonucunda, her dönemde (neonatal, infantil, prepuberte, puberte ve erişkin) ve tüm gruplarda (1,5,15,20,30,45,75 günlük) immunohistokimyasal reaksiyon özellikle intersitisyel alanlarda Leydig hücrelerinde eksprese edilmiştir. Seminifer tübüller içindeki Sertoli hücrelerinde ve spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerde reaksiyona rastlanmamıştır. Çalışmamızda sadece 45 günlük grupta Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında immunohistokimyasal reaksiyona rastlanmıştır. Diğer grupların Sertoli hücreleri immunohistokimyasal reaksiyon bakımından negatiftir.

Leydig hücrelerinde tespit edilen boyanmanın tamamen hücre sitoplazmasında ve granüler tarzda olduğu görülmüştür. Hücre çekirdeği immunohistokimyasal boyanma açısından negatif reaksiyon vermiştir.

Testis dokusunda bulunan Leydig hücreleri immunohistokimyasal boyanma yoğunluğuna göre bir skala kullanılarak negatif (-), çok hafif/eser (+-), az yoğun (+), orta şiddette (++) , yoğun şiddette (+++) boyanma şeklinde skorlandı. Değerlendirme iki uzman histolog tarafından yapıldı.

Boyanma şiddetlerinin yaşa göre dağılımı Şekil 4.1 'de gösterilmiştir.

H-E boyama yapılan bir günlük sıçan testisi içinde bulunan seminifer tübüllerin lümenlerinin belirgin olmadığı, etrafında tek katlı mekik şekilli myoid hücre tabakası bulunduğu gözlemlendi. seminifer tübül içindeki spermatojenik seriye ait çok katlı epitel görüntüsü burada izlenmedi. Dokularda tek katlı kübik epitel görüntüsü vardı. Tübüller içindeki hücrelerin, Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlardan ibaret olduğu görüldü. Seminifer tübül arasında bulunan gevşek bağ dokusunun fazla miktarda bulunduğu, intertisyal alan içinde küçük kapillerlerin, olgun veya olgunlaşmamış Leydig hücrelerinin yer aldığı gözlemlendi (Şekil 4.2).

Bir günlük (neonatal) gruptan boyanan Leydig hücrelerinde çok hafif şiddette immunohistokimyasal reaksiyon (+-) görülmüştür (Şekil 4.3). Boyanan 1 günlük gruba ait preparatların %60'ı Leydig hücrelerinde çok hafif immunohistokimyasal reaksiyon verirken % 30'u immun negatif reaksiyon vermiştir (Tablo 4.1). Bunun sebebi olarak dokunun küçüklüğü ve buna bağlı olarak reaksiyon beklenen Leydig hücrelerinin tam gelişmemesi veya Leydig hücrelerinin hormon salgılama faaliyetlerinin tam başlamamış olması düşünülebilir.

Beş günlük grupta bulunan sıçan testisi kesitlerinin H-E boyama görüntüsündeki bulgular 1 günlük gruptaki H-E boyama görüntülerine benzer özellik gösterdi. Farklı olarak 1 günlük gruptaki seminifer tübül içinde gözlenen tek katlı kübik epitel görüntüsünden prizmatik epitele geçiş gözlemlendi (Şekil 4.4).

Beş günlük (infantil) gruptan boyanan Leydig hücrelerinde hafif şiddette immunohistokimyasal reaksiyon (+) görülmüştür (Şekil 4.5). Boyanan 5 günlük gruba ait preparatların %40'ı Leydig hücrelerinde çok hafif şiddette immunohistokimyasal reaksiyon verirken % 40'u hafif şiddette immunohistokimyasal reaksiyon vermiştir. Negatif immunohistokimyasal reaksiyon oranı ise %20 dir (Tablo 4.1).

H-E boyama yapılan On beş günlük grupta bulunan testis kesitlerinde seminifer tübüllerin çaplarının artmasıyla birlikte lumenlerinin de genişlediği görüldü. Seminifer tübüllerin duvarlarındaki Sertoli hücreleri arasında bulunan spermatogonyumların çoğalmasıyla birlikte spermatositlerin de görüldüğü ve bazal membrandan itibaren lümene doğru hücre tabakası sayısının arttığı gözlemlendi. Seminifer tübüllerin arasında bulunan gevşek bağ dokusunun azaldığı, Leydig hücrelerinin olgun biçimlerini kazanmaya başladıkları görüldü (Şekil 4.6).

On beş günlük (prepuberte) gruptan boyanan Leydig hücrelerinde orta şiddette immunohistokimyasal reaksiyon (++) görülmüştür (Şekil 4.7, Şekil 4.8). Boyanan 15 günlük gruba ait preparatların %60'ı Leydig hücrelerinde orta şiddette immunohistokimyasal reaksiyon verirken % 30'u yoğun şiddette, %10'u hafif şiddette immunohistokimyasal reaksiyon vermiştir. Negatif immunohistokimyasal reaksiyon görülmemiştir. (Tablo 4.1).

Yirmi günlük grupta bulunan sıçan testisi kesitlerinin H-E boyama görüntüsündeki bulgular 15 günlük gruptaki H-E boyama görüntülerine benzer özellik gösterdi. Ek olarak intertisyel alandaki Leydig hücrelerinin çekirdekleri daha yuvarlak ve heterokromatin bir yapı kazandığı gözlemlendi (Şekil 4.9)

Yirmi günlük (prepuberte) gruptan boyanan Leydig hücrelerinde orta şiddette immunohistokimyasal reaksiyon (++) görülmüştür (Şekil 4.10, Şekil 4.11). Boyanan 20 günlük gruba ait preparatların %60'ı Leydig hücrelerinde orta şiddette immunohistokimyasal reaksiyon verirken % 20'si yoğun şiddette, %20'si hafif şiddette immunohistokimyasal reaksiyon vermiştir. Negatif immunohistokimyasal reaksiyon görülmemiştir. (Tablo 4.1).

H-E boyama yapılan 30 günlük testis kesitlerinde seminifer tübüllerin çaplarının artmasıyla birlikte lumenlerinin de genişlediği görüldü. Seminifer tübüllerin peritubuler duvarında bulunan myoid hücrelerin iyice yassılaşılarak mekik şeklini aldığı tespit edildi. Ayrıca, bazal membran üzerinde fazla sayıda bulunan spermatogonyumların dışında, bu hücrelerin farklılaşmasıyla primer ve sekonder spermatositler gözlemlendi. Lümeneye doğru spermatidlerin genç ve erken tipleri görüldü (Şekil 4.12).

Otuz günlük (puberte) gruptan boyanan Leydig hücrelerinde yoğun şiddette immunohistokimyasal reaksiyon (+++) görülmüştür (Şekil 4.13, Şekil 4.14). Boyanan 30 günlük gruba ait preparatların %60'ı Leydig hücrelerinde yoğun şiddette immunohistokimyasal reaksiyon verirken %40'ı orta şiddette immunohistokimyasal reaksiyon vermiştir. Negatif immunohistokimyasal reaksiyon görülmemiştir. (Tablo 4.1).

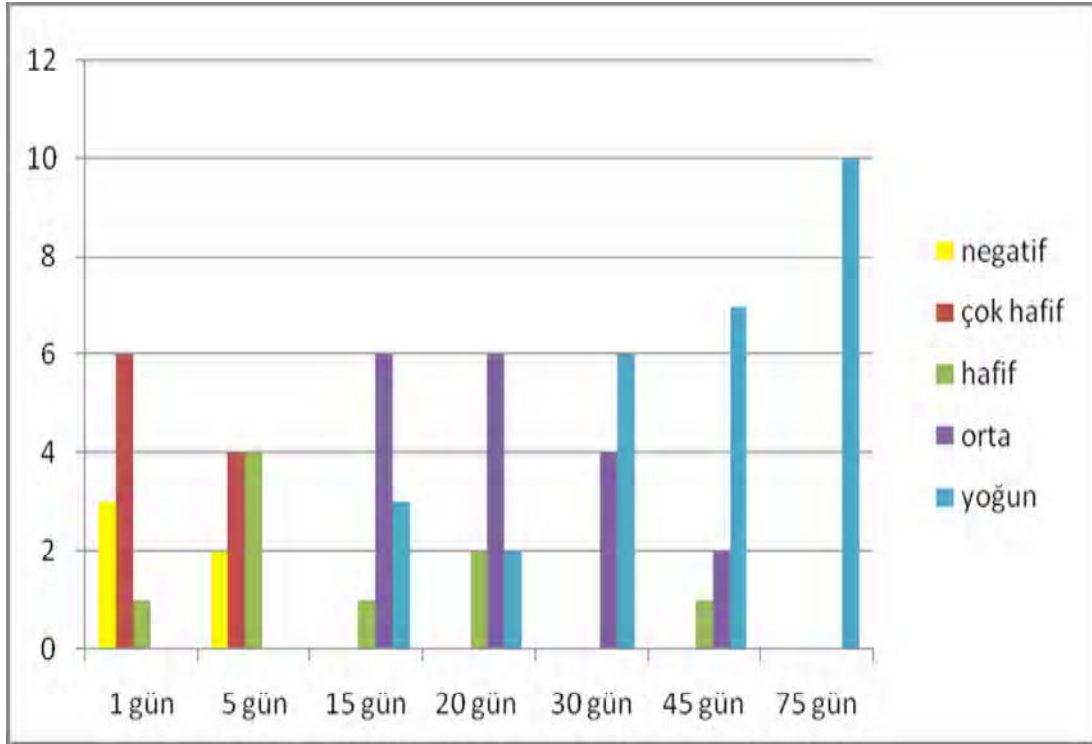
H-E boyama yapılan 45 beş günlük sıçan testis kesitlerinde seminifer tübüllerin spermatojenik seriyi oluşturan hücre tabakalarının arttığı gözlemlendi. Seminifer tübüllerin lümenlerinde spermiyumların sayısının 30 günlük gruba oranla arttığı, fakat lümeneye yeterli miktara ulaşmadığı görüldü (Şekil 4.15).

Kırk beş günlük (puberte) gruptan boyanan Leydig hücrelerinde yoğun şiddette immunohistokimyasal reaksiyon (+++) görülmüştür (Şekil 4.16, Şekil 4.17). Boyanan 45 günlük gruba ait preparatların %70'i Leydig hücrelerinde yoğun şiddette immunohistokimyasal reaksiyon verirken %20'si orta, % 10'u hafif şiddette immunohistokimyasal reaksiyon vermiştir. Negatif immunohistokimyasal reaksiyon görülmemiştir. (Tablo 4.1). Ayrıca diğer gruplarda görülmemesine rağmen 45 günlük gruba ait testis preparatları seminifer tübül içindeki Sertoli hücrelerinde immunohistokimyasal reaksiyon gözlenmiştir (Şekil 4.18, Şekil 4.19).

H-E boyama yapılan 75 günlük kesitlerde spermatojenik seriyi oluşturan hücreler tam olarak belirgindi. Kuyruklu yapılarıyla lümene atılmış spermatozoonlar görüldü. İnterisyel alandaki Leydig hücreleri ve diğer yapılar erişkin forma kavuşmuş olarak gözlemlendi (Şekil 4.20).

Yetmiş beş günlük (adult) gruptan boyanan Leydig hücrelerinde yoğun şiddette immunohistokimyasal reaksiyon (+++) görülmüştür (Şekil 4.21, Şekil 4.22). Boyanan 75 günlük gruba ait preparatların %100'ü Leydig hücrelerinde yoğun şiddette immunohistokimyasal reaksiyon vermiştir. Negatif immunohistokimyasal reaksiyon görülmemiştir. (Tablo 4.1).

Yapılan istatistiksel çalışmada (Chi Square) boyanma şiddetine göre gruplar arasında istatistiksel bir anlam vardır $p < 0,05$.



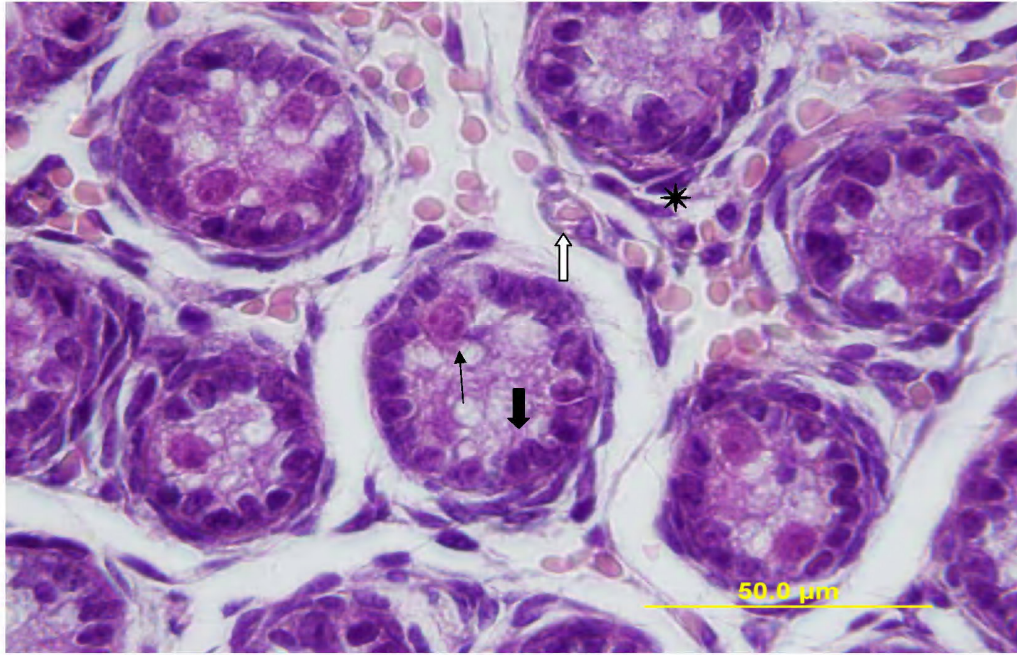
Şekil 4.1. Yaşa Göre Leydig Hücrelerinin İmmunohistokimyasal Boyanma Şiddeti

Tablo 4.1. Grupların Yaşa Göre Leydig Hücrelerinin Boyanma Şiddetleri

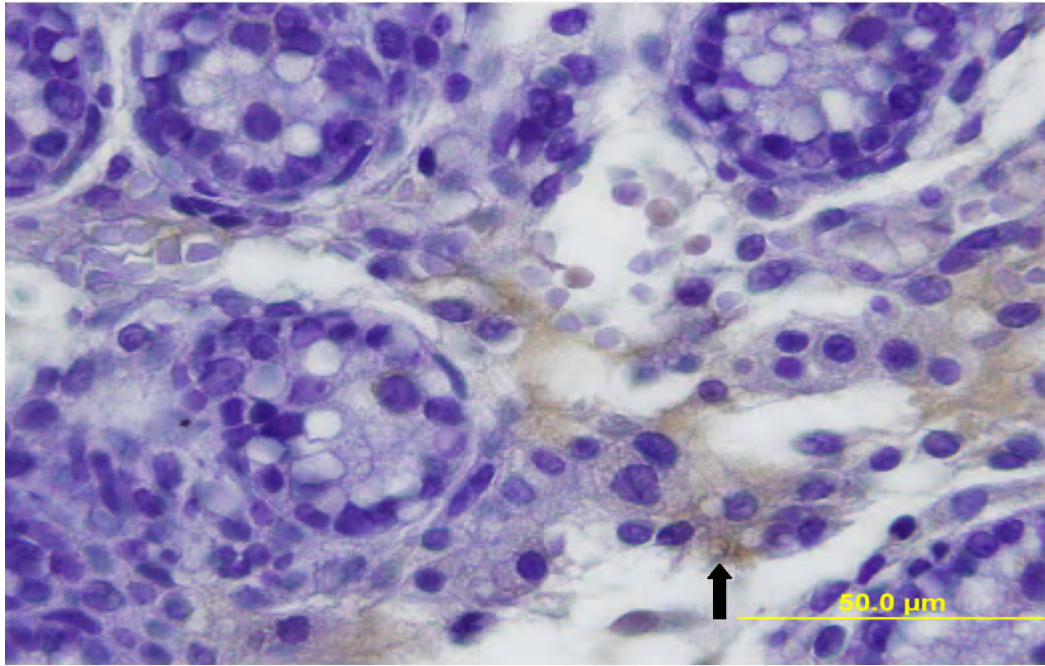
Boyanma Şiddeti		1 gün (neonatal)	5 gün (infantil)	15 gün (prepuberte)	20 gün (prepuberte)
Negatif	sayı	3	2	0	0
	% boyanma şiddeti	60,0%	40,0%	0,0%	0,0%
	% grup	30,0%	20,0%	0,0%	0,0%
Çok Hafif	sayı	6	4	0	0
	% boyanma şiddeti	60,0%	40,0%	0,0%	0,0%
	% grup	60,0%	40,0%	0,0%	0,0%
Hafif	sayı	1	4	1	2
	% boyanma şiddeti	6,7%	26,7%	6,7%	13,3%
	% grup	10,0%	40,0%	10,0%	20,0%
Orta	sayı	0	0	6	6
	% boyanma şiddeti	0,0%	0,0%	33,3%	33,3%
	% grup	0,0%	0,0%	60,0%	60,0%
Yoğun	sayı	0	0	3	2
	% boyanma şiddeti	0,0%	0,0%	13,6%	9,1%
	% grup	0,0%	0,0%	30,0%	20,0%

Tablo 4.1. Grupların Yaşa Göre Leydig Hücrelerinin Boyanma Şiddetleri (Devam)

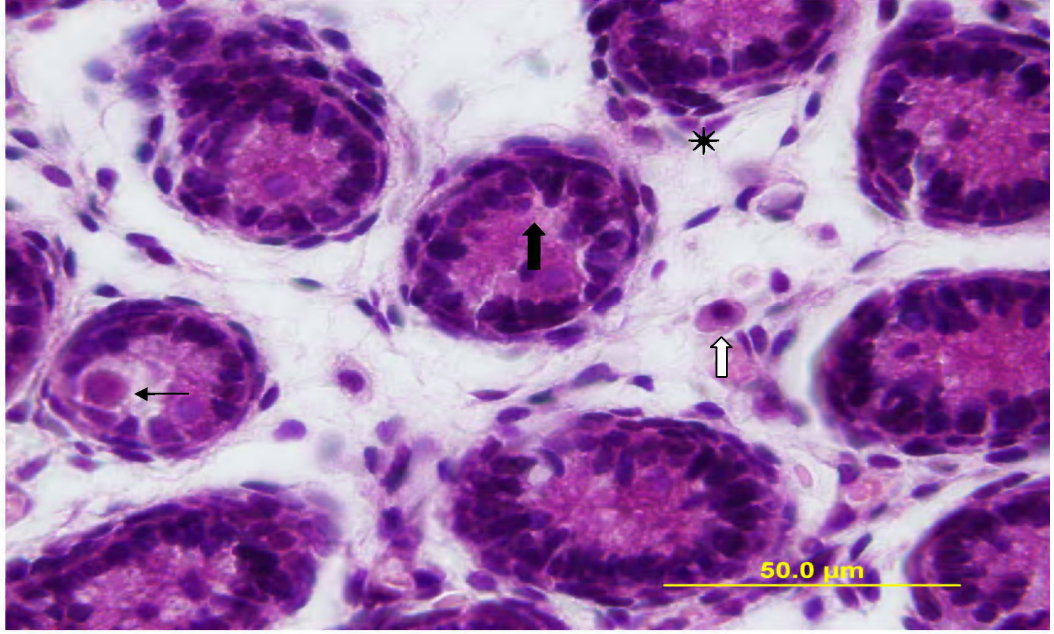
Boyanma Şiddeti		30 gün (puberte)	45 gün (puberte)	75 gün (adult)
Negatif	sayı	0	0	0
	% boyanma şiddeti	0,0%	0,0%	0,0%
	% grup	0,0%	0,0%	0,0%
Çok Hafif	sayı	0	0	0
	% boyanma şiddeti	0,0%	0,0%	0,0%
	% grup	0,0%	0,0%	0,0%
Hafif	sayı	0	1	0
	% boyanma şiddeti	0,0%	4,5%	0,0%
	% grup	0,0%	10,0%	0,0%
Orta	sayı	4	2	0
	% boyanma şiddeti	22,2%	11,1%	0,0%
	% grup	40,0%	20,0%	0,0%
Yoğun	sayı	6	7	10
	% boyanma şiddeti	27,3%	46,7%	45,5%
	% grup	60,0%	70,0%	100,0%



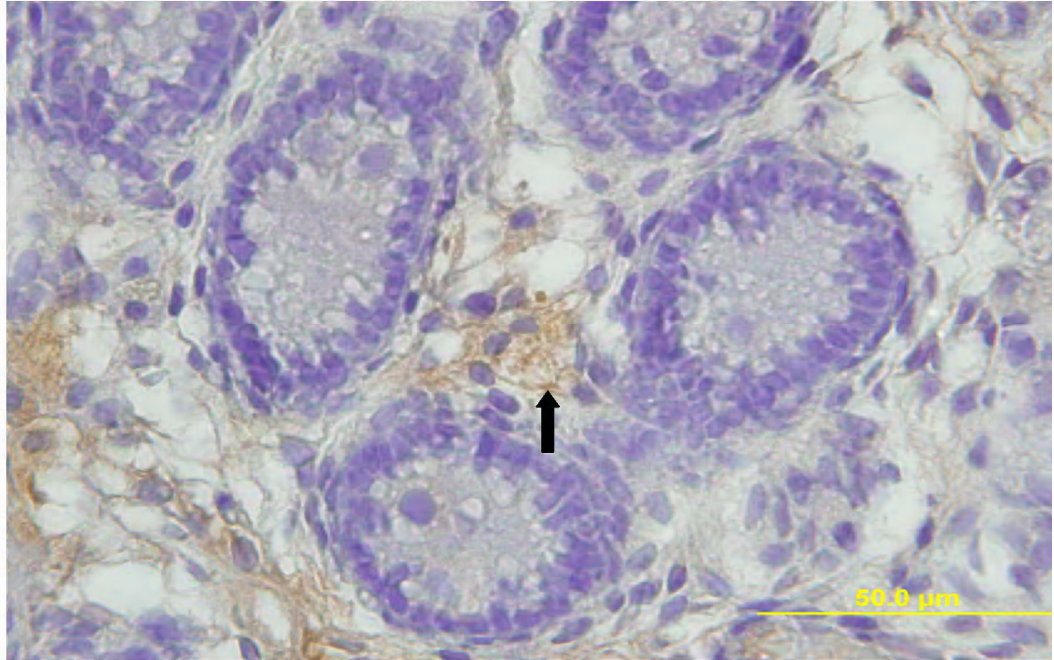
Şekil 4.2. 1 günlük testis dokusu. Sertoli hücreleri (ince ok), spermatogonium (kalın ok) myoid hücreler (yıldız), kapillerler (beyaz ok). H-E (x100)



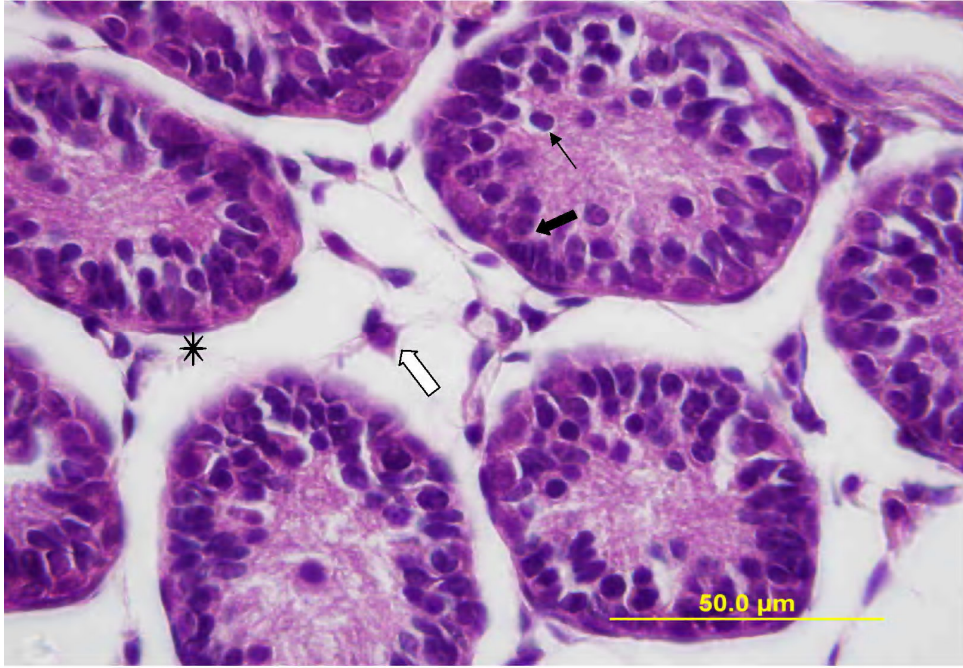
Şekil 4.3. 1 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+-) immunohistokimya (x100)



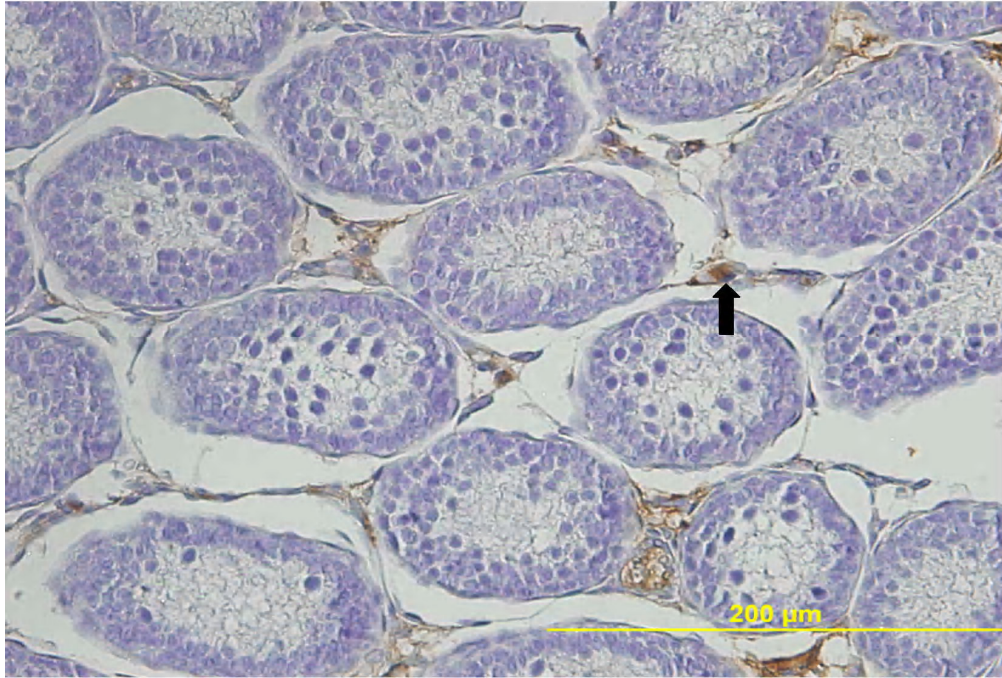
Şekil 4.4. 5 günlük testis dokusu. Sertoli hücreleri (ince ok), spermatogonium (kalın ok) myoid hücreler (yıldız), Leydig hücreleri (beyaz ok). H-E (x100)



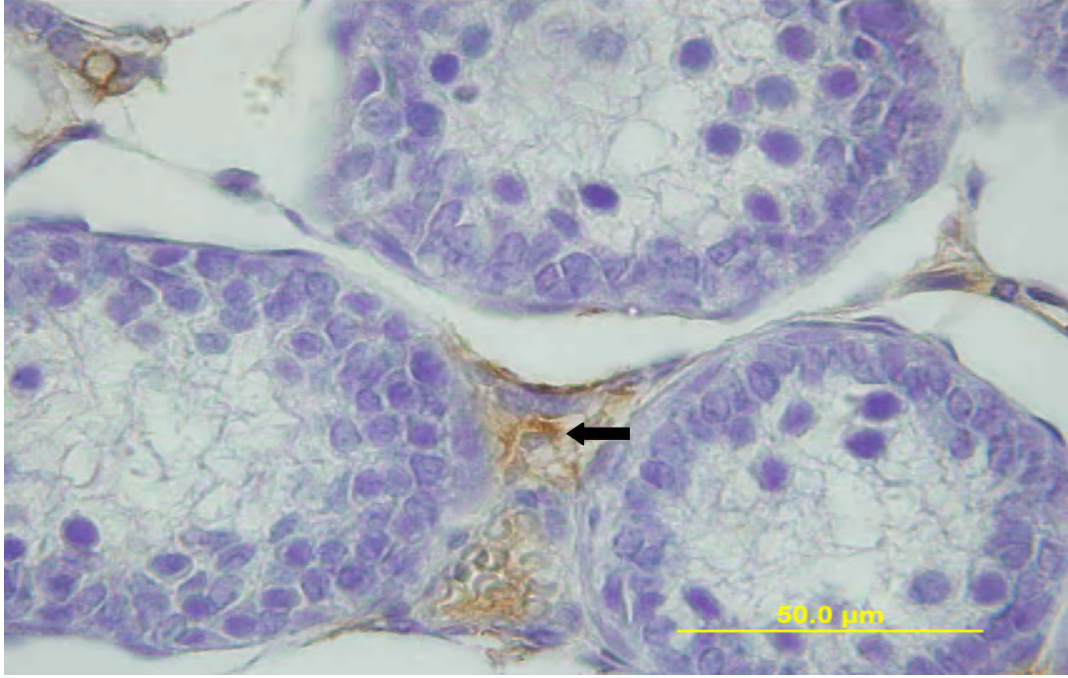
Şekil 4.5. 5 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+) immunohistokimya (x100)



Şekil 4.6. 15 günlük testis dokusu. spermatogonium (kalın ok) spermatosit (ince ok), myoid hücreler (yıldız), Leydig hücreleri (beyaz ok). H-E (x100)



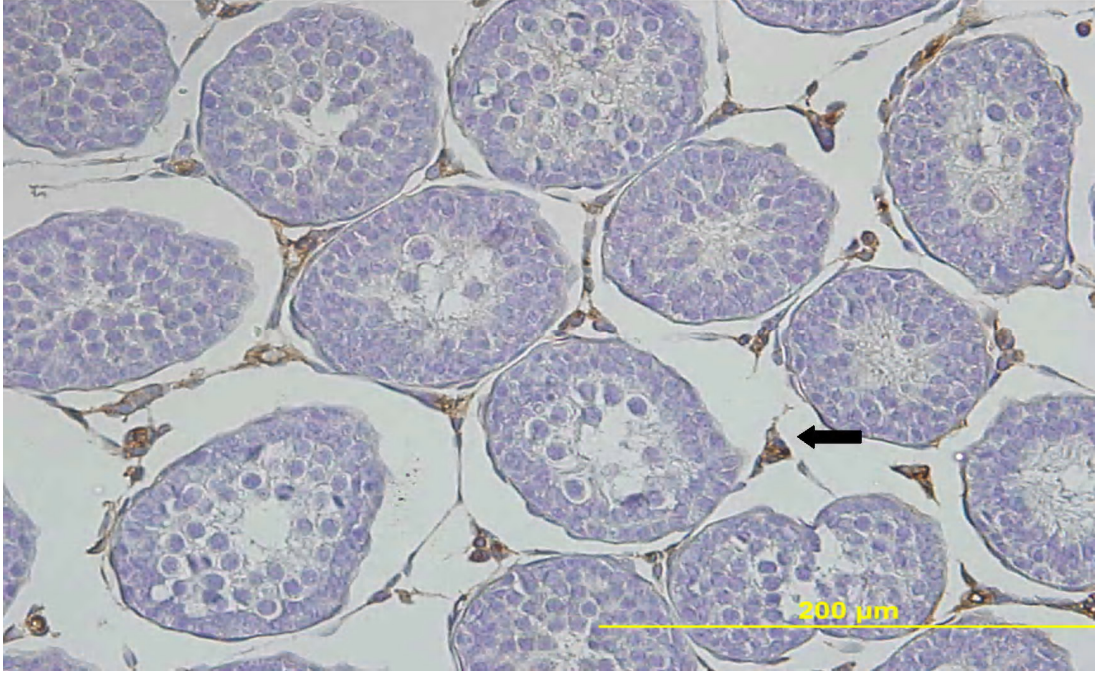
Şekil 4.7. 15 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (++) immunohistokimya (x40)



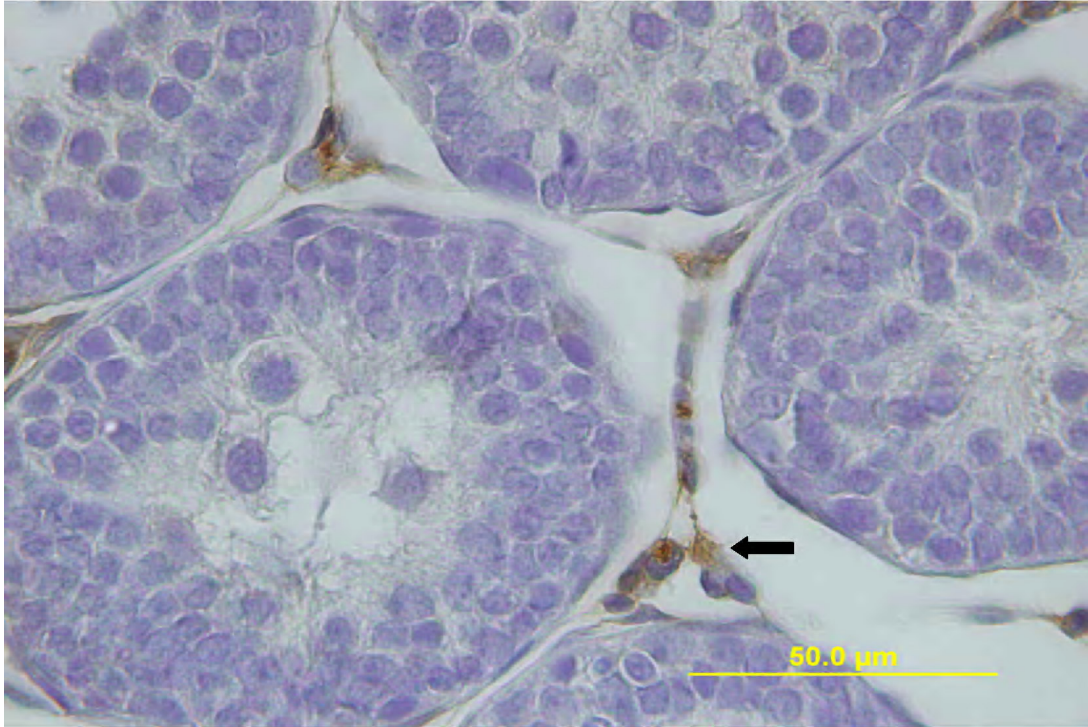
Şekil 4.8. 15 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (++) immunohistokimya (x100)



Şekil 4.9. 20 günlük testis dokusu. Spermatogonium (kalın ok) spermatosit (ince ok), Leydig hücreleri (beyaz ok) H-E (x100)



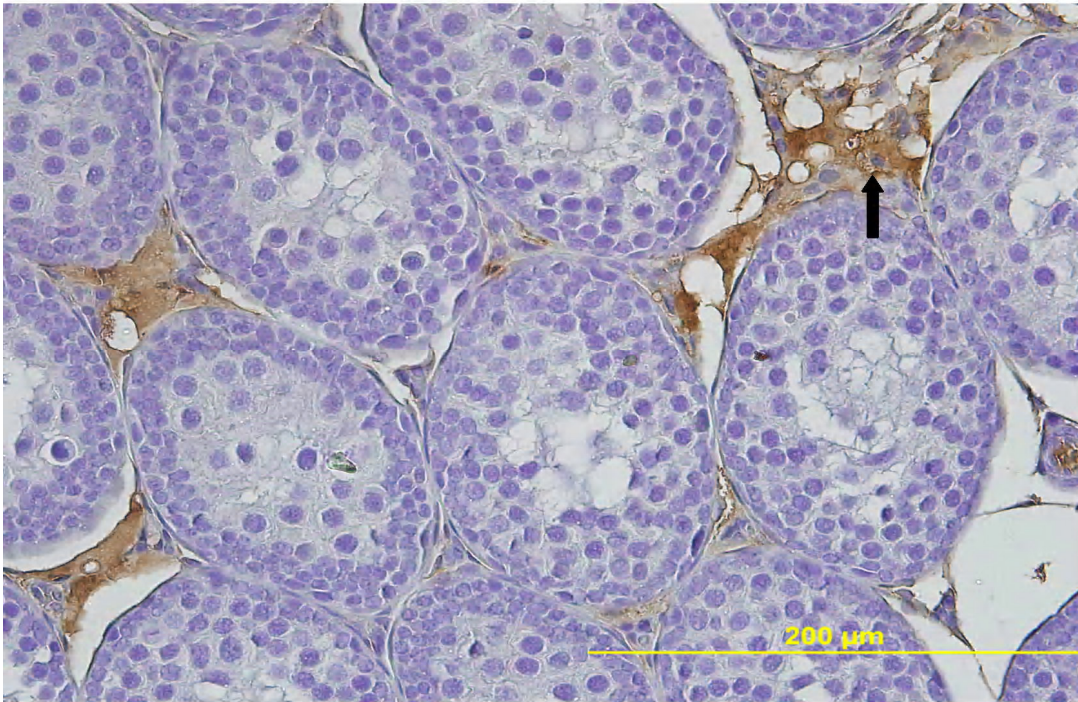
Şekil 4.10. 20 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (++) immunohistokimya (x40)



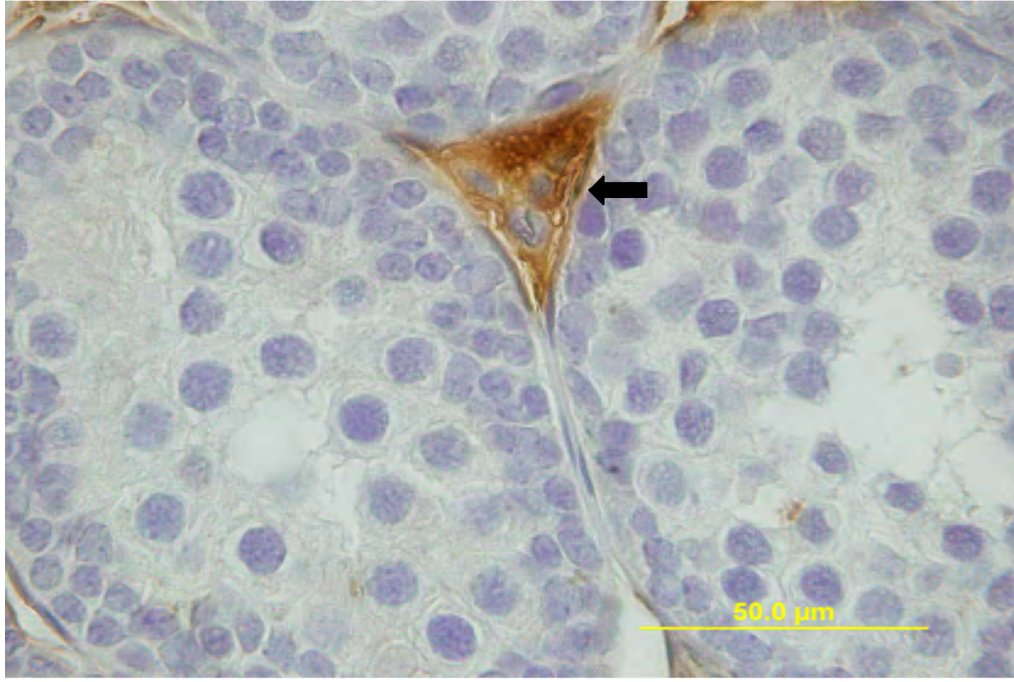
Şekil 4.11. 20 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (++) immunohistokimya (x100)



Şekil 4.12. 30 günlük testis dokusu. Spermatogonium (kalın ok), primer spermatosit (beyaz ok), sekonder spermatosit (ince ok) H-E (x100)



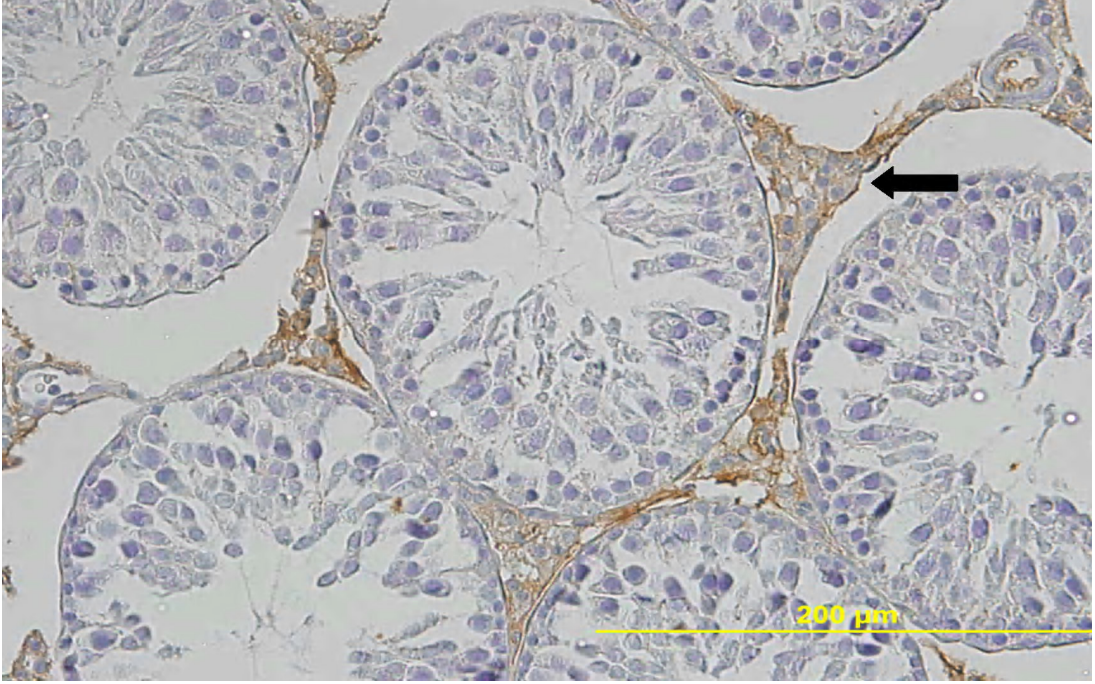
Şekil 4.13. 30 günlük testis. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x40)



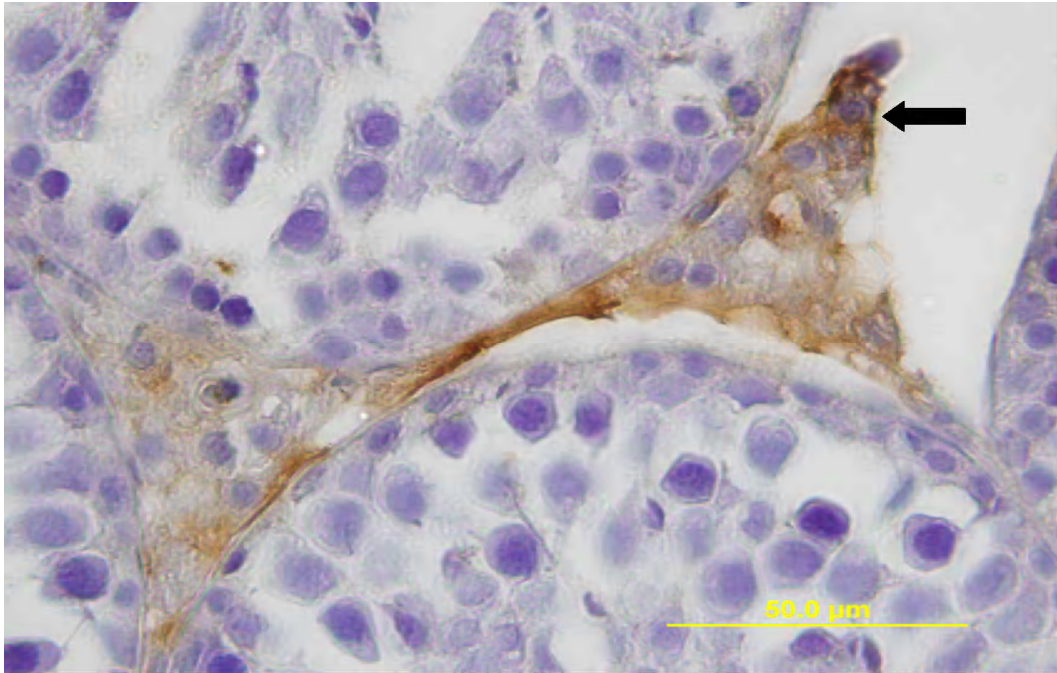
Şekil 4.14. 30 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x100)



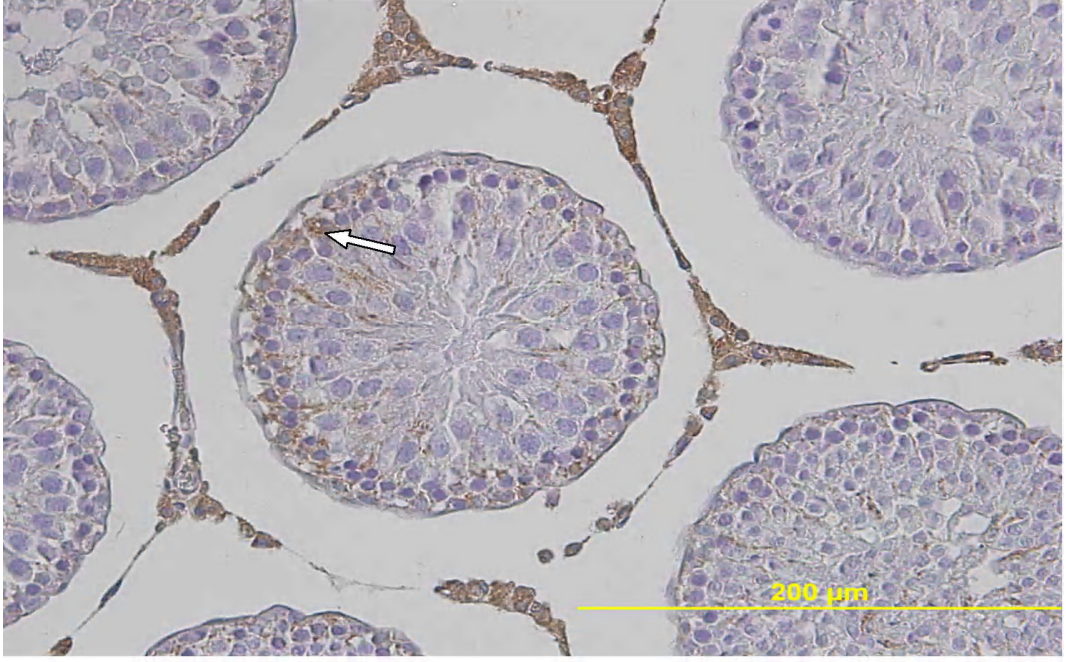
Şekil 4.15. 45 günlük testis dokusu. Spermatogonium (kalın ok), primer spermatosit (beyaz ok), spermatid (yıldız), spermiyum (ince ok). H-E (x40)



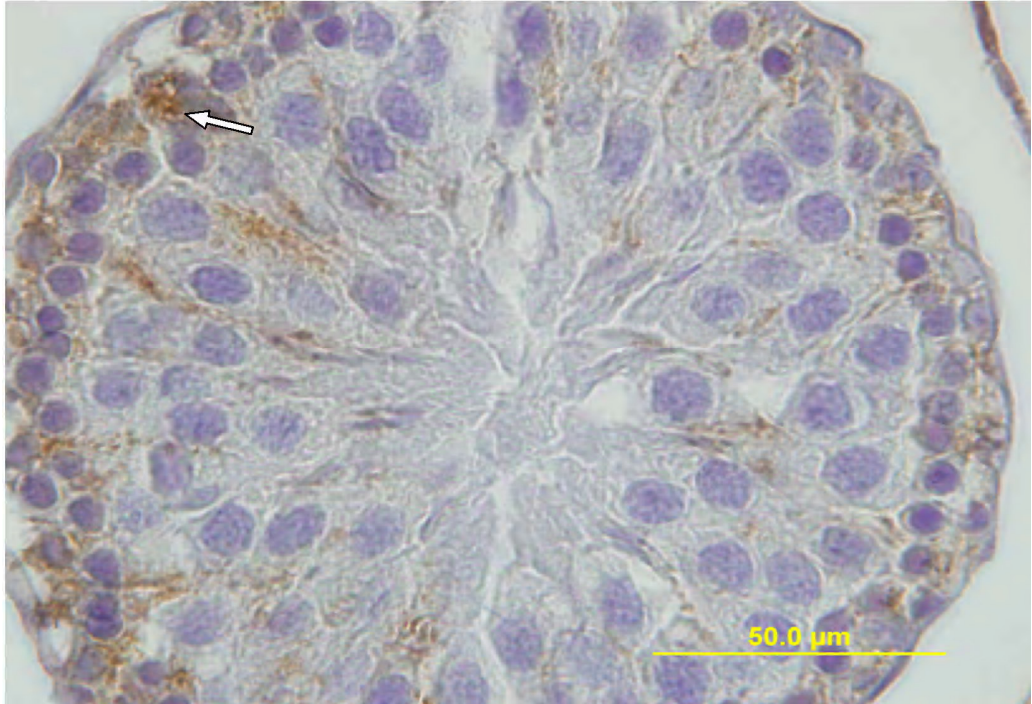
Şekil 4.16. 45 günlük testis dokusu. Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x40)



Şekil 4.17. 45 günlük testis dokusu Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x100)



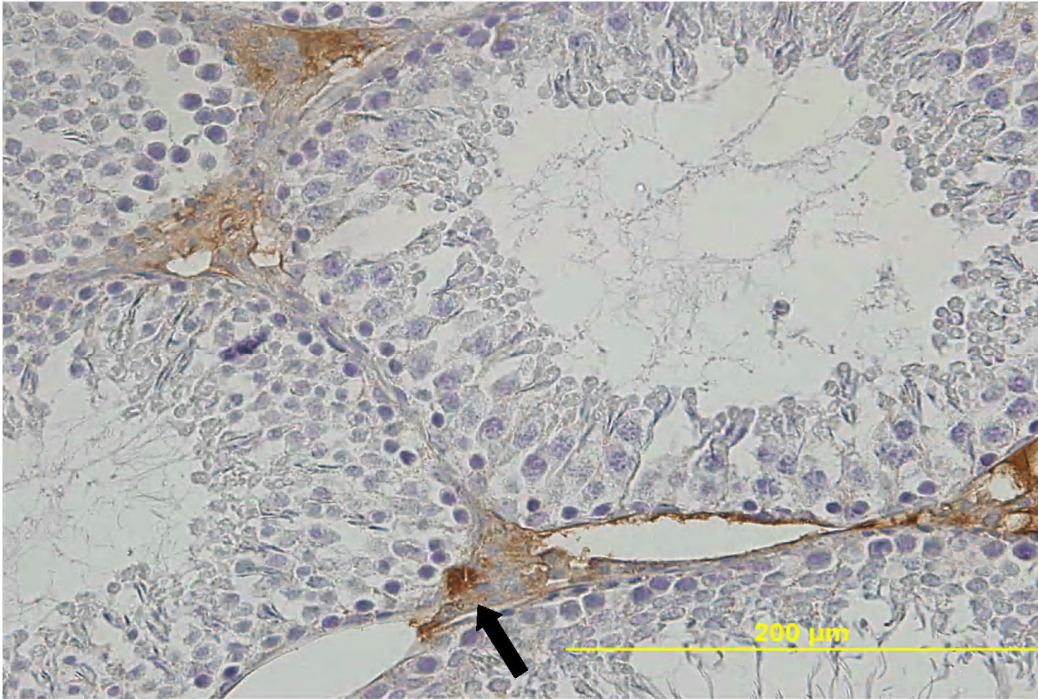
Şekil 4.18. 45 günlük testis dokusu seminifer tübül Sertoli hücreleri immunohistokimyasal reaksiyonu (beyaz ok) immunohistokimya (x40)



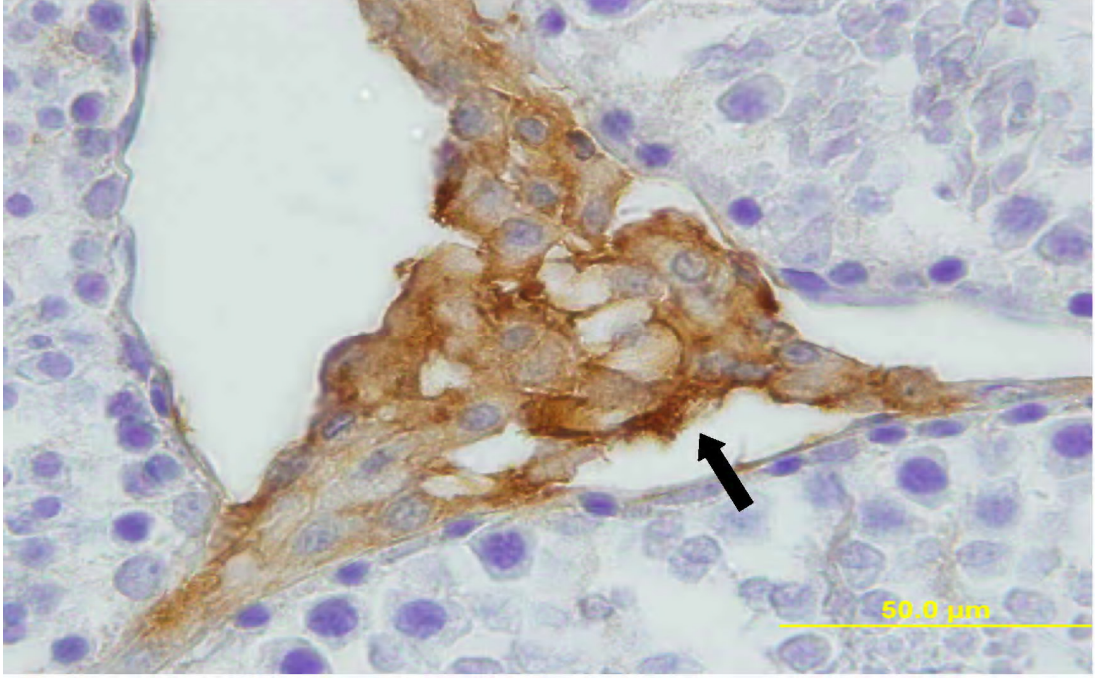
Şekil 4.19. 45 günlük testis dokusu seminifer tübül Sertoli hücreleri immunohistokimyasal reaksiyonu (beyaz ok) immunohistokimya (x100)



Şekil 4.20. 75 günlük testis dokusu. Spermatogonium (kalın ok), spermatosit (beyaz ok), spermatazoon (ince ok), Leydig hücreleri (yıldız). H-E (x40)



Şekil 4.21. 75 günlük testis dokusu dokusu Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x40)



Şekil 4.22. 75 günlük testis dokusu dokusu Leydig hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu (kalın ok) (+++) immunohistokimya (x100)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Testisler embriyonik gelişimi, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen endokrin ve ekzokrin fonksiyonlu bileşik tübüler bir çift bezdir (41,42). Her testis lobülü kan damarlarını, sinirleri ve intertisyel hücreleri içeren gevşek bağ dokusu ile sarılı seminifer tübüllerden oluşur (39,41,42).

França ve ark. (78) yaptıkları çalışmada domuz testisindeki Sertoli hücrelerinin gelişimini iki periyotta incelemişler. Birinci periyot doğumdan bir aylık döneme kadar, ikinci periyot üçüncü ve dördüncü aylar arasındaki dönemi kapsamıştır. Doğumdan bir aylık doneme kadar geçen sürede her testisteki Sertoli hücre sayısının altı misli arttığını gözlemlemişler. Üçüncü ve dördüncü aylar arasındaki periyotta ise Sertoli hücrelerinde %80 artış olduğunu bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada araştırmacılar Leydig hücre gelişimini üç dönemde incelemişler; neonatal, puberte, adult. Testiküler gelişimin başlangıcında Leydig hücre parametrelerinde büyük bir varyasyon olduğunu bildirmişlerdir. Doğumla iki aylık dönem arasında testisteki Leydig hücre oranı %30-%40'lardayken, bu oranın ikinci aydan sonra düştüğü ve beşinci ayda yaklaşık %7 olduğunu gözlemlemişlerdir. Atıncı aydan on altıncı aya kadar olan dönemde ise bu oranın yaklaşık %10-%15'lerde kaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da testis dokusunu incelenmesi için yapılan H-E boyama sonucunda testis doku örneklerindeki

Sertoli ve Leydig hücre sayısının gelişim dönemlerine göre farklılık gösterdiği gözlemlendi. Bu bulgular ışığında yapılan çalışma França ve ark. çalışmasıyla benzerlik göstermiştir.

Kalkan'ın 2001 yılında yaptığı çalışmada (79) prepuberte döneminden başlamak üzere puberte ve erişkin döneme doğru intersitisyel bağ dokusu içerisinde yer yer kapıllarlar çevresinde iri, toparlak, daha çok eozin alan, sitoplazması vakuollu ve heterokromatin yapıda çekirdeğe sahip hücrelerin bulunduğu, ancak puberte ve erişkin dönemlerde ise çekirdeğin ökromatin bir yapıda olduğu, erişkin dönemdeki bu hücrelerin sayısının prepuberte ve puberte dönemine göre daha fazla sayıda olduğu bulguları araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Araştırmacı çalışmada prepuberte (15 günlük) döneminde seminifer tübüllerin çaplarının artmasıyla birlikte lümenlerinin de genişlediği, seminifer tübüllerin duvarlarındaki Sertoli hücreleri arasında bulunan spermatogonyumların çoğalmasıyla birlikte spermatositlerin de görüldüğü ve bazal membrandan itibaren lümenine doğru çok katlı epitel yapısının oluştuğunu bildirmiştir. Bu çalışmada prepuberte dönemine ait sıçan testis dokuları H-E boyama sonucunda elde edilen bulgular Kalkan'ın bulguları ile benzerlik göstermektedir. Yine aynı çalışmada, puberleğe geçişin 42. günden itibaren başladığı, bu dönemde, normal çap ve lümen yapısına sahip seminifer tübül duvarının spermatogenezis'in farklı mitotik figürlerini içeren hücrelerin yanında Sertoli hücrelerinin apikal kısımlarına gömülü spermiyogenezisin değişik dönemlerinde bulunan farklı tipte spermatidlerle birlikte maturasyon fazındaki geç spermatidlerinde ilk kez bu dönemde görüldüğü tespit edilmiş. Ayrıca, tübül lümeninde az sayıda şekillenmekte olan spermiyumların bulunduğu saptanmış. Puberte döneminin 45. gününde seminifer tübül duvarının spermatogenezis'in farklı mitotik figürlerini içeren hücrelerden zengin olduğu, bu hücrelerin çoğunluğunun akrozomal veziküle sahip başkalaşım geçiren farklı tipte spermatidlerden oluştuğu belirlenmiş. Puberte döneminin 60. gününde bazı seminifer tübül lümenlerinde spermiyumların 45. güne oranla daha fazla olduğu ancak bazılarının lümenlerinin farklı aşamadaki spermatidlerle birlikte baş kısmı çengel şeklinde olan ve uzun bir kuyruk yapısına sahip olgun spermiyumlarla dolu olduğu gözlenmiş. Yapılan bu çalışmada 45 günlük gruba ait doku örneklerinde erişkin döneme ait bulgular gözlenirse de asıl erişkin dönem bulguları 75 günlük grupta gözlenmiştir.

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, prepuberte (10 günlük) döneminde dar ve ince yapılı seminifer tübüllerin tek veya çift katmandan oluşan duvarındaki Sertoli hücreleri arasında spermatogonyumlar ve tübül lümeninde tek tük dağılmış spermatosit rastlandığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada, puberte döneminde (60 günlük) gittikçe kalınlaşan tubulus duvarını döşeyen spermatogenik hücrelerden bazal membrana yakın bölümlerde bulunan spermatogonyumların arasında Sertoli hücreleri ile lümene doğru spermatosit ve spermatidler yanında şekillenmekte olan spermiyumların kolaylıkla izlendiği bildirilmiştir (80). Bu çalışmada elde edilen prepuberte ve puberte dönemine ait bulgular bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

GHS-R için endojen ligant olan ghrelinin tanımlanmasından sonra yapılan geniş çalışmalar bu yeni molekülün sadece GH sekresyonunda rolü olmadığı; eş zamanlı beslenme ve nöroendokrin kontrol gibi çeşitli ek biyolojik fonksiyonlarda rolü olduğunu göstermiştir (10,11,32,67).

Testis içinde 50'den fazla büyüme faktörü ve peptit belirlendi. Ancak sadece birkaçının fonksiyonu tam olarak açıklanabildi. Bununla birlikte ghrelinin bir çok sistemde tespit edilmesinden sonra testisteki fonksiyonu da araştırılmaya başlandı. Yapılan çalışmalar sonucunda ghrelinin testisteki fonksiyonu açığa çıkmaya başladı. Testesteron üretimi ve spermatogenezin tamamlanması için kritik öneme sahip olan Leydig hücrelerinin gelişmesi ve farklılaşmasında ghrelinin büyük önem taşıdığı yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (81-83).

Ghrelin ekspresyonu tıpkı GH'a benzer bir şekilde yaşla ilgili değişiklikler ve seksüel dimorfizm gösterir. Bu konuda Liu ve ark. (26), Norhtern blot yöntemiyle yaptıkları çalışmada ghrelin'e ait m RNA'yı farklı yaşlardaki farelerin midelerinde incelemişler ve ghrelin düzeylerinin embriyonik 18,5. günde düşük düzeydeyken; doğumdan sonra hızla arttığını ve sonra kademeli bir şekilde tekrar azaldığını göstermişlerdir.

Matsubara ve ark. (25) yeni doğan döneminden erişkin döneme kadar olan sıçanlarda ghrelin immüno pozitifliğini ve bunu gösteren hücrelerin sayılarını incelemişlerdir. Yaptıkları bu çalışmada ghrelin salgılayan hücrelerin seksüel olarak dimorfik bir yapı gösterdiklerini ve farklı bir şekilde ortaya çıktıklarını gözlemişlerdir.

Ayrıca Barkan ve ark. (27) siklusun geç folliküler evresinde bulunan kadınlarda, plazma ghrelin konsantrasyonlarının erkeklerdeki düzeylerine göre daha yüksek olduğunu iddia etmektedirler. Bu bulgular seks steroidlerinin GH'a benzer bir şekilde ghrelin salınımının düzenlenmesinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Miller ve ark. (30) Sıçan testis dokusundaki ghrelinin ekspresyonu, özellikle erişkin sıçanlarda (60-90 günlük) en yüksek düzeyde, infantil-prepubertal sıçanlarda ise düşük düzeylerde saptamıştır. Bu çalışmada da infantil dönemdeki sıçanlarda hafif şiddette immunohistokimyasal reaksiyon görülürken, prepubertal dönemde orta şiddette, erişkin dönemde ise yoğun şiddette ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu gözlemlenmiş olup çalışmamız Miller ve ark.'nın çalışması ile benzerlik göstermiştir.

Gaytan ve ark. (29) yaptığı bir çalışmada İmmun reaktif ghrelin hücreleri, sıçan, koyun, insan gibi çeşitli türlerin, testis dokusunda Leydig hücreleri ve Sertoli hücrelerinde tanımlanmıştır.

Tena-Sempere ve ark. (31) 2002 yılında yaptıkları çalışmada Sıçanlarda sadece Leydig hücrelerinde ghrelin ekspresyonun bulunduğu, Sertoli hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonun negatif olduğunu bildirilmiştir. Ancak daha sonraki yıllarda Arakawa ve arkadaşları'nın (84) farelerde yaptığı çalışmada, Sertoli hücrelerinde de ghrelin üretiminin ve salınımının olduğu Radyo İmmuno Assay (RIA) yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. Bu araştırmada da bağ dokusu alanlarındaki Leydig hücrelerinde yoğun şiddette immün reaksiyon veren erişkin dönem testis dokusu preparatlarında seminifer tübül içerisindeki Sertoli hücrelerinde ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonu gözlenmedi. Leydig hücrelerinde yoğun şiddette immunohistokimyasal reaksiyon veren pubertal dönem (45 günlük) testis dokusu seminifer tübül Sertoli hücrelerinde immunohistokimyasal reaksiyon gözlenmiştir. Bu yönden Arakawa ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bizim çalışmamızla benzer bir sonuç içermektedir.

İnsanlarda yapılan bir başka çalışmada ise Leydig hücrelerine ek olarak seminifer tubul içerisinde Sertoli hücrelerinde de immunohistokimyasal reaksiyonun olduğu bildirilmiş, spermatogenezisin herhangi bir aşamasındaki germ hücrelerinde ise immün pozitif hücreye rastlanmadığı belirtilmiştir (29).

Łukaszyk ve ark. (85) yaptıkları immunohistokimyasal ve hibridositokimyasal çalışmada *in situ* hybridisation yöntemi kullanarak seminifer tübül içindeki germ

hücrelerinde spermatogenezisin transkripsiyonel evresinde ghrelin ve GHRH salgılandığını bildirmişlerdir.

Ishikawa ve ark. (86) ghrelin ekspresyonunun serum testosteron düzeyine etkileri ile ilgili yaptıkları çalışmada Leydig hücrelerinden salgılanan ghrelin ile serum testosteron seviyesinde ters bir korelasyon olduğunu ve ghrelinin spermatogenezi dolaylı olarak etkilediğini bildirmişlerdir.

Barreiro ve ark. (33) ghrelinin Leydig hücreleri üzerinde düzenleyici rol oynadığını ve bu rolün antiproliferatif olarak ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Sıçanlara dışarıdan ghrelin verilmesi, immatür Leydig hücrelerinin proliferasyonunda dikkate değer bir azalmaya neden olduğunu, bu etkisini gösterirken, intersitisyumdaki diğer mezenşimal kökenli hücreleri (bağ dokusu hücreleri gibi) etkilemediğini açıklamışlardır.

Barreiro ve ark'ın (32) yaptığı diğer bir çalışmada Ghrelin peptidinin sıçan testisinde spesifik ekspresyonu; sıçanlara toksikan Etilen Dimetan Sülfonat (EDS) uygulanmasıyla olgun Leydig hücrelerinin selektif eliminasyonundan sonra immunohistokimyasal yöntemlerle doğrulanmıştır. Sıçanlara EDS uygulanmasından 5 gün sonra testistiküler interstitumda ghrelin immün boyanması gözlenemez hale gelir, bu zaman testis dokusunda olgun Leydig hücrelerinin tamamen yok olmasıyla aynı zamandır. Gerçekten sitotoksik bileşik uygulandıktan sonraki erken zamanlarda proliferen olan Leydig hücre prekürsörlerinde ve makrofajlar gibi diğer intertisyel tip hücrelerde hiç ghrelin sinyali tespit edilemez. EDS uygulanmasından 15 gün sonra o testiküler dokudaki intertisyel aralıkta immunohistokimyasal boyama gözlenir. Bu da testisteki ghrelinin primer olarak Leydig hücrelerinden salgılandığının göstergesidir.

Araştırmamızda da intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinde immunohistokimyasal reaksiyon gözlenmiştir, ancak spermatogenik serideki hücrelerde ghrelin pozitif reaksiyona rastlanmamıştır. Reaksiyon Leydig hücrelerinde özellikle prepubertal dönem sonrasında kuvvetli olup, Leydig hücrelerinde lokalizasyon hücre sitoplazmasında granüler tarzda dağılım göstermiştir.

Gonadal fonksiyonlar üzerinde son yıllarda ghrelin'in giderek artan önemine dair çalışmalar yapılmaktadır (27,29,31-35).Bu noktaları açıklığa kavuşturabilmek ve literatüre katkıda bulunabilmek amacıyla değişik yaş gruplarındaki erkek sıçanların testislerinde ghrelin immünolokalizasyonunu araştırdık. Değişik yaş gruplarında yaptığımız çalışmada literatür bilgilerine benzer sonuçlar elde ettik. Yeni doğandan

erişkine kadar olan yaş gruplarında yaptığımız çalışmada testisdeki Leydig hücrelerinin immunohistokimyasal reaksiyonunda anlamlı bir artış tespit ettik. Leydig hücreleri testesteron salgılayan, ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesinden sorumlu olan ve salgıladığı testosteronla spermatogenezin devamında önemli rol oynayan hücrelerdir. Bir çok sistemden salgılanan ghrelin hormonu leydig hücrelerinin gelişmesi ve farklılaşmasında da önemli rolü vardır. Yaş gruplarına göre yaptığımız bu çalışmada leydig hücrelerinde bulunan ghrelin immunohistokimyasal reaksiyonunun anlamlı artış göstermesi bu özel hormonun fertilite üzerinde de etkileri olduğunu göstermiştir.

Güncelliğini koruyan bu konu ile ilgili olarak, yeni bilgilere sahip olunması için daha fazla ve detaylı olarak yapılacak çalışmalar bize ghrelinin testis üzerindeki etkileri ile ilgili daha fazla bilgi verecektir.

6. KAYNAKLAR

1. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth hormone –releasing acylated peptide from stomach Nature 1999;402:656-660.
2. Bowers CY. Unnatural growth hormone releasing peptide elicits natural ghrelin J Clin Endocrinol Metabol 2001; 86: 1464-1469.
3. Date Y, Kojima M, Hosoda H, et al. Ghrelin a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans. Endocrinology 2000; 141: 4255-4261.
4. Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: Structure and function. Physiol Rev 2005;85: 495-522.
5. Korbonitis M, Kojima M, Kangawa K, Grossman AB. Presence of ghrelin in normal and adenomatous human pituitary. Endocrine 2001; 14: 101-104.
6. Mori K, Yoshimoto A, Takaya K, et al. Kidney produces a novel acylated peptide , ghrelin. FEBS Lett 2000; 486: 213-216.
7. Gualillo O, Caminos J, Blanco M, et al Ghrelin a novel placental-derived hormone. Endocrinology 2000; 142: 788-794.
8. Yiş U, Öztürk Y, Büyükgebiz B. Ghrelin: enerji metabolizmasının düzenlenmesinde yeni bir hormon. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2005; 48: 196-201.

9. Kobelt P, Helmling S, Stengel A, et al. Anti-ghrelin Spiegelmer NOX-B11 inhibits neurostimulatory and orexigenic effects of peripheral ghrelin in rats. *Gut* 2006; 55: 788-792.
10. Tschop M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature* 2000; 407: 908-913.
11. Wren AM, Small CI, Ward HL, et al. The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology* 2000; 141: 4325-4328.
12. Asakawa A, Inui A, Kaga T, et al. Ghrelin is a appetite-stimulatory signal from stomach with structural resemblance to motilin. *Gastroenterology* 2001; 120: 337-345.
13. Hewson AK, Dickson SL. Systemic administration of ghrelin induces Fos and Egr-1 Proteins in the hypothalamic arcuate nucleus of fasted and fed rats. *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 1047-1049.
14. Wang L, Saint Pierre DH, Tache Y. Peripheral ghrelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neurosci Lett* 2002; 325: 47-51.
15. Tolle V, Zizzari P, Tomasetto C, et al. In vivo and in vitro effects of ghrelin/motilin-related peptide on growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 2001; 73: 54-61.
16. Wren AM, Seal LJ, Cohen Mac, et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin. Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992.
17. Soriaro-Guillen L, Barrios V, Chowen J, et al. Ghrelin levels from fetal life through early adulthood: relationship with endocrine and metabolic and anthropometric measures. *J Pediatr* 2004; 144: 30-35.
18. Baker J, Lui JP, Robertson EJ, Efsratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 1993; 75: 73-82.
19. Le Roith D. Insulin-like growth factors. *N Engl J Med* 1997; 336: 633-640,
20. Chowen JA, Garcia-Segura LM, Gonzales-Parra S, Argente J. Sex steroid effects on the development and functioning of the growth hormone axis. *Cell Mol Neurobiol* 1996; 16: 297-310.
21. Ho KK, O'Sullivan AJ, Weissberger AJ, Kelly JJ. Sex steroid regulation of growth hormone secretion and action. *Horm Res* 1996; 45: 67-73

22. Weldhuis JD, Iranmanesh A, Mulligan T, Bowers CY. Mechanism of conjoint failure of the somatotrophic and gonadal axes in aging men. *Novartis Found Symp* 2002; 242: 98-124.
23. Delemarre-van de Waal HA, van Coeverden SC, Rottevel J. Hormonal determinants of pubertal growth. *J Pediatr Endocrinol Metabol* 2001; 14: 1521-1526.
24. Argente J, Chowen JA. Control of the transcription of the growth hormone-releasing hormone and somatostatin genes by sex steroids *Horm Res* 1993; 40: 48-53.
25. Matsubara M, Sakata I, Wada R, Yamazaki M, Inoue K, Sakai T. Estrogen modulates ghrelin expression in the female rat stomach. *Peptides* 2004; 25: 289-297.
26. Liu YL, Yakar S, Otheo-Corchon V, Low MJ, Liu JL. Ghrelin gene expression is age-dependent and influenced by gender and the level of circulating IGF-1. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 189: 97-103
27. Barkan AL, Dimaraki EV, Jessup SK, Symons KV, Ermolenko M, Jaffe CA. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2180-2184
28. Tena-Sempere M, Pinilla L, Gonzalez LC, Dieguez C, Casanueva FF, Aguilar E. Leptin inhibits testosterone secretion from adult rat testis in vitro. *Journal of Endocrinology* 1999; 161: 211-218.
29. Gaytan F, Barreiro ML, Caminos JE, Chopin LK, Herington AC, Morales C, Pinilla L, Paniagua R, Nistal M, Casanueva FF, Aguilar E, Dieguez C, Tena-Sempere M. Expression of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in normal human testis and testicular tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 89: 400-409.
30. Miller DW, Harrison JL, Brown YA, Doyle U, Lindsay A, Adam CL, Lea RG. Immunohistochemical evidence for an endocrine/paracrine role for ghrelin in the reproductive tissues of sheep. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005; 3: 60-74.
31. Tena-Sempere M, Barreiro ML, Gonzalez LC, et al. Novel expression and functional role of ghrelin in rat testis. *Endocrinology* 2002; 143: 717-725.
32. Barreiro ML, Gaytan F, Caminos JE, et al. Cellular location and hormonal regulation of ghrelin expression in rat testis. *Biology of Reproduction* 2002; 67: 1768-1776.
33. Barreiro ML, Gaytan F, Castellano JM, et al. Ghrelin inhibits the proliferative activity of immature Leydig cells in vivo and regulates stem cell factor messenger ribonucleic acid expression in rat testis. *Endocrinology* 2004; 145: 4825-4834.

34. Caminos JE, Tena-Sempere M, Gaytan F et al. Expression of ghrelin in the cyclic and pregnant rat ovary. *Endocrinology* 2003; 144: 1594-1602.
35. Tena-Sempere M. Exploring the role of ghrelin as novel regulator of gonadal function. *Growth Hormone & IGF Research* 2005; 15: 83-88.
36. Barreiro ML, Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction :a novel signal linking energy status and fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2004; 226: 1-9.
37. Karaaslan F. Erişkin Erkek Sıçanlarda Etan Dimetan Sülfonat İle Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine Sodyum Selenitin Etkisi. (Yüksek Lisans Tezi), Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, 2009.
38. Aktümsek A. Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi, Nobel Yayın Dağıtım, 2.baskı, Ankara, 2004: 434,439
39. Juqueira C, Carneiro J, Kelley R. Temel histoloji, (Çeviri Editörü: Aytekin Y.), Barış Kitabevi, İstanbul, 8. Baskı, 1993: 496-505
40. Guyton ve Hall. Textbook Of Medical Physiyoloji, (Çeviri Editörü: Çavuşoğlu H.), Nobel Yayınları, İstanbul, 9.Baskı, syf 1003
41. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji, Medipres Matbacılık, Malatya, 2009: 253-260
42. Yakan B, Özdamar S, Kutlubay R. Histoloji-Embriyoloji Ders notları, Genital sistem, E.Ü.T.F. Yayınları, Kayseri, 2005:119-130
43. Koyuncu İ. Varikoselli Hastalarda Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi. (Yüksek Lisans Tezi), Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, 2008.
44. Leeson T, Leeson R, Paparo A. Text/Atlas Of Histology, W.B. Saunders Company, Florida, 1988:150-152
45. Koeva Y., Bakalska M., Atanassova N., et al., 11 α -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in the newly formed Leydig cells after ethane dimethanesulphonate treatment of adult rats, *Folia Histochemica Et Cytobiologica* 2007; 4: 381-386.
46. Bakalska M., Mourdjeval M., Russinova A., et al. Localization of atrial natriuretic factor in rat testis after Leydig cell destruction: evidence for a potential role in regulating gonadal function, *Endocrine Regulations* 1999; 33: 183-191.
47. Bilgin, U.Y., Karaöz, E., Bengisu, H., Sıçanlarda bleomisin neden olduğu akciğer fibrozisi üzerine e vitamininin etkisi, *Tr J of Medical Sciences* 1991; 15: 270-277.
48. Fujisawa, M., Cell to cell cross talk in the testis, *Urol. Res* 2001; 29: 144-151.

49. Kim, J.M., Luo, L. at Zirkin, B.R., Caspase-3 activation is required for Leydig cell apoptosis induced by ethane dimethanesulfonate, *Endocrinology* 2000; 5: 1846-1853.
50. Chen, H., Liu, J., Luo, L., Baig, M.U., Kim, J. M. at B. R., Zirkin, Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis, *Experimental Gerontology* 2005; 40: 728–736.
51. Acharya, U.R., Mishra, M., Mishra. I., Tripathy, R.R., Potential role of vitamins in chromium induced spermatogenesis in swiss mice, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2004; 15: 53–59.
52. Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., Reymundo, C., Aguilar, E., at Van Roouen, 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, *Journal of Andrology* 1994; 6: 558-564.
53. Sriraman, V., Sairam, M.R. at Rao, A.J., Evaluation of relative roles of LH and FSH in regulation of differentiation of Leydig cells using an ethane1,2-dimethylsulfonate-treated adult rat model, *Journal of Endocrinology* 2003; 176: 151–161.
54. Fawcett, D.W., 1994, *Histology*, twelfth edition:Chapman & Hall., 964 p.
55. Angeloni Sv, Glynn N, Ambrosini G, Garant Mj, Higley Jd, Suomi S, Hansen Bc. Characterization of the rhesus monkey ghrelin gene and factors influencing ghrelin gene expression and fasting plasma levels. *Endocrinology* 2004; 145: 2197- 2205.
56. Tanaka M, Hayashida Y, Iguchi T, Nakao N, Nakai N, Nakashima K. Organization of the mouse ghrelin gene and promoter: occurrence of a short noncoding first exon. *Endocrinology* 2001; 142: 3697-3700.
57. Casanueva FF, Dieguez C: Ghrelin; The link connecting growth with metabolism and energy homeostasis. *Reviews in EndocrineDisorders* 2002; 3: 325-338.
58. Tanaka M, Hayashida Y, Nakao N, Nakai N, Nakashima K. Testis-specific and developmentally induced expression of a ghrelin gene-derived transcript that encodes a novel polypeptide in the mouse. *Biochem Biophys Acta* 2001; 1522: 62- 65.
59. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Akamizu T et al: Stomach is a major source of circulating ghrelin and feeding state determines plasma ghrelin-like immune reactivity levels in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001; 86: 4753- 4758.
60. Sleisenger C, Foltran B. *Gastrointestinal and Liver Disease*: WB Saunders 7th ed., 2002.
61. Volante M, Allia E, Gugliotta P: Expression of ghrelin and GHS reseptor by pankreatic islet cells and related endocrine tumors *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1300-1308.

62. Ariyasu H, Takaya K, Tagami T, Ogawa Y, Hosoda K, Aka-mizu T, Suda M, Koh T, Natsui K, Toyooka S, Shirakami G, Usui T, Shimatsu A, Doi K, Hosoda H, Kojima M, Kangawa K, Nakao K. Stomach is a major source of circulating ghrelin, and feeding state determines plasma ghrelin-like immuno-reactivity levels in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4753-4758.
63. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 909-913.
64. Yabuki A, Taharaguchi S, Ichii O, et al. Immunohistochemical localization of ghrelin in rodent kidneys. *Histochem Cell Biol* 2006; 126:231-238.
65. Aydin S, Aydin S, Ozkan Y, Kumru S. (2006) Ghrelin is present in human colostrum, transitional and mature milk. *Peptides* 2006; 27: 878-882.
66. Kierson JA, Dimatteo DM, Locke RG, Mackley AB, Spear ML., Ghrelin and cholecystokinin in term and preterm human breast milk. *Acta Paediatr* 2006; 95: 991-995.
67. Furuta M, Funabashi T, Kimura F. Intracerebroventricular administration of ghrelin rapidly suppresses pulsatile luteinizing hormone secretion in ovariectomized rats. *Biochemistry Biophysics Research Communication* 2001; 288: 780–785.
68. Tena-Sempere M, Aguilar E, Fernandez-Fernandez R, Pinilla L. Ghrelin inhibits prolactin secretion in prepubertal rats. *Neuroendocrinology* 2004; 79: 133–141.
69. Korbonits M, Goldstone A.P, Gueorguiev M, Grossman A.B. Ghrelin-a hormone with multiple functions. *Neuroendocrinology* 2004; 25: 27-68.
70. Pagotto U, Gambineri A, Pelusi C, et al. Testosterone replacement therapy restores normal ghrelin in hypogonadal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2003; 88: 4139–4143.
71. Yılmaz B. Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi, Birinci basım, Feryal Matbaacılık, Ankara 1999; 294-296.
72. Fernandez-Fernandez R, Tena-Sempere M, Navarro VM, et al. Effects of Ghrelin upon Gonadotropin-Releasing Hormone and Gonadotropin Secretion in Adult Female Rats: in vivo and in vitro Studies. *Neuroendocrinology* 2006; 82: 245–255.
73. Tanaka K, Minoura H, Isobe T, et al. Ghrelin is involved in the decidualization of human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 2335-2340.
74. Maheshwari HG, Rahim A, Shalet SM and Baumann G. Selective lack of growth hormone (GH) response to the GH-releasing peptide hexarelin in patients with GH-releasing hormone receptor deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 956–959.

75. Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K: Purification and characterization of rat des-Gln14ghrelin, a second endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor . J Biol Chem 2000; 29: 1995- 2000.
76. Tolle V, Bassant MH, Zizzari P: Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation GH, feeding behaviour and sleep-wake patterns in rats. Endocrinology 2002;143: 1353 - 1361
77. Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. Neuron 2003; 37: 649–661.
78. Luiz F, Valdemiro S, He Lio G, et al. Cell Proliferation and Hormonal Changes During Postnatal Development of the Testis in the Pig. Biology Of Reproduction 2000; 63:1629–1636.
79. Kalkan Y. Sıçanlarda Testisin Postnatal Gelişimi Üzerine Histolojik Ve Histoşimik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van 2001; 25-42.
80. Özkaral, A. Testislerde Fonksiyona Dayalı Yapıların Prepuberte Puberte Ve Erişkinde Işık Mikroskopik İncelenmesi, Atatürk Üniversitesi Tıp Bülteni 1990; 22: 945-953.
81. Kumar T. Divide and Differentiate: Ghrelin Instructs the Leydig Cells. Endocrinology 2004; 145: 4822-4824.
82. Hedger MP, De Kretser DM. Leydig Cell Function And Its Regulation. Results Probl Cell Differ 2000; 28:69–110.
83. Avallet O, Vigier M, Chatelain PG, Saez JM. Regulation By Growth Factors Of Leydig Cell Differentiated Functions. J Steroid Biochem Mol Biol 1991; 40: 453–464.
84. Arakawa Y, Yamanishi S, Matsumoto S, Kato I, Yu X, Yanaihara H, Kurokawa N. Ghrelin is expressed in and released from mouse testicular Sertoli TM4 cells. Biomedical Research 2004; 25: 245-248.
85. Łukaszyk A, Ludmia R, Sawiński P, et al. Immunohistochemical and hybridocytochemical study on ghrelin signalling in the rat seminiferous epithelium. Folia Histochemica Et Cytobiologica 2009; 47: 415-423.
86. Ishikawa T, Fujioka H, Ishimura T, et al. Ghrelin Expression in Human Testis and Serum Testosterone Level. Journal of Andrology 2007; 28: 320-324.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ DENEY HAYVANLARI
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı

ETİK KURULUN ADRESİ : Erciyes Üniversitesi

Tarih: 12.11.2008

Toplantı Sayısı: 10

Karar No: 08/67

Etik kurul toplantısı

12.11.2008

tarihinde Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik

Kurul Başkanlığı'nda

Doç.Dr. Harun Ülger

başkanlığında gerçekleştirilmiştir.

Üye Adı/Soyadı	Akademik Ünvanı	Fakültesi	
Zübeyde Gündüz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	Katılmadı
Harun Ülger	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Ozlem Canöz	Doç.Dr.	Tıp Fakültesi	
Hatice Özbilge	Doç.Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Servet Kesim	Yard.Doç.Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Davut Bayram	Öğrt.Gör.Dr.	Veteriner Fakültesi	
Halit Erkişitlioğlu	Diş Hekimi		Katılmadı
Halil Tekiner	Eczacı		Katılmadı

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof.Dr. Birkan Yakan'ın "Sıçan testisinde ghrelin immünohistokimyasının incelenmesi" adlı araştırması incelenerek, çalışmasının yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oy birliğiyle karar verildi.

Dosyada sunulan dökümanlar;

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

Tarih : 12.11.2008

Etik Kurul Başkanı : Doç.Dr. Harun Ülger

Etik Kurul Başkanı İmzası:

ÖZGEÇMİŞ

Tuğba RIHTİM. 1982 yılında Amasya ili Merzifon ilçesinde doğdu. İlkokulu ve orta öğretimini Adana’da, lise öğretimini Kayseri’de tamamladı. 2002 yılında kazandığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2006 yılında mezun oldu. 2007 Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında yüksek öğretime başladı. Halen aynı üniversitede yüksek lisans öğretime devam etmektedir.

Evli ve bir çocuk annesidir.