

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YENİ ZELANDA TAVŞANINDA LEYDİĞ HÜCRELERİNİN SAYISININ
STEREOLOJİK METODLARLA HESAPLANMASI**

Murat Sırrı AKOSMAN

**VETERİNER ANATOMİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. İsmail TÜRKMENOĞLU**

Tez No: 2009-005

***Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Komisyonunca 07.VF.08 Numaralı Proje ile Desteklenmiştir**

2009-AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anatomi Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından


Doktora Tezi

olarak kabul edilmiştir.


Tez Savunma Tarihi: 24.12.2009


Doç. Dr. İsmail TÜRK MENOĞLU

Üye


Prof. Dr. Ferruh YÜCEL


Üye


Doç. Dr. Vural ÖZDEMİR

Üye


Doç. Dr. Aysun ÇEVİK DEMİRKAN

Üye


Yrd. Doç. Dr. Nermin Nüket MAS

Üye

Anatomi Anabilim Dalı doktora programı öğrencisi Murat Sırrı AKOSMAN'ın "Yeni Zelanda Tavşanında Leydig Hücrelerinin Sayısının Stereolojik Metodlarla Hesaplanması" başlıklı tezi ~~30.12.2009~~ 24.12.2009 günü saat 09.30...da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Zehra BOZKURT

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Anatomi, vücudu oluşturan organların ve dokuların yapıları, düzenleri ve biçimlerini inceleyen bir bilim dalıdır. Bu özelliğinden dolayı insan ve hayvan hekimliklerinin temelini oluşturmaktadır. Stereoloji bilimiye bu alanda çalışma yapan araştırmacıların, gerçeğe en yakın verileri elde edebilmelerini sağlayan bir metotlar topluluğudur. Bu metotlar sayesinde bir yapının yüzey alanı, hacmi, içerdiği hücre sayısı ve hücre hacmi gibi verilere ulaşılabilir.

Bu tip sürekli güncellenen, geçerli ve doğrulukları ispatlanmış olan stereolojik metotların Türk Veteriner Hekimliği alanında uygulanmasının artırılması isteği bizi bu tip bir çalışmanın yapılmasına yönlendirmiştir.

Öncelikle beni stereoloji sahasında çalışmam konusunda cesaretlendiren ve hiçbir desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. İsmail TÜRKMENOĞLU'na,

Çalışmamın her safhasıyla yakından ilgilenen ve yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Vural ÖZDEMİR hocama,

Doktora eğitimim esnasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Aysun ÇEVİK DEMİRKAN hocama,

Yine tezimin gerçekleştirilmesi esnasında çalışmama yön veren, yöntem ve teknik açıdan her türlü desteğini gösteren değerli bilim adamı Prof. Dr. Jens Randel NYENGAARD'a,

Doktora ve diğer akademik çalışmalarım süresince gösterdikleri sabır, destek ve fedakarlık için aileme,

Araştırmaya mali yönden destek veren Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına teşekkürü borç bilirim.

Murat Sırrı AKOSMAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay	II
Önsöz	III
İçindekiler	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Tablolar Listesi	VII
Şekiller Listesi	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
I.GİRİŞ ve LİTERATÜR BİLGİSİ	1
1.Organa Genitalia	2
1.1.Organa Genitalia Masculina	2
2.Testis	2
2.1.Makroanatomi	2
2.1.1.Tunica Testis	2
2.2.Histoloji	3
2.2.1.Tunica Albuginea	3
2.2.2.Seminifer Tubuller	3
2.2.3.İnterstisyel Doku	4
3.Bağ Doku	4
3.1.Bağ Doku Çeşitleri	4
3.2.Bağ Dokunun Hücreleri	5
4.Leydig Hücreleri	5
4.1.Fötal Leydig Hücreleri	6
4.2.Adult Leydig Hücreleri	6
4.2.1.Öncül Hücreler	7
4.2.2.Olgunlaşmamış Hücreler	7
4.2.3.Olgunlaşmış Hücreler	7
5.Stereoloji	9

5.1.Optik Parçalama.....	9
5.2.Parçalama.....	9
5.3.Düz (Smooth) Parçalama.....	10
5.4. Optik Disektör.....	10
5.5 Leydig Hücre Sayısıyla İlgili Yapılmış Çalışmalar.....	11
II.MATERYAL ve METOD.....	14
1.Denekler.....	14
2.Örnekleme Şeklinin Belirlenmesi.....	14
3.Histolojik Çalışmalar.....	14
4.Doku Takibi.....	15
5.Dokuların İşlenmesi.....	15
6.Kesit Alma.....	17
7.Stereolojik Uygulama.....	18
9.Hata Katsayılarının Bulunması.....	19
III.BULGULAR.....	21
1.Genel Gözlemler.....	21
2.Toplam Hücre Sayısının Hesaplanması.....	23
3.Hata Katsayıları Hesaplanması.....	25
IV.TARTIŞMA.....	41
1.Varsayıma Dayalı Çalışmalar.....	41
2.Disektör Sayım Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar.....	43
3.Testiste Hesaplanan Toplam Leydig Hücre Sayısının Diğer Çalışmalarla Karşılaştırılması.....	44
4.Sunulan Çalışmaya Ait Metodolojik Değerlendirmeler.....	47
V.SONUÇ.....	48
VI.KAYNAKLAR.....	49
VII.EKLER.....	55

Simgeler ve Kısaltmalar

CE	: Çalışmada kullanılan metodun ve örnekleme şeklinin hata katsayısı
CV	: Gruptaki bireyler arasındaki varyasyonun katsayısı
Dk	: Dakika
Gr	: Gram
IP	: İntraperitoneal
IV	: İntravenöz
Kg	: Kilogram
Mg	: Miligram
ml	: Mililitre
Mm	: Milimetre
Mm ³	: Milimetreküp
µm	: Mikronmetre
µm ²	: Mikronmetre kare
SD	: Standart sapma
Σ	: Toplam

Tablolar Listesi

Tablo 1: Bağ Doku eşitleri.....	4
Tablo 2: Hata katsayısının hesaplanması.....	19
Tablo 3: Testis ağırlıkları.....	21
Tablo 4: Yan yana sıralayarak parafine gömmüş olduğumuz testislerin dijital kumpasla lılması ve “8” e bölünmesi sonucunda elde edilen değerler.....	22
Tablo 5: Toplam hücre sayısının hesaplanabilmesi için her satırdaki her bir testis için çalışma boyunca yapmış olduğumuz rneklemelemler birbirleriyle çarpılarak toplam hücre sayısı bulunur.....	23
Tablo 6: Grup içi Varyasyon Katsayısı (CV) Hesaplamaları.....	24
Tablo 7: 1 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	25
Tablo 8: 2 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	26
Tablo 9: 3 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	27
Tablo 10: 4 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	29
Tablo 11: 5 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	30
Tablo 12: 6 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	31
Tablo 13: 7 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	32
Tablo 14: 8 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	33
Tablo 15: 9 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	35
Tablo 16: 10 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	36
Tablo 17: 11 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	37
Tablo 18: 12 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları.....	39
Tablo 19: Ortalama hata katsayısı.....	40
Tablo 20: nceki çalışmalarda elde edilen bulguların karşılaştırılması.....	46

Şekiller Listesi

Şekil 1: Fötal Leydig Hücresi.....	6
Şekil 2: Adult Leydig Hücreleri.....	8
Şekil 3: Renk yoğunluğu, boyut, içerik ve sayısal değerler tabanlı bazı Düz (Smooth) dizayn protokolleri.....	10
Şekil 4: Tarafsız sayım çerçevesi.....	11
Şekil 5: Parafin bloğu içine gömülü dilimler.....	15
Şekil 6: Dokuların uzunluğunun dijital kumpas yardımıyla ölçülmesi.....	16
Şekil 7: Dokunun mürekkepli bir kalem yardımıyla ölçülerek işaretlenmesi.....	16
Şekil 8: Eğik ve paralel çizgilerin çekilmesi.....	17
Şekil 9: Metal blok kabı içindeki dokular.....	17
Şekil 10: Sayıma hazır hale gelmiş dokular.....	18
Şekil 11: Tavşan testisinde interstisyel aralıktaki Leydig hücreleri.....	40

ÖZET**YENİ ZELANDA TAVŞANINDA LEYDİĞ HÜCRELERİNİN SAYISININ
STEREOLOJİK METODLARLA HESAPLANMASI**

Testisler erkeklerde üremeyle ilgili bir çift organdır. Spermatozoa ve testosteron hormonu üretiminden sorumludurlar. Testosteron hormonu Leydig hücrelerinden salgılanır. Biz bu çalışmamızda on iki adet Yeni Zelanda Tavşanının testislerindeki Leydig hücrelerini stereolojik metotlarla saydık. Sayımlar tavşanlardan altısının sağ testisleri altısının da sol testisleri üzerinde gerçekleştirildi. Testisler Düz (Smooth) Parçalama metoduyla örneklendi ve Leydig hücreleri Optik Disektör sondaları kullanılarak sayıldı. Ortalama Leydig hücre sayısı her bir testis için 28×10^6 , hata katsayısı CE(N) 0,082 ve CV'de 0,14 olarak bulundu. Çıkan bu sonuçlar stereolojik açıdan uygun bulunmuştur. Sonuçlar stereolojik metotlar ve varsayım dayalı metotlardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Veriler stereolojik çalışmalardan elde edilen verilerle uyurken, varsayım dayalı çalışmalardan elde edilen verilerden farklıydı. Araştırmalarımız sonucunda varsayım dayalı metotların aynı türe uygulansa bile farklı sonuçlara ulaştığı gözlemlenmiştir.

ABSTRACT**THE INVESTIGATION OF LEYDIG CELL NUMBERS IN THE NEW ZEALAND RABBIT BY USING STEREOLOGICAL METHODS**

Testicles are paired organs that related with the reproduction of the males. They produce spermatozoa and testosterone hormone. That hormone secrets from the Leydig cells. In this study our aim was to count the 12 New Zealand Rabbit's Leydig cells by stereological methods. The results were compared with model-based methods. Testicles were sampled using smooth fractionator approach and Leydig cell number was estimated via optical disectors. Counts were performed on six rabbit's right and six rabbit's left testis. The mean leydig cell number was found 28×10^6 for one testis. The mean CE(N) was 0.082 and the CV was 0.14. We concluded these findings are well matched with other stereological studies which performed on testicles. But results were different from model-based studies. Because model-based methods generates erroneus values. They produce different results when they apply even on the same species.

I. GİRİŞ

Yeni Zelanda Tavşanı, Amerika'da geliştirilmiş, üzerinde çok durulan, et tavşanı denilince ilk akla gelebilecek yaygın bir ırktır (1,2). Vücut yapısı sağlam, sırt ve butlarda kas gelişimi iyi, vücut dolgun, arka kısım geniş ve yuvarlaktır. Bacaklar kısa ve kuvvetli kemiklidir. Baş geniş ve kısa olup vücutla iyi bir uyum gösterir. Kulaklar uzun değildir ve tüylüdür. Gözler kırmızı renklidir (1). Aynı zamanda bir laboratuvar hayvanı olarak da kullanılan Yeni Zelanda Tavşanının testisi ile ilgili stereolojik çalışmaların oldukça sınırlı olduğu gözlenmiştir.

Erkek üreme fonksiyonunu sperma hücresi oluşturur. Spermatozoon testiste seminifer tubullerinde oluşur (Spermatogenezis). Seminifer tubullerinin arasında gevşek bağ doku yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içerir (3-7).

Leydig hücrelerinin sayısı çeşitli deneysel çalışmalarda incelenmiş ancak bu çalışmalardan bazılarında toplam hücre sayısının hesaplanmasında varsayım dayalı metotlar kullanılmıştır. Varsayım dayalı metotlar deneysel çalışmalarda hatalı sonuçlar verebilmektedirler. Örneğin Mendis Handagama atrofiye olmuş testislerdeki toplam hücre sayısını araştırırken varsayım dayalı metotla parçalama metodunu karşılaştırmış ve varsayım dayalı metotların hatalı sonuçlar ürettiğini ortaya koymuştur (8).

Sunulan bu çalışmada ise modern stereoloji başlığı altında incelenen ve "Düz (Smooth) Parçalama" dizaynıyla kombine edilmiş "Optik Parçalama" metodu kullanılmıştır. Modern stereolojinin gelişmesinde Hans Jorgen Gundersen ve Luis Cruz-Orive'in etkisi büyüktür (9). Stereolojik metotlar varsayım dayalı olmayan, tarafsız ve etkin metotlardır. Pratikte bu metotlar temel olarak kesitlerin incelenmesine dayanan, mikroskopik yapıların üç boyutları hakkında nicel bilgi edinimini sağlayan araçlardır. Bu metotlar geliştirilirken dikkat edilen nokta tarafsızlık ve etkinliğin korunmasına özen gösterilmesidir (10-12).

1. Organa Genitalia

Organa genitalia üreme ile görevli olan organlardır. Erkek üreme organları (organa genitalia masculina) ve dişi üreme organları (organa genitalia feminina) diye iki grup oluştururlar (13).

1.1. Organa Genitalia Masculina

Organa genitalia masculina iç üreme organları (partes genitales masculina internae) ve dış üreme organları (partes genitales masculina externae) diye iki gruba ayrılır (13).

2. Testis

2.1. Makroanatomi

Testis scrotum'un içinde, spermatozoa ve testosteron yapımından sorumlu bir çift organdır. Partes genitales masculina internae'da yer alır. Epididymis, ductus deferens ve eklenti bezleriyle birlikte spermatozoa ve ilgili salgılar içeren semeni üretirler. Her bir testis oval biçimdedir ve iki yandan basıktır (13-16). İki yüzü vardır. Birisi dışarıya dönüktür facies lateralis ve diğeri içeriye bakar facies medialis'tir. İki kenarı vardır. Kenarlardan biri serbesttir. Dışbükey olan bu kenara margo liber denir. Diğeri epididymis'in bulunduğu kenardır, bu kenara da margo epididymalis denir. İki ucu vardır. Bu uçlar extremitas capitata ve extremitas caudata'dır. Extremitas capitata caput epididymis ile temas eder, extremitas caudata ise cauda epididymis'e temas eder (13).

2.1.1. Tunica Testis

Testisler, birbirini tamamen örten ve yine birbirinin içinde yer alan tabakalar ile örtülmüştür. Bu örtülere tunica testis denir. Bu örtüler dıştan içe doğru şöyle sıralanır (13).

1. Scrotum
2. Tunica dartos
3. Fascia spermatica externa
4. Fascia cremasterica ve m. cremaster

5. Fascia spermatica interna
6. Tunica vaginalis testis
7. Tunica albuginea

2.2. Histoloji

2.2.1. Tunica Albuginea

Tunica albuginea bağ dokudan yapılmış, mavimsi beyaz renkli, kalın fibröz bir tabakadır (13). Bu tabaka testisi saran sıkı bir kapsülden oluşmuştur, bu kapsül testisi loblara da ayırır ve seminifer dokuya ritmik kontraksiyonlar sağlayabilmek için yapısında fibroblast ve myofibroblastlar bulundurur. Tunica albuginea'nın derin kısmı kan ve lenf damarları barındıran gevşek bağ doku tabakasından ibarettir, buna bazen tunica vasculosa da denir. (16,17).

2.2.2. Seminifer Tubuller

Tunica albuginea'nın oluşturduğu ince bölmelerle testis, tabanı dışarıya tepesi içeriye dönük çok sayıda koni şeklinde lopcuklara yani lobuli testis'lere bölünür. Septula testis'ler testis dokusu içinde, bir bağ doku eksenini üzerinde birbirine yaklaşıp seyrederek. Septula testis'ler arasında oluşan lopcukların yapısında üreme hücreleri yani spermatozoon'u yapan tubuli seminiferi contorti denilen testis kanalcıkları bulunur. Bu kanalcıklar özel bir epitel ile döşenmiş olup çevreden merkeze doğru kıvrımlı seyrederek. Her bir tubuli seminiferi contorti, mediastinum testis yakınında, kıvrımları azalmış yada düz seyirli, lumenleri biraz daha geniş bir kanal ile yani tubuli seminiferi recti ile seyrine devam eder. Tubuli seminiferi contorti'lerin devamı niteliğindeki tüm tubuli seminiferi recti'ler mediastinum testis'e girer ve burada birbiri ile ağzlaşıp bir ağ, rete testis'i oluştururlar. Rete testis'ten ductuli efferentes testis denilen kanallar başlangıç alır. Bu kanallar tunica albuginea'yı delerek testis'ten dışarı çıkarlar (13).

Seminifer tubuller, gamet üretiminden sorumlu hücrelerle, destek görevi gören sertoli hücrelerini ihtiva etmektedirler. Buradaki bağ doku tabakası kollajen lifler, fibroblastlar ve myoid hücreleri barındırır. Myoid hücreler düz kas hücrelerinin

pek çok özelliğini gösterirler. Myoid hücrelerinin yapmış olduğu peristaltik kasılma dalgaları sayesinde spermatozoa'lar tubuller içinden geçerek epididymis'e ulaşırlar (16,18,19). Destek hücreleri (sertoli hücreleri), epitelin bazal katmanında spermatojenik hücrelerin etrafını sarmış bir şekilde bulunur. Sertoli hücreleri birbirleriyle sıkı sıkıya bağlanarak kan-testis bariyerini oluştururlar ve gelişmekte olan spermatojenik hücreleri kan kaynaklı etkenlere karşı korurlar (14,15).

2.2.3. İnterstisyel Doku

Seminifer tubuller arasındaki boşluk tunica albuginea'nın bir devamı olan interstisyel dokuyla kaplanmıştır. İnterstisyel doku gevşek bağ dokudur. İnterstisyel bağ doku, bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içerir (3-7,18).

3. Bağ Doku

Bağ doku, vücut içindeki diğer doku ve organlara metabolik ve yapısal destek sağlayan mezodermal kökenli temel doku tipine verilmiş geleneksel bir terimdir. Mekanik yapısal rolüne ek olarak bağ doku, dokularla dolaşım sistemi arasındaki beslenme, metabolit ve atık ürünlerin değişimine de aracılık etmektedir. Bağ doku genellikle kan ve lenf damarlarını içermektedir (Tablo 1) (17).

Tablo 1: Bağ Doku Çeşitleri (16),

3.1.Bağ Doku Çeşitleri	
A. Embriyonik Bağ Dokular	
1. Mezenşimal Bağ Doku	
2. Müköz Bağ Doku	
B. Asıl Bağ Doku	
1. Gevşek Bağ Doku	
2. Sıkı Bağ Doku	
a. Sıkı Düzensiz Bağ Doku	
b. Sıkı Düzenli Bağ Doku	
(1) Kollajen	
(2) Elastik	

3. Retiküler Doku
4. Yağ Doku
C. Özelleşmiş Bağ Doku
1. Kıkırdak
2. Kemik
3. Kan

Gevşek bağ doku vücutta gerekli olan bölgelerde esneklik ve darbe emici tampon olarak bulunur (15).

3.2. Bağ Doku Hücreleri

Bağ doku hücreleri birincil bağ dokudaki (mezenşim) öncül hücrelerden türemişlerdir ve her biri değişik fonksiyonlarıyla beraber birçok tipe bölünmüştür. Baskın ortak fonksiyonları ise zemin maddesinin sentezi ve sürekliliğinin sağlanmasıdır. En çok rastlanılan ortak destek hücresi fibroblast'tır (16,17).

Savunma ve bağışıklık fonksiyonu olan hücrelerle destek dokuda karşılaşılabilir. Bunlar mast hücreleri, doku makrofaj'ları, beyaz kan hücrelerinin tüm tipleri ve antikör salgılayan plazma hücreleridir. Bu hücrelerden bazıları destek doku içerisinde göç eder ve bölgesel fonksiyonlarını gerçekleştirir, diğer bağışıklık hücreleri de destek doku içinden geçerek fonksiyonlarını gerçekleştirecekleri yere giderler (17).

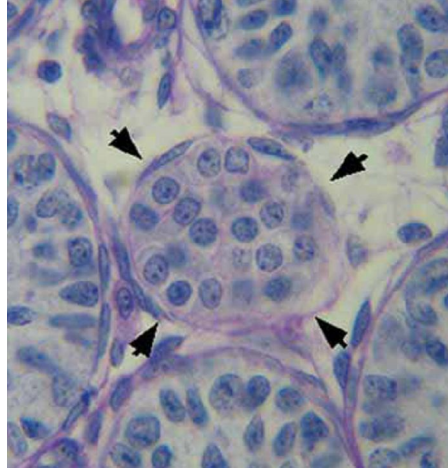
4. Leydig Hücreleri

Franz Leydig, kendi adını taşıyan bu hücreleri 1850 senesinde keşfetmiştir (20). Leydig hücreleri testiste interstisyel dokuda tek tek yada kümeler halinde bulunurlar. Genelde kapiller damarlara yakındırlar. Erkeklerde testosteron hormonu biyosentezi yapıp salgırlar (7,20).

Kemirgen testisinde iki farklı tip Leydig hücresi topluluğu görülür. Bunlar Fötal Leydig Hücreleri ve Adult Leydig Hücreleri'dir. Bu iki grup yerleşim yerleri, yapıları, ultra-yapıları ve yaşam döngüleri açısından farklılıklar gösterirler (21).

4.1. Fötal Leydig Hücreleri

Fötal Leydig Hücreleri ışık mikroskobu altında 14.5'uncu fötal günden, 25. postnatal güne kadar gözlemlenebilir. Fötal Leydig Hücreleri seminifer tubuller arasındaki bölgede sıralanmış kümeler halinde bulunurlar. Fötal Leydig Hücreleri kümesi şu tipik histolojik özellikleri gösterir; kümeler büyük yuvarlak yada oval şekilli Leydig hücrelerinden ibarettirler, bunların yuvarlak belirgin bir çekirdekleri ve çok göze çarpan çekirdekçikleri vardır. Tüm kümeler ince, fibrositlerden oluşan bir örtüyle sarılmışlardır ve bunlar birbirlerine hücrel çıkıntılarla tutunmuşlardır (Şekil 1). Kümelerin içinde Fötal Leydig Hücreleri arasında çeşitli sıklıklarda kollajen lifleri bulunur. Pek çok durumda kümelerin kapillerlerin çok yakınında yer aldıkları gözlemlenmektedir (21).



Şekil 1: Fötal Leydig Hücreleri, (21)

15. fötal günle 25. postnatal gün arasında kümelerin yapı ve boyutlarında değişimler yaşanmaya başlar. Fötal Leydig Hücrelerindeki büyüme 19. fötal günde en yüksek noktasına ulaşır. Bundan sonra, 1. postnatal günde büyük kümeler pek çok küçük kümeler oluşturacak şekilde bölünürler. 5. postnatal günden sonra Fötal Leydig Hücre kümeleri sayısı gitgide azalmaya başlar ve böylece 10. postnatal günde sadece 5 ila 7 arasında küme gözlenirken, 15. postnatal günde 3-4 küme gözlenmeye başlar. 25. postnatal günde ise sadece bir belki iki tane küme ancak gözlenebilir (21).

4.2. Adult Leydig Hücreleri

Adult Leydig Hücreleri 3 kısımda incelenirler;

4.2.1. Öncül Safha: Leydig hücreleri mezenşim benzeri fibroblastlardan 13-28. postnatal günlerde köken alırlar.

4.2.2. Olgunlaşmamış Safha: Leydig hücreleri 35. postnatal günden itibaren küçük miktarlarda testosteron salgılamaya başlarlar.

4.2.3. Olgunlaşmış Safha: Leydig hücreleri aktif olarak testosteron üretmeye başlarlar. 90. postnatal günde seksüel açıdan olgunlaşmış hayvanda tam olarak fonksiyon göstermeye başlarlar.

Öncül Hücreler:

Öncül hücreler kökenini peritubuler yada perivaskuler fibroblast'lardan alırlar.

Olgunlaşmamış Hücreler:

Öncül hücrelerden farklı olarak oval yada yuvarlağa yakın hücrelerdir, çekirdekleri yuvaraktır ve 25 ila 35. postnatal günler arasında gözlenebilirler. Peritubuler ve perivaskuler öncül hücrelerin yapıları silindirikten oval yahut yuvarlağa doğru dönüşmeye başlarlar. Peritubuler öncül hücreler seminifer tubullerden interstisyuma doğru uzaklaşmaya başlarlar ve kendilerine tercihen kılcak damarların yakınlarını seçerler. Fötal Leydig Hücrelerinden farklı olarak Adult Leydig Hücreleri bazal lamina ve fibroblastlardan oluşan bir örtüyle sarılmamışlardır.

Olgun olmayan Leydig hücreleri kadar olgun Leydig hücrelerinin de çekirdekleri büyük ve yuvaraktır (21).

Olgunlaşmış Safha:

Adult Leydig Hücresi gelişimindeki son safha olgunlaşmamış Leydig hücrelerinin olgun Leydig hücrelerine dönüşümüdür. Hücrenin boyutu belirgin bir oranda artar. Çekirdeği büyük, eliptik yada yuvaraktır (Şekil 2) (21).

Yeni Zelanda Tavşanlarında da Adult Leydig Hücreleri hayvan 5-6 haftalıkken görülmeye başlar. Doğumdan sonraki birinci haftada artık Fötal Leydig Hücreleri yavaş yavaş gözden kaybolmaya başlamıştır. 1-5. haftalar arasında interstisyel doku neonatal periyoda göre çok daha homojendir. Bu zaman zarfında en çok görülen hücreler mezenşimal tip hücreler ve henüz tam olarak olgunlaşmamış Leydig hücreleridir. Bu haftalar arasında interstisyel dokuda açıkça bir değişiklik olur ve Leydig hücreleri görülmeye başlar. Bu hücreler genellikle damarların etraflarında gruplar oluştururken bazıları da seminifer tubullerin sınırlarına yerleşmişlerdir. İnterstisyel dokudaysa mezenşimal hücrelerle kısmi olarak farklılaşmamış hücreler hala gözlenmektedir. 6-7. haftalarda Leydig hücrelerinin sayısında ani bir artış gözlenirken farklılaşmamış yada az farklılaşmış hücrelerin sayısında belirgin bir azalma gözlenir. İnterstisyel dokunun büyük kısmı artık olgunlaşmış Leydig hücrelerinden oluşmaktadır. Bir müddet sayısı sabit kalan Leydig hücrelerinde 9-10. haftalarda artış görülse de ikinci büyük patlamasını 10-11. haftalarda yapar ve yetişkin bir hayvanın seviyesine gelir. 7 ile 14. haftalar arasındaysa spermatogenesisinde başlaması ile seminifer tubullerin çapında artış meydana gelir ve bunun sonucunda da interstisyel dokunun nispi miktarı önceki devrelere oranla azalır (22,23).



Şekil 2: Adult Leydig Hücreleri, (21)

5. Stereoloji

Stereoloji bir nesnenin örneğin sayı, hacim, yüzey alanı ve uzunluğu gibi üç boyutlu parametreleri hakkında sorular sorar. Soru sormanın yolu çerçeve, çizgiler ve noktalar gibi geometrik sondaları nesneye “fırlatarak” sondayla nesnenin etkileşimlerine bakmaktır. Esas anlaşılması gereken metodun hem sonda ve hem de örnekleme için tarafsız olması gerektiğidir. Örnekleme rastgele olmalı ve popülasyonun her bir parçasına eşit oranda örneklenme şansı tanınmalıdır (24).

5.1. Optik Parçalama

Bir organdaki toplam hücre sayısına ulaşmak için optik parçalama metodu kullanılabilir. Optik parçalama stereolojideki iki gelişimin birleşmesiyle ortaya çıkmıştır; sayım için üç boyutlu bir sonda; optik disektör ve sistematik bir örnek örnekleme şeması; parçalama. Parçalama, yapısal bileşenin bilinen bir kısmında örnekleme gerektirmektedir. Parçalama için sistematik örnekleme yapılmalıdır ve buda yüksek oranda etkili değerlendirmeler yapmayı sağlamaktadır (25).

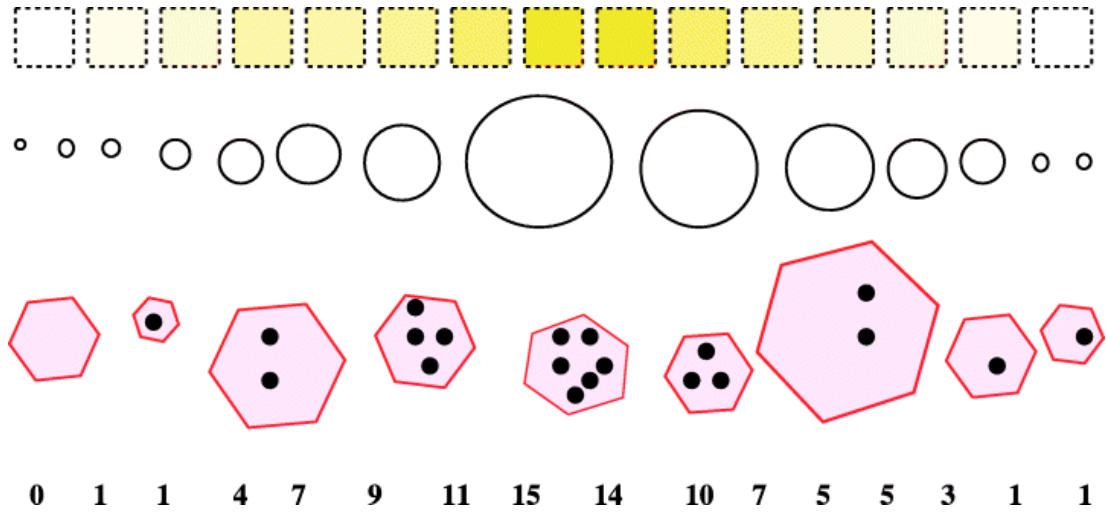
5.2. Parçalama

Parçalamanın prensibi parçacıkları bilinen ve önceden karar verilebilen olasılıkla rastgele bir örnek örnekleme ve sonra örnekleme olasılığı ve örnekteki sayıdan referans uzaydaki toplam sayıyı (N) elde etmektir. Parçacıklar içeren bir organ bilinmeyen sayı, boyut ve şekilde parçalara ayrılır. Parçaların bilinen ve önceden karar verilen bölümleri rastgele örneklenir (Mesela sistematik olarak rastgele başlanır ve her on beşinci alınır). Çünkü her parçacık kısımların her birini kapsamaktadır, her bir parçacığın eşit olasılıkla örnekleme ihtimali vardır, başka bir ifade ile örnekleme bir örnek olmalıdır. N, örnekteki (N') parçacık sayısının ve ters örnekleme olasılığının $N=N' \cdot 15$ bir sonucu olarak elde edilir. Bu N'nin tarafsız değerlendirilmesidir. Örnekleme iki yada daha fazla adımda gerçekleştirilebilir. Büyük bir organ uygun bir başlangıçla kalın dilimler halinde kesilir, bir bölümü örnekleme, çubuklar şeklinde kesilir, çubuklar tekrar örnekleme, çubuklar küçük bloklar şeklinde kesilir ve örnekleme yapılır. Bu işlem sadece birkaç dakika alır. Daha sonra bu bloklar gömülür ve ayrıntılı bir şekilde kesilir. Bununla birlikte ihtiyaç duyulan tek bir örnek, tüm kesitlerin sadece küçük bir örneğidir. Son aşamada

her onuncu kesit örneklenebilir ve bu örneklerde sayım yapılır. Sayılan parçacıkların toplam sayısı, tüm örnekleme bölümleri tersine çevrilerek çarpılır ve N'nin tarafsız bir değerlendirilmesi yapılır. Buda bir balina böbreğinde çalışılsa bile çok bir iş yapılmayacağı anlamına gelmektedir (26).

5.3. Düz (Smooth) Parçalama

Genel parçalama tekniğinde değişiklik yapılmasıyla ortaya çıkmıştır. Genellikle fiziksel olarak ayrı parçalar yada parça, blok, dilim, kesit gibi kümeler üzerinde örnekleme yapıldığı hemen hemen her durumda kullanılabilir. Her parça sezgiye dayalı bir tahminle yada parçacığın içeriğiyle ilişkili olarak birbiriyle ilişkilendirilir (Şekil 3). İşte Düz (Smooth) Parçalama bu parçaların sezgiye dayalı tahmine uygun olarak, bir tepe noktası oluşturacak ve aralarında en az aralık bırakılacak bir şekilde art arda sistematik örneklemeyle sıralanmasıdır (27). Düz (Smooth) dizayn tabanlı yapılan parçalama işlemi basit rastgele örnekleme göre dört kata kadar daha etkilidir, kesin ve tarafsız değerlendirmeler yapılmasını sağlamaktadır (28-31).

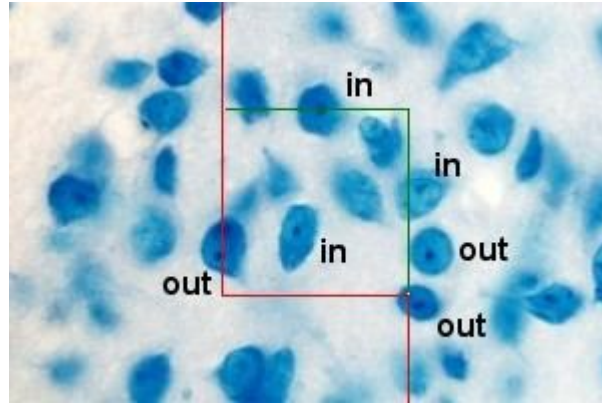


Şekil 3: Renk yoğunluğu, boyut, içerik ve sayısal değerler tabanlı bazı Düz (Smooth) dizayn protokolleri (28)

5.4. Optik Disektör

Disektör tarafsız ve basit üç boyutlu bir sondadır. Parçacıklar sıfır boyutludur ve bu yüzden sayım yapabilmek için üç boyutlu sondaların kullanılması

gerekmektedir. Optik disektörler, sayımlarda tarafsız değerlendirmeler sunar, hücrenin boyut ya da yapısıyla ilgili varsayımlar yapan değerlendirmelerden uzaktır, kayıp uç -lost caps- ve overprojection -fazla yansıma- diye bilinen problemlerden de etkilenmemektedir. Deneysel çalışmalarda yeterli kesinliği yakalayabilmek için yaklaşık 10 kesitte 100 ila 200 civarında hücre saymak yeterli olmaktadır. Optik parçalama için ilk olarak doku rastgele ve sistematik bir şekilde örneklenir. Kalın kesitler alınır ve bu kesitler mikroskopta x,y ekseninde önceden kararlaştırılmış adım aralıklarında, yükseklikleri kesit kalınlığından küçük olan optik disektör sondaları kullanılarak incelenir. Kesit kalınlığı ve disektör sondasının yüksekliği mikrokator yardımıyla ölçüldükten sonra dokunun altından ve üstünden mesafe bırakılarak önceden kararlaştırılan optik disektör sondası (Şekil 4) yüksekliği içerisine düşen hücreler, belirlenen bu yükseklikte bu sondanın yasak kenarlarına temas etmiyorsa o hücrelerin sayımları yapılır. Optik parçalama için kullanılacak parafin ve dondurulmuş bloklar kesilirken olabildiğince kalın kesilmeli ve 20 μm 'den daha az kalınlıkta yapılacak kesitlerden kaçınılmalıdır ve yine mikroskoplarda yüksek nümerik açıklıklı mikroskop objektifleri kullanılmalıdır, böylece odak derinliği mümkün olduğunca küçük olacaktır (24,25,32,33).



Şekil 4: Tarafsız sayım çerçevesi. Kırmızı çizgiler yasak kenarları göstermektedir. Bu kenarlara düşen hücreler sayılmazlar (34).

5.5. Leydig Hücre Sayısıyla İlgili Yapılmış Çalışmalar

Literatürde Leydig hücre sayısını araştıran stereolojik tekniklerin kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda kullanılan bazı metotlar varsayıma dayalı metotlardır. Bu metotlar bir organdaki hücre sayısını birim hacme düşen sayısal

yoğunluk olarak hesaplamaktadırlar (9). Optik ve fiziksel parçalama ise hacme gerek duymadan organdaki hücre sayısını hesaplayabilmektedir. Toplam sayının ölçülmesinin sayısal yoğunluğun hesaplanmasından daha iyi olmasının sebebini West şöyle açıklamıştır: Yoğunluklar arasında farklılıklar olduğu zaman ve referans hacim hakkında da hiçbir bilgi yoksa çalışılan bölgenin hacmindeki farklılıklar yada hücrelerin toplam sayısındaki farklılıkların ilişkilerinin derecesinin saptanmasına olanak yoktur. Yoğunluk verisinin hücre kaybının delili olarak kullanılması çalışmadaki tüm bireylerde referans hacmin aynı olarak alınması kesin bir varsayımla ilişkilidir (35). Braendgaard binlerce hücre sayılmasını gerektiren eski metotlardan çok azının direkt olarak toplam sayıyla ilgilendiğini geri kalan çoğunluğunsa sayısal yoğunluğu araştırdığını söylemiş, yoğunluk ölçümüne bağlı olarak elde edilen biyolojik sonuçların yorumlanmasının yoğunluktaki herhangi bir değişimin toplam sayıdaki bir değişimden mi ve/veya referans hacimdeki bir değişimden mi kaynaklandığının saptanmasının çok güç olduğunu belirtmiştir. Bu sebepten dolayı doğrulanamayan model-tabanlı varsayımlara dayanılarak üretilen değerlendirmelerin taraflı olduğunu bildirmiştir (33). İşte bu şekilde hücrelerin sayısal yoğunluğunu saptamak üzere geliştirilmiş olan Abercrombie, Floderus ve benzeri metotlar pek çok çalışmada kullanılmışlar, ancak bu metotlar varsayıma dayalı oldukları için, özellikle deneysel çalışmalarda yanlış sonuçlar vermişlerdir (36,37). Coggeshal bu metotların kullanıldığı çalışmaların %25-40 daha yüksek ve oldukça değişken sonuçlar ürettiğini bildirmiştir (38). Mendis, Floderus metoduyla Fiziksel disektör metodunu testis üzerinde yapmış olduğu çalışmasında karşılaştırmış ve Floderus metodunun gerçekleşebilmesi için testiste şu tip varsayımların yapılmasına gerek olduğunu belirtmiştir; testis dokusunun fizyasyon ve doku takibi aşamalarında eşit oranda büzüştüğünün varsayılması, testis referans hacminin sabit kaldığının varsayılması ve Leydig hücrelerinin çekirdeklerinin küresel olarak varsayılması. Disektör metodu içinse hiçbir varsayıma gerek yoktur. Mendis bu tip varsayımlara dayalı metotların, memeli testislerinde Leydig hücresi sayısının değerlendirilmesinde ve özellikle deneysel çalışmalarda kullanılmasında bariz hatalar ortaya çıkardığını belirtmiştir (Mendis, Floderus metodunun ölçülen parçacıkların benzer şekilde küresel olması durumunda geçerli olabileceğini ve yine formülde yer alan ortalama profil çapını hesaplarken de tüm çekirdeklerin aynı çapta olduğunun

varsayılması gerektiğini bildirmiştir (37). Abercrombie metodu da varsayıma dayalı bir metot olmasıyla birlikte en büyük iki zayıflığı ortalama parçacık yüksekliğinin değerlendirilmesinde ve kesit kalınlığı “t” nin ölçülmesinde yada kontrolünde ortaya çıkmaktadır (9). Abercrombie metodu bu sorunların yanında birde lost caps -kayıp saha- problemi yaşamaktadır. Kayıp saha, hücre sayımı yapılırken, kesit yüzeyinde bulunan yada düşmek üzere olan partiküllerin fark edilememesi ve sayılmamasıdır. Bu sorunun giderilmesi için önerilen düzeltme faktörleri de ne yazık ki pratikte yetersiz kalmıştır (39). Baddeley’de biyolojik uygulamalarda varsayıma dayalı bu metotların zayıf kaldıklarını ve çekirdeklerin küresel olarak varsayılmasının uygunsuz olduğunu bildirmiştir. Baddeley bu metotların biyolojik olarak mantıksız sonuçlar ürettiğini belirtmiştir (9).

Bu çalışma testiste testosteron hormonu salgılanmasıyla görevli olan Leydig hücreleri sayısını stereolojik metotlarla araştırarak güncellemek amacıyla yapıldı. Leydig hücreleri sayısının belirlenmesinde etkin ve tarafsız bir sayım metodu olduğu kanıtlanmış olan “Düz (Smooth) Parçalama” dizayn tabanlı “Optik Parçalama” metodu kullanıldı. Aynı zamanda elde edilen buldular, varsayıma dayalı metotlarla yapılan çalışmaların bulgularıyla da karşılaştırıldı.

II. MATERYAL VE METOD

1. DENEKLER

Çalışma Danimarka'nın Aarhus şehrinde bulunan Skejby hastanesinden temin edilen on iki adet yetişkin erkek Yeni Zelanda Tavşan'ının testisleri üzerinde gerçekleştirildi. Tavşanların rastgele olarak seçilen altısının sağ testisi altısının da sol testisi kullanıldı. Sayım Adult Leydig Hücrelerinin çekirdekleri üzerinde gerçekleştirildi. Örneklemeye ve sayım için "Düz (Smooth) Parçalama" (Gundersen 2002) dizaynıyla kombine edilmiş "optik parçalama" (West 1991) metodu kullanılmıştır.

2. ÖRNEKLEME ŞEKLİNİN BELİRLENMESİ

Stereolojik çalışmalarda, çalışmanın başlangıcında pilot bir çalışma yapılmalı ve bu çalışmayla sayım esnasında uygulamak istediğimiz adımların uygun olup olmadığı araştırılmalıdır. Biz burada optik parçalama metodu gereğince pilot çalışmamız sonucunda 200 civarında hücre çekirdeği sayabilmek için parafin bloklardan 30 µm kalınlığında kesitler almaya, testislerde Leydig hücre çekirdekleri sayımı için 3794.1 µm² alanı olan bir sayım çerçevesi kullanmaya, X ekseninde 800 µm ve Y ekseninde de 800 µm adım aralıkları bırakmaya karar verdik. Sayımlarımızı yüksekliği 10 µm olan optik disektör sondası yüksekliği içerisinde gerçekleştirdik. Uygulamış olduğumuz bu adımlar ve almış olduğumuz sonuç neticesinde sayımımızda da bu adımları takip ettik.

3. HİSTOLOJİK ÇALIŞMALAR

Tespit

Tavşanlar 0.3 ml/kg hypnorm IP ve 2 mg/kg midazolam IV kullanılarak genel anesteziye alındı. Testisler ampute edildi ve immersiyon fikzasyon işlemi uygulandı. Bu işlem için testis extremitas capitata, extremitas caudata, margo liber, margo epididymalis, facies lateralis ve facies medialis'inden insülin iğnesiyle perfüze edildi. İmmersiyon tespiti için %10'luk formaldehit solüsyonunda bir gün bekletildikten

sonra solüsyon tazelendi. Üçüncü günde zarları temizlenerek bir hafta tespit solüsyonunda kalmaları sağlandı. Tartılma işlemi testislerin zarları ve epididymis'leri temizlendikten sonra yapıldı.

4. DOKU TAKİBİ

Zarları temizlenmiş testisler parçalama metoduna uygun olarak 1.5 mm aralıklarla dilimlere ayrıldı ve her ikinci dilim seçildi (Seçime ilk yada ikinci dilimden mi başlanacağı da gene rastgele bir şekilde belirlendi). Dokular doku takip kasetlerine konarak bir gece akar suyun altında bekletildi ve sayımın yapılabilmesi için gerekli olan histolojik doku takip aşamasına geçildi.

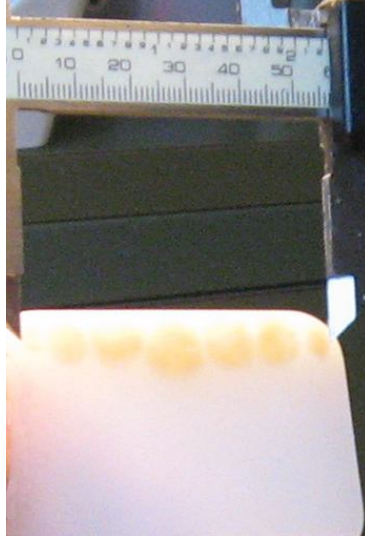
5. DOKULARIN İŞLENMESİ

Dilimler doku takibi yapıldıktan sonra, Düz (smooth) Parçalama kuralına uygun bir şekilde etkinliği artırmak için, küçükten büyüğe ve tekrar küçüğe olacak şekilde yan yana dizilerek tek bir kalıp halinde parafine gömüldü (Şekil 5).



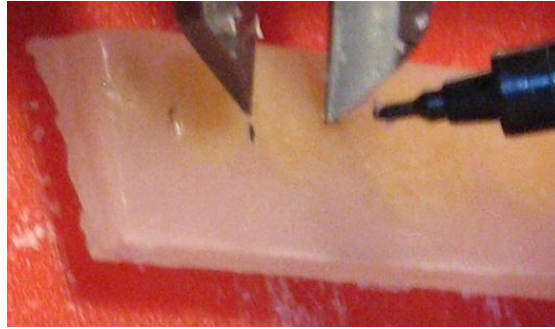
Şekil 5: Parafin bloğu içine gömülü dilimler

Kalıptaki dokuların uzunluğu ölçüldü (Şekil 6) ve çıkan sonuç 7-10 arası bir sayıya bölündü (çünkü stereolojide 200 civarında hücre sayabilmek için sonuçta elimizde yaklaşık olarak 10 civarında doku örneği kalması gerekmektedir). Biz bu sayıyı 8 olarak aldık ve 8'e böldük.



Şekil 6: Dokuların uzunluğunun dijital kumpas yardımıyla ölçülmesi

8'e böldükten sonra, çıkan sonuçtan daha büyük olmayacak herhangi bir tam sayı rastgele olarak belirlendi (çünkü sistematik örneklemenin rastgele bir noktadan başlaması gerekmektedir). Dokunun başlangıcından rastgele olarak belirlediğimiz bu sayı kadar bir mesafe ölçülerek işaretlendi. Devamında 8'e böldükten sonra elde ettiğimiz rakam kadar uzaklık birbirini takip eden sıralarla işaretlenerek parafin bloğun içinde gözlenen dokunun sonuna kadar gidildi (Şekil 7).



Şekil 7: Dokunun mürekkepli bir kalem yardımıyla ölçülerek işaretlenmesi

Bu işaretli yerlerden birbirine yatay olacak geçecek şekilde mürekkepli bir kalemle eğik çizgiler çekildi (Şekil 8).



Şekil 8: Eğik ve paralel çizgilerin çekilmesi

Sonra ince uçlu bir testere yardımıyla bu eğik ve birbirine paralel olacak şekilde çizilen yerlerden kesildi. Kesim işlemi bittikten sonra elde edilen her bir blok doksan derece yan döndürülerek (hepsi aynı yönde) metal blok kabı içine yerleştirildi (Şekil 9). Üzerlerine yeniden parafin eklenerek soğumaya bırakıldı.



Şekil 9: Metal blok kabı içindeki dokular

6. KESİT ALMA

Parafin bloğundan rotary mikrotomla 30 μ m kalınlığında kesitler alındı. Kesitler bloklardaki dokuların merkezlerinden geçecek şekilde alındı. (Bu aşamada karar vermek için birden fazla kesit alınıp incelendi ve lam üzerinde dokuların merkezinden geçtiğine inanıldığı -en belirgin görüldüğü- doku kısımlarında sayım yapıldı). Elde edilen kesitler jelatinli lama çekilerek kuruması beklendi. Kuruduktan sonra lamalar 60 derece ısıda yarım saat etüvde bekletildi. Artık boyanmak için hazır hale gelmiş olan lamalar giemsa boyası kullanılarak boyandı (Şekil 10). Lamalar Entellan (Merck) aracılığıyla lamelle kapatıldı.



Şekil 10: Sayıma hazır hale gelmiş dokular

7. STEREOLOJİK UYGULAMA

Hücre sayımı için Düz (Smooth) Parçalama metoduyla kombine edilmiş optik disektör sondaları kullanıldı.

Hücre çekirdeği sayımı mikroskop (Olympus BH2), motorlu tabla (Marzhauser Multicontrol 2000), mikroskoba bağlı CCD kamera (JVC) ve bunlara bağlı olan bir masaüstü bilgisayarı kullanılarak, Cast programı (VisioPharm, Hørsholm, Denmark) aracılığıyla yapıldı. Kesit kalınlıklarının ölçümünde Heidenhain marka mikrokator ND 281 (Traunreut, Germany) kullanıldı. Disektör sondasının yüksekliği 10 μm olarak belirlendi. Sayımda 60x'lik (N.A. 1.4) immersiyon objektifi kullanıldı. Testislerde Leydig hücreleri sayımı için 3794.1 μm^2 alanı olan bir sayım çerçevesi kullanıldı. Adım aralığı olarak da X ekseninde 800 μm ve Y ekseninde de 800 μm adım aralıkları bırakıldı.

Sayım için Cast programı kullanılarak, mikroskoptaki 4x'lik büyütmede bilgisayarın monitörüne yansıyan görüntüdeki testis dokusunun etrafı mouse yardımıyla çizilerek sınırlandırıldı (sayım çerçevesinin sadece o sınırlı alan içerisinde hareket etmesi istenmektedir). Daha sonra objektifte ve bilgisayarda 60x'lik büyütme seçeneğine geçildi. Sayım, sınırlandırılmış bu alan içinde sayım çerçevesinin Leydig hücre çekirdeklerinin üzerine rastgele ve sistematik olarak düştüğü bölgelerde gerçekleştirildi. Leydig hücrelerinin bulunduğu bölgelerde dokunun kalınlığı mikrokator yardımıyla ölçüldü ve mesela doku kalınlığı 20 μm ise üstten 5 μm ve alttanda 5 μm 'lik bir mesafe bırakılarak orta kısımdaki 10 μm 'lik yükseklik içerisinde sayım gerçekleştirildi.

Toplam hücre sayısına örneklemelerin sonucunda şu basamaklardaki hesaplamalar yapılarak ulaşıldı;

$$N = F_{ssf} \times F_{slab} \times F_{asf} \times F_{hsf} \times Q$$

formülüyle hesaplandı.

F_{ssf} ; testisler 1.5 mm aralıklarla dilimlendikten sonra aldığımız her ikinci dilimi,

F_{hsf} ; kesitin ortalama yüksekliğinin disektör sondası yüksekliğine bölümü,

F_{asf} ; adım aralıkları çarpımının çerçevenin alanına bölümü,

F_{slab} ; parafin bloktaki doku uzunluğunun tespit ettiğimiz sayıya böldüğümüzde çıkan sayının mikrometreye çevrilerek, aldığımız kesitin yüksekliğine bölünmesi karşılığında çıkan sonuç,

Q ; sayılan tanecik sayısı

8. HATA KATSAYILARININ BULUNMASI

Çalışmamızda hata katsayısının hesaplanmasında (Tablo 4);

Tablo 2: Hata katsayısının hesaplanması

Blok No (i)	ΣQ	$Q_i \times Q_i$	$Q_i \times Q_{i+1}$	$Q_i \times Q_{i+2}$
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
Toplam	ΣQ	A	B	C

Burada elde edilen verilere bağlı olarak disektör sondasının hata katsayısı aşağıdaki formülle hesaplandı;

$$CE(\text{Disektör}) = \frac{\sqrt{\text{Var}(\text{noise}) + \text{Var}(\text{SRÖ})}}{\sum Q^-}$$

Burada noise değeri toplam hücre sayısıdır;

$$\text{Var}(\text{noise}) = \sum Q^-$$

Sistemik rastgele örnekleme değerinin varyansında aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı;

$$\text{Var}(\text{SRÖ}) = \frac{3(A - \text{Var}(\text{noise})) - 4B + C}{240}$$

Bu işlem hem kesit kalınlığı ve hem de sayılan nokta için uygulandıktan sonra toplam hücre sayısına ait hata katsayısı için şu formül kullanıldı;

$$CE(N) = \sqrt{CE^2(\text{Disektör}) + CE^2(t)}$$

III. BULGULAR

1. GENEL GÖZLEMLER

Tablo 3: Testis ağırlıkları

Denek No	Taraf	Ağırlık
1	Sağ	2,47 gr
2	Sağ	2,87 gr
3	Sağ	3,07 gr
4	Sağ	3,03 gr
5	Sağ	2,82 gr
6	Sağ	3,02 gr
7	Sol	2,24 gr
8	Sol	3,21 gr
9	Sol	4,09 gr
10	Sol	2,62 gr
11	Sol	2,70 gr
12	Sol	2,84 gr
Genel Ortalama		2,915gr ± 0,46

Tablo 4: Yan yana sıralayarak parafine gömmüş olduğumuz testislerin dijital kumpasla ölçülmesi ve “8” e bölünmesi sonucunda elde edilen değerler.

Parafin İçine Yan yana Gömülü Dilimlerin				
No	Dijital Kumpasla Ölçülen Parafin Bloğun Uzunluğu	8'e Bölünce Çıkan Sayı	Rastgele Belirlenen Sayı	Bölünce Çıkan Sayı/ Kesit Kalınlığı
1	54,34 mm	6,79	2	6790/30=226,33
2	59,67 mm	7,45	6	7450/30=248,33
3	61,31 mm	7,60	3	7600/30=253,33
4	65,75 mm	8,22	5	8220/30=274
5	43,75 mm	5,50	2	5500/30=183,33
6	77,28 mm	9,66	6	9660/30=322
7	38,84 mm	4,85	3	4850/30=161,66
8	70,40 mm	8,75	6	8750/30=291,66
9	71,00 mm	8,87	4	8870/30=295,66
10	51,96 mm	6,50	1	6500/30=216,66
11	56,38 mm	7,00	5	7000/30=233,33
12	56,08 mm	7,01	4	7010/30=233,66

Tablo 5: Toplam hücre sayısının hesaplanabilmesi için her satırdaki her bir testis için çalışma boyunca yapmış olduğumuz örneklemeler birbirleriyle çarpılarak toplam hücre sayısı bulunur.

Toplam Hücre Sayısı						
No	F_{ssf}	F_{asf}	F_{slab}	F_{hsf}	Q	Hücre Sayısı
1	2	168,68	226,33	1,602	223	27,277,406
2	2	168,68	248,33	1,421	235	27,975,939
3	2	168,68	253,33	1,457	215	26,771,838
4	2	168,68	274	1,554	219	31,458,590
5	2	168,68	183,33	1,667	227	23,403,917
6	2	168,68	322	1,624	189	33,342,433
7	2	168,68	161,66	1,577	279	23,995,624
8	2	168,68	291,66	1,635	238	38,288,219
9	2	168,68	295,66	1,568	199	31,123,273
10	2	168,68	216,66	1,672	221	27,008,524
11	2	168,68	233,33	1,643	197	25,478,151
12	2	168,68	233,66	1,625	230	29,461,790
Genel Toplam						28,798,809 ± 4,233,183

Tablo 6: Grup içi Varyasyon Katsayısı (CV) Hesaplamaları

	$X-X_{ort}$	$(X-X_{ort})^2$
1	- 1,521,403	2314667088409
2	- 822,870	677115036900
3	- 2,026,971	4108611434841
4	+ 2,659,781	7074434967961
5	- 5,394,892	29104859691664
6	+ 4,543,624	20644519053376
7	- 4,803,185	23070586144225
8	+ 9,489,410	90048902148100
9	+ 2,324,464	5403132887296
10	- 1,790,285	3205120381225
11	- 3,320,658	11026769552964
12	+ 662,981	439543806361
Genel Ortalama		197118262193322/12= 16426521849444
SD		$\sqrt{16426521849444} = 4,052,965$
CV		SD/mean= 0,14

Takip eden tablolarda sayım yapılan lamlarda bulunan bölgelerdeki toplam Leydig hücreleri sayıları ve toplam kesit kalınlıkları hakkında bilgi ve hata katsayıları sonuçları bulunmaktadır:

1 numaralı denek;

Tablo 7: 1 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	37	1369	777	555
2	21	441	315	756
3	15	225	540	360
4	36	1296	864	1224
5	24	576	816	168
6	34	1156	238	612
7	7	49	126	217
8	18	324	558	0
9	31	961	0	0
Toplam	223	6397	4234	3892
CE (ΣQ)= 0,070				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	119,5	14280,25	10516	4063
2	88	7744	2992	11748
3	34	1156	4539	3281
4	133,5	17822,25	12882,75	9612
5	96,5	9312,25	6948	3667
6	72	5184	2736	3240
7	38	1444	1710	7239

8	45	2025	8572,5	0
9	190,5	36290,25	0	0
Toplam	817	95257	50895	42850
CE (t)= 0,045				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,084				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

2 numaralı denek;

Tablo 8: 2 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ_i	$Q_i \times Q_i$	$Q_i \times Q_{i+1}$	$Q_i \times Q_{i+2}$
1	36	1296	1368	756
2	38	1444	798	1596
3	21	441	882	336
4	42	1764	672	1848
5	16	256	704	352
6	44	1936	968	44
7	22	484	22	330
8	1	1	15	0
9	15	225	0	0
Toplam	235	7847	5429	5262
CE (ΣQ)= 0,069				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				

	#	**	***	****
Blok No	$\sum t$	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	64,5	4160,25	4773	5482,5
2	74	5476	6290	5513
3	85	7225	6332,5	1147,5
4	74,5	5550,25	1005,75	8046
5	13,5	182,25	1458	803,25
6	108	11664	6426	1458
7	59,5	3540,25	803,25	2856
8	13,5	182,25	2856	0
9	48	2304	0	0
Toplam	540,5	40284,25	29944,5	25306,25
CE (t)= 0,047				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,084				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

3 numaralı denek;

Tablo 9: 3 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	27	729	297	1161
2	11	121	473	88
3	43	1849	344	1591
4	8	64	296	312

5	37	1369	1443	481
6	39	1521	507	1053
7	13	169	351	130
8	17	729	170	0
9	10	100	0	0
Toplam	215	6651	3881	4816
CE (ΣQ)= 0,074				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	76	5776	2470	9272
2	32,5	1056,25	3965	812,5
3	122	14884	3050	10065
4	25	625	2062,5	2350
5	82,5	6806,25	7755	3712,5
6	94	8836	4230	7849
7	45	2025	3757,5	2970
8	83,5	6972,25	5511	0
9	66	4356	0	0
Toplam	626,5	51336,75	32801	37031
CE (t)= 0,047				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,088				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

4 numaralı denek;**Tablo 10:** 4 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	18	324	252	144
2	14	196	112	826
3	8	64	472	120
4	59	3481	885	1475
5	15	225	375	705
6	25	625	1175	475
7	47	2209	893	658
8	19	361	266	0
9	14	196	0	0
Toplam	219	7681	4430	4403
CE (ΣQ)= 0,073				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	115	13225	7820	4255
2	68	4624	2516	13124
3	37	1369	7141	4477
4	193	37249	23353	23353
5	121	14641	14641	11011
6	121	14641	11011	8591
7	91	8281	6461	4823
8	71	5041	3763	0
9	53	2809	0	0
Toplam	870	101880	76706	69634

CE (t)= 0,039 Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı
CE (N)= 0,083 Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

5 numaralı denek;

Tablo 11: 5 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	39	1521	1677	663
2	43	1849	731	1032
3	17	289	408	323
4	24	576	456	48
5	19	361	38	418
6	2	4	44	86
7	22	484	946	396
8	43	1849	774	0
9	18	324	0	0
Toplam	227	7257	5074	2966
CE (ΣQ)= 0,067 Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	74	5476	8510	4514
2	115	13225	7015	8050
3	61	3721	4270	2074

4	70	4900	2380	1190
5	34	1156	578	1547
6	17	289	773,5	3000,5
7	45,5	2070,25	8030,75	3367
8	176,5	31152,25	13061	0
9	74	5476	0	0
Toplam	667	67465,5	44618,25	23742,5
CE (t)= 0,044				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,080				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

6 numaralı denek;

Tablo 12: 6 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ_i^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	24	576	120	744
2	5	25	155	150
3	31	961	930	434
4	30	900	420	930
5	14	196	434	322
6	31	961	713	62
7	23	529	46	667
8	2	4	58	0
9	29	841	0	0
Toplam	189	4993	2876	3309

CE (ΣQ)= 0,078				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	58,5	3422,25	2925	5586,75
2	50	2500	4775	7500
3	95,5	9120,25	14325	7305,75
4	150	22500	11475	11475
5	76,5	5852,25	5852,25	7497
6	76,5	5852,25	7497	535,5
7	98	9604	686	9065
8	17	289	1572,5	0
9	92,5	8556	0	0
Toplam	714,5	43449	42608	35537
CE (t)= 0,037				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,086				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

7 numaralı denek;

Tablo 13: 7 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	30	900	1020	1410
2	34	1156	1598	1224
3	47	2209	1692	658
4	36	1296	504	936

5	14	196	364	546
6	26	676	1014	988
7	39	1521	1482	585
8	38	1444	570	0
9	15	225	0	0
Toplam	279	9623	8244	6347
CE (ΣQ)= 0,060				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	104	10816	11336	11336
2	109	11881	11881	14878,5
3	109	11881	14878,5	3379
4	136,5	18632,25	4231,5	17403,75
5	31	961	3952,5	3611,5
6	127,5	16256,25	16256,25	14726,25
7	116,5	13572,25	13455,75	3961
8	115,5	13340,25	3927	0
9	34	1156	0	0
Toplam	883	98496	79918,5	69296
CE (t)= 0,037				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,070				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

8 numaralı denek;

Tablo 14: 8 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ_i	$Q_i \times Q_i$	$Q_i \times Q_{i+1}$	$Q_i \times Q_{i+2}$
1	43	1849	1333	645
2	31	961	465	713
3	15	225	345	750
4	23	529	1150	368
5	50	2500	800	1500
6	16	256	480	208
7	30	900	390	510
8	13	169	221	0
9	17	289	0	0
Toplam	238	7678	5184	4694
CE (ΣQ)= 0,068				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	135,5	18360,25	10907,75	4336
2	80,5	6480,25	2576	6681,5
3	32	1024	2656	3632
4	83	6889	9420,5	6723
5	113,5	12882,25	9193,5	8058,5
6	81	6561	5751	6885
7	71	5041	6035	2698
8	85	7225	3230	0
9	38	1444	0	0
Toplam	719,5	65906,75	49769,75	39014
CE (t)= 0,041				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,079				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

9 numaralı denek;

Tablo 15: 9 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	50	2500	1050	1400
2	21	441	588	588
3	28	784	784	840
4	28	784	840	28
5	30	900	30	30
6	1	1	1	15
7	1	1	15	25
8	15	225	375	0
9	25	625	0	0
Toplam	199	6261	3683	2926
CE (ΣQ)= 0,078				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	100,5	10100,25	11256	13718,25
2	112	12544	15288	19880
3	136,5	18632,25	24228,75	9486,75
4	177,5	31506,25	12366,25	2662,5
5	69,5	4830,25	1042,5	1390
6	15	225	300	727,5
7	20	400	970	1150

8	48,5	2352,25	2788,75	0
9	57,5	3306,25	0	0
Toplam	737	83896,5	68240,25	49015
CE (t)= 0,039				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,087				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

10 numaralı denek;

Tablo 16: 10numaralı denneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ_i^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	39	1521	1365	273
2	35	1225	245	490
3	7	49	98	203
4	14	196	406	350
5	29	841	725	812
6	25	625	700	1075
7	28	784	1204	28
8	43	1849	43	0
9	1	1	0	0
Toplam	221	7091	4786	3231
CE (ΣQ)= 0,070				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$

1	86,5	7482,25	8001,25	1816,5
2	92,5	8556,25	1942,5	4625
3	21	441	1050	1081,5
4	50	2500	2575	6225
5	51,5	2652,25	6411,75	7081,25
6	124,5	15500,25	17118,75	25211,25
7	137,5	18906,25	27843,75	2750
8	202,5	41006,25	4050	0
9	20	400	0	0
Toplam	786	97444,5	68993	48790,5
CE (t)= 0,041				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,081				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

11 numaralı denek;

Tablo 17: 11 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	7	49	112	210
2	16	256	480	368
3	30	900	690	330
4	23	529	253	690
5	11	121	330	374
6	30	900	1020	780
7	34	1156	884	680

8	26	676	520	0
9	20	400	0	0
Toplam	197	4987	4289	3432
CE (ΣQ)= 0,072				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	57	3249	5557,5	5472
2	97,5	9506,25	9360	6337,5
3	96	9216	6240	4416
4	65	4225	2990	7247,5
5	46	2116	5129	8326
6	111,5	12432,25	20181,5	17840
7	181	32761	28960	7330,5
8	160	25600	6480	0
9	40,5	1640,25	0	0
Toplam	854,5	100745,75	84898	56969,5
CE (t)= 0,036				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,080				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

****1. sütundaki değerlerin iki alt sıradaki değerlerle çarpımı

12 numaralı denek;

Tablo 18: 12 numaralı deneğin hata katsayıları hesaplamaları

	*	**	***	****
Blok No	ΣQ^-	$Q_i^- \times Q_i^-$	$Q_i^- \times Q_{i+1}^-$	$Q_i^- \times Q_{i+2}^-$
1	37	1369	703	999

2	19	361	513	494
3	27	729	702	270
4	26	676	260	182
5	10	100	70	270
6	7	49	189	224
7	27	729	864	1215
8	32	1024	1440	0
9	45	2025	0	0
Toplam	230	7062	4741	3654
CE (ΣQ)= 0,069				
Toplam Parçacığın Hata Katsayısı				
	#	**	***	****
Blok No	Σt	$t_i \cdot t_i$	$t_i \cdot t_{i+1}$	$t_i \cdot t_{i+2}$
1	106	11236	14522	12985
2	137	18769	16782,5	18221
3	122,5	15006,25	16292,5	8330
4	133	17689	9044	5054
5	68	4624	2584	6018
6	38	1444	3363	5263
7	88,5	7832,25	12257,25	11239,5
8	138,5	19182,25	17589,5	0
9	127	16129	0	0
Toplam	958,5	111911,75	92434,75	67110,5
CE (t)= 0,034				
Toplam Yüksekliğin Hata Katsayısı				
CE (N)= 0,077				
Hücre Sayısına Ait Hata Katsayısı				

*Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayılan toplam parçacıklar

Lam üzerindeki her bir doku kısmında sayım yapılan bölgelerde hesaplanan yüksekliklerin toplamı

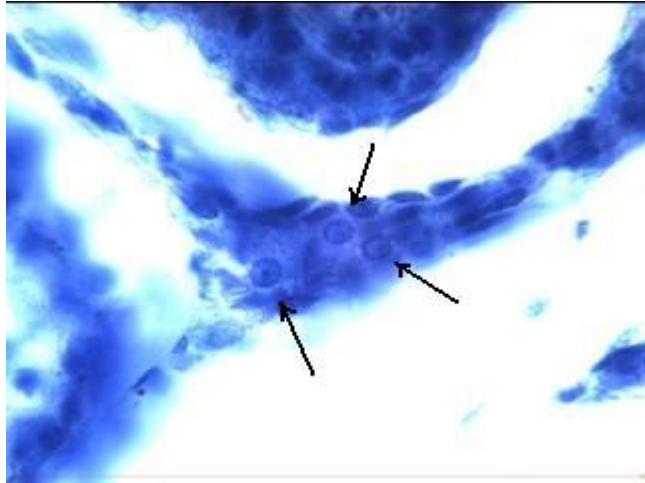
**1. sütundaki değerlerin kendisiyle çarpımı

***1. sütundaki değerlerin bir alt sıradaki değerlerle çarpımı

Tablo 19: Ortalama hata katsayısı

Ortalama Hata Katsayısı (CE (N))	
1. Denek	0,084
2. Denek	0,084
3. Denek	0,088
4. Denek	0,083
5. Denek	0,080
6. Denek	0,086
7. Denek	0,070
8. Denek	0,079
9. Denek	0,087
10. Denek	0,081
11. Denek	0,080
12. Denek	0,077
Genel Ortalama	0,082

Yine sağ ve sol testisteki hücre sayıları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır (Mann-Whitney U Testi $p>0,05$).



Şekil 11: Tavşan testisinde interstisyel aralıktaki Leydig hücreleri-tez (x100-30µm)

IV. TARTIŞMA

1. Varsayıma Dayalı Çalışmalar

Leydig hücreleri sayımını yetişkin Yeni Zelanda Tavşanları üzerinde gerçekleştiren Castro ve arkadaşları (40) Leydig hücresi sayımlarında histometrik metotlar kullanarak ölçüm yapmışlardır. Castro çalışmasını her iki testisi de saymak yerine sunulan bu çalışmada olduğu gibi sağ yada sol testisleri üzerinde gerçekleştirmiş ve tek grupta incelemişlerdir. Ancak Castro testisi hangi oranda örneklediğini ve almış olduğu örneklerin miktarları hususunda hiç bilgi vermemiştir. Sadece testisin mediastinum bölgesi hariç çeşitli bölgelerinden 2 mm³'lük doku örnekleri aldığını belirtmiştir. Buda ister istemez bir taraflılık doğurmaktadır çünkü organın her tarafına eşit oranda örneklenme şansı verilmemiştir. Ayrıca mediastinum ve diğer kısımların çıplak gözle tam olarak sınırlarını ayırmak imkansızdır. Optik parçalamada ise organ rastgele olarak eşit aralıklarla örnekleneceği için organın her bir noktasına aynı oranda örneklenme şansı tanınmaktadır. Castro ve arkadaşları Leydig hücrelerinin sayısını hesaplarken Abercrombie metodunu kullanmışlardır. Sonuç olarak 12 tane tavşan testisi üzerinde gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarında 71,30x10⁶ ila 132x10⁶ aralığında, ortalama olarak 103,70x10⁶ ± 5,77 Leydig hücresi bulmuşlardır.

Kaler ve Neaves (41) insanlar üzerinde yapmış oldukları Leydig hücreleri ile ilgili çalışmalarında üzerinde çalıştıkları testisten ekvatoryal kesitler almışlardır. Örnekleme testisin her tarafına eşit oranda şans vermediği için yine bir taraflılık doğurmuştur. Kaler çalışmasının sonucunda yetişkin genç bir insanın her iki testisinde 700 milyondan fazla Leydig hücresi bulunduğunu bildirmiştir.

Johnson ve ark. (42) testis üzerinde çeşitli hormonal ilaçlara karşı hassasiyetin etnik farklılıklar sonucunda artırıp artırmayacağı üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında Chalkley metodunu kullanmışlar ve Çinli erkek testislerinde ortalama olarak yaklaşık 250 x10⁶, İspanyol erkek testislerinde ortalama olarak yaklaşık 410 x10⁶ ve Kafkas bir erkekte ise ortalama olarak yaklaşık 300x10⁶ Leydig hücresi bulmuşlardır.

Mori ve Christensen'in (43) 4 adet adult rat testisi üzerinde yapmış oldukları morfolometrik çalışmalarında, -ki bu sayı biyolojik bir çalışma için günümüzde yeterli değildir- her ne kadar her iki testisi ölçüm için hazırlamış olsalar da sunulan bu çalışmada olduğu gibi sadece bir tanesi üzerinde çalışmışlardır. Mori bu çalışmasında Floderus eşitliğini kullanmıştır. Mori ve ark. bir testiste ortalama olarak $33,94 \times 10^6 \pm 1,03$ tane Leydig hücresi bulmuşlardır.

Yine Mori ve ark. (44) bir diğer çalışmalarında beş adet yetişkin farenin Leydig hücrelerinin sayısını araştırmışlar ve bunun için sadece sağ testisleri üzerinde çalışmışlardır. Buda bir taraflılık doğurmuştur. Mori bu çalışmasında da bir üst paragrafta bahsedilen araştırmasının materyal ve metot kısmını aynen alıp kullanmıştır. Mori bir farede her iki testiste yaklaşık olarak 6×10^6 Leydig hücresi olduğunu saptamıştır.

Golden hamsterlerde yapılan bir başka çalışmada Hardy ve ark. (45) Floderus metodunu kullanmışlar $18,2 \times 10^6$ Leydig hücresi bulmuşlardır. Yine Floderus metodunun kullanıldığı Golden hamsterlar üzerine yapılmış olan bir başka çalışmada ise Sinha Hikim ve arkadaşları (46) sadece sağ testis üzerinde çalışmışlar ve her bir testisin $25,4 \times 10^6$ Leydig hücresi barındırdığını bulmuşlardır. Burada iki farklı çalışmada aynı hayvanlar üzerinde aynı metodun kullanılmasına rağmen sonuçların birbirinden farklı olduğu gözlenmektedir.

2. Disektör Sayım Metodu Kullanarak Yapılan Çalışmalar

O'Shaughnessy ve ark. (47) fareler üzerine yapmış oldukları çalışmalarında optik disektör metodunu kullanmışlardır. O'Shaughnessy testisleri baştan sona kadar 20 μm kalınlığında keserek örneklemiş ancak çalışmasında hangi kesitler üzerinde sayım yaptığını ve seçim şeklini tarif etmemiştir. O'Shaughnessy yaklaşık olarak $1,5 \times 10^6$ Leydig hücresi bulmuşlardır.

Fareler üzerine yapılmış olan deneysel çalışmada Rothschild ve arkadaşları (48) fiziksel disektör sayım metodunu uygulamışlardır. Rothschild burada parçalama metodu uyarınca sistematik bir örnekleme yaptığını belirtmiş ama örneklemenin ayrıntılarına tam olarak girmemiştir (testis seçimi, hangi bölgelerden kesit alındığı, kesit örnekleme oranı vb.) Rothschild kontrol grubu fare testislerinde $1,32 \times 10^6$ Leydig hücresi bulmuştur.

Pedersen ve ark. (36) bismuth subnitrate uygulaması yaptıkları ratların testislerinde optik parçalama metoduyla Leydig hücrelerinin sayısına bakmışlardır. Pedersen burada kontrol grubunda ortalama olarak $18,7 \times 10^6$ (CV=0,11) Leydig hücresi bulmuştur.

Petersen ve Pakkenberg (49) bizimde uygulamış olduğumuz optik parçalama metodunu kullanarak testislerde genç ve yaşlı denekler üzerinde Leydig hücresi sayısını araştırmışlardır. Petersen pilot çalışması neticesinde 150 civarında hücre saymaya karar vermiştir. Yine her iki testisi de saymak yerine her yaş grubunda tek grup oluşturarak, içine sağ yada sol testisi alıp hücreleri saymıştır. Yaş aralığı 16-30 (ortalama 23,1) olan genç deneklerin testislerinde, testis başına 94 ila 323 tane arası (ortalama 205 tane) Leydig hücresi saymıştır. Sonucundaysa 43 ila 168 milyon arasında (ortalama 117×10^6 ve CV=0,53) Leydig hücresi olduğunu saptamıştır. Yine yaş aralığı 52-80 (ortalama 67) sujelerde ortalama ağırlığı 16,7 olan testislerde, testis başına 95 ila 606 tane arası (ortalama 294 tane) Leydig hücresi saymış ve sonuçta 52 ila 151 milyon arasında (83×10^6 ve CV=0,53) Leydig hücresi olduğunu saptamıştır. Bizde çalışmamızda Petersen'in bulgularına benzer olarak pilot çalışmamız neticesinde 200 civarında hücre saymaya karar verdik ve ortalama ağırlığı 2,95 gr olan tavşan testislerinde testis başına 189 ila 279 tane arası (ortalama olarak 234 tane) Leydig hücresi saydık.

Yine Petersen ve arkadaşlarının (50) 9 adet erkek testisi üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında testis biyopsileriyle tüm testisin örneklenecek sayılması arasında bir farklılığın olup olmadığını araştırmışlardır. Bu metot için testiste optik parçalama metodu kullanılarak hücreler sayılmıştır. Pilot çalışması sonucundaysa

150 civarında hücre sayma kararı almıştır. Sonuçta tüm testiste yapılan sayımlarda Leydig hücreleri sayısını 89×10^6 Leydig hücresi ($CV=0,34$ ve $CE=0,09$), biyopsiler kullanılarak yapılan sayımlardaysa 103×10^6 Leydig hücresi, ($CV=0,59$) saymıştır.

3. Testiste Hesaplanan Toplam Leydig Hücresi Sayısının Diğer Çalışmalarda Bildirilenlerle Karşılaştırılması

İnsanlar üzerinde yapılmış olan çalışmalarda Kaler ve Johnson varsayıma dayalı metotları kullanmışlar ve 400 ila 700 milyon arasında bir hücre sayısı bulmuşlardır. Petersen ise üzerinde çalıştığı insanlarda bizimde sunulan bu çalışmada kullanmış olduğumuz optik parçalama metodunu kullanmış ve yapmış olduğu çalışmalarında insan testisinde ortalama olarak yaklaşık 100 milyon civarında hücre bulunduğunu saptamıştır. Petersen yapmış olduğu stereolojik çalışmalarında bulgularını, eskiden gerçekleştirilmiş iki boyutlu profil sayımıyla yapılan çalışmalarla kıyaslamış ve o çalışmalarda yine insanda Leydig hücresi sayısının 400 ila 800×10^6 olarak bulunduğunu belirtmiştir. Böyle büyük aralıkların olmasını da daha önceleri tarif edilen varsayıma dayalı metotlardan elde edilen sonuçların yorumlanmasındaki güçlüklerle bağlamıştır.

Fareler üzerinde yapılmış olan varsayıma dayalı çalışmada Mori bir farede her iki testiste yaklaşık olarak 6×10^6 Leydig hücresi olduğunu söylerken optik ve fiziksel disektörler aracılığıyla çalışan O'Shaughnessy ve Rothschild yaklaşık olarak $1,4 \times 10^6$ Leydig hücresi bulmuşlardır. Burada birbirinden farklı olarak çalışan ama temelde aynı prensibe dayanan fiziksel ve optik disektör çalışmalarında alınan sonuçlar birbirlerine çok yakınken varsayıma dayalı bir metot uygulayan Mori çok daha farklı ve bu değerlerden uzak bir rakam elde etmiştir.

Yine aynı şekilde varsayıma dayalı metotlar kullanılarak yapılan birbirinden bağımsız Golden hamsterler üzerine gerçekleştirilen iki çalışmada Hardy $18,2 \times 10^6$ Leydig hücresi bulurken Sinha Hikim $25,4 \times 10^6$ Leydig hücresi bulmuştur. Burada iki farklı çalışmada aynı hayvanlar üzerinde varsayıma dayalı aynı metot (Floderus) kullanılmasına rağmen bile sonuçların birbirinden farklı olduğu gözlenmektedir.

Ratlar üzerinde varsayıma dayalı metot kullanarak çalışmasını yapan Mori ve ark. bir testiste ortalama olarak $33,94 \times 10^6 \pm 1,03$ tane Leydig hücresi bulmuşlardır. Optik parçalama metodunu kullanan Pedersen ise bu rakamdan neredeyse yarı yarıya farklı olarak $18,7 \times 10^6$ (CV=0,11) Leydig hücresi bulmuştur.

Son olarak da yetişkin Yeni Zelanda Tavşanları üzerine Castro ve ark. yapmış oldukları çalışmalarında ortalama $103,70 \times 10^6 \pm 5,77$ Leydig hücresi bulmuşlardır ki bu bizim optik disektör sondaları kullanarak yapmış olduğumuz çalışmamızda elde ettiğimiz $28,798,809 \pm 4,233,183$ değerinden oldukça farklı bir rakamdır.

Tablo 20: Önceki çalışmalarda elde edilen bulguların karşılaştırılması

Varsayıma Dayalı Çalışmalar				
Araştırmacı	Denek	Metot	Toplam Sayı	CE/CV
Kaler ve Neaves, 1978	İnsan	Chalkley	700x10 ⁶	
Johnson ve ark.,1998	İnsan	Chalkley	250-410x10 ⁶	
Mori ve Christensen, 1980	Rat	Floderus	33,94x10 ⁶	
Mori ve ark., 1982	Fare	Floderus	6x10 ⁶	
Hardy ve ark., 1987	Golden hamster	Floderus	18,2x10 ⁶	
Hikim ve ark., 1988	Golden hamster	Floderus	25,4x10 ⁶	
Castro ve ark., 2002	Yeni Zelanda Tavşanı	Abercrombie	103,70x10 ⁶	
Disektör Sayım Metodu Kullanılarak Yapılan Çalışmalar				
Petersen ve Pakkenberg, 2000	İnsan	Optik parçalama	83-117x10 ⁶	0,15/0,53
Petersen ve ark., 2000	İnsan	Optik parçalama	89x10 ⁶	0,09/0,34
Pedersen ve ark., 2003	Rat	Optik parçalama	18,7x10 ⁶	0,08/0,11
O'Shaughnessy ve ark., 2002	Fare	Optik parçalama	1,5 x10 ⁶	
Rothschild ve ark., 2003	Fare	Fiziksel parçalama	1,32 x10 ⁶	
Akosman ve Türkmenoğlu, 2009	Yeni Zelanda Tavşanı	Düz parçalama	28,79x10 ⁶	0,08/0,14

4. Sunulan Çalışmaya Ait Metodolojik Değerlendirmeler

Stereolojik bir çalışmada araştırmacının en sık sorduğu soru şüphesiz ki “kaç tane saymalıyım”dır. Buna verilecek cevap basittir: Asla 100 ila 200’den fazla sayma. Değerlendirmenin kesinliği için bu yeterli bir sayıdır. Bizde testis dokusunda örneklememizi yaparken bu kuralı dikkate aldık. Bu rakam aralığı noise, yani sayılan hücre sayısı için 0,1 ile 0,07 arasında bir hata katsayısı üretecektir (31). Sunulan bu çalışmada da elde edilmiş olan 0,08’lik hata katsayısı bu kabul edilebilir değerler arasındadır. Zaten hata katsayısı Pedersen ve Petersen’in çalışmalarına da uyum göstermektedir. Yine Marcos ve ark. (29), yapmış oldukları optik parçalama çalışmasında organ başına 650-1000 civarında hücre saymışlar ve sonuçta bu kadar bir hücre saymanın gereksiz olduğunu ve 200 civarında hücre saymanında yeterli kesinliği vereceğini bulmuşlardır.

Grup içi bireyler arası farklılıklardaysa değer biraz yüksek çıkmıştır. Petersen bunun sebebini testiste büyük biyolojik varyasyonlardan kaynaklanan Leydig hücrelerinin homojen olmayan bir şekilde dağılım göstermesinden dolayı testiste toplam Leydig hücre sayısında biyolojik varyasyonun oldukça yüksek olmasına bağlamıştır. Petersen çalışmasında biyopsi gruplarında bulmuş olduğu 0,59’luk varyasyon katsayısının bile yeterli kesinlikte olduğunu belirtmiştir. Bu biyolojik varyasyonlardan dolayı hata katsayısının da yüksek çıkabileceğini belirtmiştir. Yine büyük biyolojik varyasyonlardan dolayı oldukça büyük oranda kesin olmayan değerlendirmeler yapılsa bile bu değerlendirmelerin kabul edilebileceğini söylemiştir.

Yine stereolojideki son gelişmeler ışığında bulguların $0,25 < CE^2/CV^2 < 0,5$ aralığında olması tercih edilmektedir (25, 51). Bizim bulgularımızda $CE^2/CV^2 = 0,34$ bu aralıkta kabul edilebilir değerler arasındadır.

V. SONUÇ

Sunulan bu çalışmada yetişkin erkek 12 adet Yeni Zelanda Tavşanın testisindeki Leydig hücreleri sayısı incelenmiş ve toplam hücre sayısına modern bir stereolojik metot olan “Optik Parçalama” metoduyla “Düz (Smooth) Parçalama” metodu kombine edilerek ulaşılmıştır. Düz (Smooth) Parçalama metodu, parçalama metodunun etkinliğini arttırmak için genel parçalama tekniğinde değişiklik yapılmasıyla ortaya çıkmış bir metottur. Bu yüzden çalışmada kullanılan bu örnekleme dizaynı çok daha az iş gücü ve zaman harcanarak sonuca ulaşılmasını sağlayacak güncel ve etkin bir örnekleme metodudur. Çalışmadan elde edilen bulgular hem stereolojik hem de varsayıma dayalı metotlar kullanılarak yapılan benzer çalışmaların sonuçlarıyla kıyaslanmıştır. Leydig hücresi sayısında gözlenen farklılıklar işte bu varsayıma dayalı metotların kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Organın yapısı ve hücrelerin şekilleriyle organın hacmi üzerinde yapılması gereken çeşitli varsayımlara dayanan bu tip metotlar hatalı sonuçlar vermektedir. Aynı zamanda eski metotlarda bir organ için binlerce hücre sayılması gerekirken modern stereolojik metotlardaysa bir organ için 200’den fazla parçacık saymakta gereksiz yere iş gücü harcanması ve zaman kaybı manasına gelmektedir. Gözlemlerimize göre varsayıma dayalı metotlar kullanılarak günümüzde hala çalışmalar yapılmaktadır. Bu metotların çalışmalarda hatalı sonuçlar verdikleri bilim çevrelerince ortaya konulmuştur. Bu yüzden yapılacak olan çalışmalarda modern stereolojik metotların kullanılması daha doğru verilere ulaşılmasını sağlayacaktır.

VI. Kaynaklar

1. <http://www.tarimsal.com/tavsan.htm> 02.09.2009
2. Earle-Bridges M., Gendron K. (2000) *Rabbit Handbook* (1th ed.) Barron's Educational Series, U.S.A.
3. Noyan A. (1998) *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*, (10. Baskı), Meteksan Anonim Şirketi, Ankara
4. Aytekin Y., Solakoğlu S. (2003) *Temel Histoloji*, (1. Baskı), Nobel Matbaacılık, Ankara
5. Tanyolaç A. (1999) *Özel Histoloji*, (3. Baskı), Yorum Basım Yayın, Ankara
6. Kierszenbaum A. (Çeviri Demir R.), (2006), *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, (1. Baskı), Palme Yayıncılık, Ankara
7. Dellmann D.H., Eurell J.A. (1998) *Textbook of Veterinary Histology*, (5th ed.), Lippincott Williams and Wilkins; U.S.A.
8. Mendis-Handagama M.L.C. (1992) *Estimation Error of Leydig Cell Numbers in Atrophied Rat Testes due to the Assumption of Spherical Nuclei*, J Microsc. Vol.:168(Pt 1):25-32
9. Baddeley A., Jensen E. (2005) *Stereology for Statiscians*, (1th ed.), Chapman and Hall/CRC, U.S.A.

10. Gundersen H.J.G., Jensen E.B. (1987), *The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction*, Journal of Microscopy, Vol. 147, Pt: 3, September, pp: 229-263
11. Gundersen H.J.G., Bendtsen T.F., Korbo L., et al. (1988), *Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis*, Apmis 96: 379-394
12. Gundersen H.J.G. (1986), *Stereology of arbitrary particles*, Journal of Microscopy, Vol.143, Pt.1, July, pp:3-45
13. Dursun N. (2007) *Veteriner Anatomi II* (11. Baskı), Medisan Yayın Serisi:12, Ankara
14. Eurell J. (2003) *Veterinary Histology* (Paperback), Teton Newmedia Jackson/ U.S.A.
15. Frandson R.D. (2003) *Anatomy and Physiology of Farm Animals* (6th ed.), Blackwell Publishing Iowa/U.S.A.
16. Gartner L., Hiatt J. (2006) *Color Textbook of Histology* (3th ed.) Saunders, U.S.A.
17. Young B., Lowe J., Stevens A., et al. (2006) *Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas* (5th ed.) Churchill Livingstone, U.K.
18. Johnson K. (1991) *Histology and Cell Biology* (2nd ed.) Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore/Maryland/U.S.A.
19. Cormack D. (2001) *Essential Histology* (2nd ed.) Lippincott Williams and Wilkins Baltimore/Maryland/U.S.A.

20. Kuehnell W. (2003) *Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy* (4th ed.) Georg Thieme Verlag, New York/U.S.A.
21. Payne A., Hardy M. (2007) *The Leydig Cell in Health and Disease* (1th ed.) Humana Press, New Jersey/U.S.A.
22. Gondos B., Renston R.H., Goldstein D. (1975) *Postnatal Differentiation of Leydig Cells in the Rabbit Testis*, Am. J. Anat., 145:167-182
23. Gondos B., Morrison K.P., Renston R. (1977) *Leydig Cell Differentiation in the Prepubertal Rabbit Testis*, Biology of Reproduction, 17:745-748
24. Evans S., Janson A.M., Nyengaard J.R. (2004) *Quantitative Methods in Neuroscience: A Neuroanatomical Approach*, (1th ed.), Oxford University Press, U.S.A.
25. West M.J., Slomianka L, Gundersen H.J. (1991) *Unbiased Stereological Estimation of the Total Number of Neurons in the Subdivisions of the Rat Hippocampus Using the Optical Fractionator*, Anat Rec.;231(4):482-97
26. Gundersen H.J.G, Bagger P., Bendtsen T.F., et al. (1988) *The New Stereological Tools: Disector, Fractionator, Nucleator and Point Sampled Intercepts and Their Use in Pathological Research and Diagnosis*, Apmis 96: 857-881
27. Gundersen H.J.G. (2002), *The Smooth Fractionator*, Journal of Microscopy Vol.: 207, Pt. 3., pp: 191-210
28. Gadri J.E., Nyengaard J.R., Gundersen H.J.G. (2005), *Using biased image analysis for improving unbiased stereological number estimation- a pilot simulation study of the smooth fractionator*, Journal of Microscopy, Vol. 222, pp: 242-250

29. Marcos R., Monteiro R.A.F., Rocha E. (2004), *Estimation of the number of stellate cells in a liver with the smooth fractionator*, Journal of Microscopy, Vol. 215, Pt 2 August 2004, pp. 174-182
30. Marcos R., Monteiro R.A.F., Rocha E. (2006), *Design-based stereological estimation of hepatocyte number, by combining the smooth optical fractionator and immunocytochemistry with anti-carcinoembryonic antigen polyclonal antibodies*, Liver International, 26:116-124
31. Santos M., Marcos R., Santos N., et al. (2009), *An unbiased stereological study on subpopulations of rat liver macrophages and on their numerical relation with the hepatocytes and stellate cells*, J. Anat., 214, pp: 744-751
32. Gundersen H.J.G., Jensen E.B.V., Kieu K., et al. (1999) *The Efficiency of Systematic Sampling in Stereology-Reconsidered*, Journal of Microscopy Vol.:193, Pt. 3., pp:199-211
33. Braendgaard H., Evans S.M., Howard C.V., et al. (1990), *The total number of neurons in the human neocortex unbiasedly estimated using optical disectors*, Journal of Microscopy, Vol. 157, pt.3, March, pp:285-304
34. <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/scope/stereology/disector.htm>
27.09.2009
35. West M.J. (1993) *New Stereological Methods for Counting Neurons*, Neurobiology of Aging, Vol. 14, pp.275-285
36. Pedersen L.H., Stoltenberg M., Ernst E., et al. (2003) *Leydig Cell Death in Rats Exposed to Bismuth Subnitrate*, J. Appl. Toxicol. 23, 235–238

37. Mendis-Handagama M.L.C., Ewing L.L. (1990) *Sources of Error in the Estimation of Leydig Cell Numbers in Control and Atrophied Mammalian Testes*, Journal of Microscopy, Vol. 159, Pt.1, pp. 73-82
38. Coggeshal R.E., Forte R., Klein C.M. (1990) *Calibration of Methods for Determining Numbers of Dorsal Root Ganglion Cells*, Journal of Neuroscience Methods, 35:187-194
39. Hedreen J.C. (1998) *Lost Caps in Histological Counting Methods*, The Anatomical Record, 250:366-372
40. Castro A.C.S., Berndtson W.E., Cardoso F.M. (2002) *Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits*, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 35: 493-498
41. Kaler L.W., Neaves W.B. (1978) *Attrition of the human Leydig cell population with advancing age*, Anat Rec.192(4):513-8
42. Johnson L., Barnard J.J., Rodriguez L., et al. (1998) *Ethnic differences in testicular structure and spermatogenic potential may predispose testes of Asian men to a heightened sensitivity to steroidal contraceptives*, J Androl. 19(3):348-57
43. Mori H., Christensen A.K. (1980) *Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis*, J. Cell Biol. 84(2):340-54
44. Mori H., Shimizu D., Fukunishi R., et al. (1982) *Morphometric analysis of testicular Leydig cells in normal adult mice*, Anat Rec. 204(4):333-9

45. Hardy M.P., Mendis-Handagama S.M., Zirkin B.R., et al. (1987) *Photoperiodic variation of Leydig cell numbers in the testis of the golden hamster: a possible mechanism for their renewal during recrudescence*, J Exp Zool. 244(2):269-76
46. Hikim A.S., Bartke A., Russell L. (1988) *Morphometric Studies on Hamster Testes in Gonadally Active and Inactive States: Light Microscope Findings*, Biology of Reproduction 39, 1225-1237
47. O'Shaughnessy P.J., Johnston H., Willerton L., et al. (2002) *Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice*, J Cell Sci. 1;115(Pt 17):3491-6
48. Rothschild G., Sottas C.M., Kissel H., et al. (2003) *A role for kit receptor signaling in Leydig cell steroidogenesis*, Biol Reprod., 69(3):925-32
49. Petersen P.M., Pakkenberg B. (2000) *Stereological Quantitation of Leydig and Sertoli Cells in the Testis From Young and Old Man*, Image Anal. Stereol., 19:215-218
50. Petersen P.M., Giwercman A., Gundersen H.J., et al. (2000) *Efficient and Unbiased Tools for Quantitating Leydig and Sertoli Cells in the Testis From Testes Biopsies*, Image Anal. Stereol., 19:113-117
51. Lodrup A.B., Karstoft K., Dissing T.H. et al. (2008) *Kidney Biopsies Can Be Used for Estimations of Glomerular Number and Volume: A Pig Study*, Virchows Arch 452:393-403

A A R H U S U N I V E R S I T E T



**STEREOLOGY AND
ELECTRON MICROSCOPY
RESEARCH LABORATORY**

PhD student Murat Akosman has worked in our laboratory from 11 August to 28 November 2008.

He came to our laboratory to learn some stereological methods which had to be incorporated into his investigations for his PhD thesis.

During his stay Murat Akosman has made a project involving collection and fixation of testis from male rabbits. After the fixation he embedded the tissue in Agar and cut the blocks into slabs. By the use of Systematic Uniform Random Sampling (SURS) slab fractions were chosen.

One slab fraction was embedded in paraffin using the fractionator principle with subsampling thick histological sections were cut and sampled at a microtome. The number of Leydig cells was then estimated on a modified light microscope with specialised stereological software, i.e. CAST and NewCAST.

Another slab was cut into long bars, of which some bars were sampled and rotated randomly around the vertical axis on a bar rotator. The slices were embedded in paraffin and a thick central histological section was cut. After staining with modified Gemsa the vertical nucleator was used to estimate the individual volume of Leydig cells.

During his stay Murat Akosman has taken an internal course in Stereology under the PhD Research programme at the Faculty of Health Sciences, University of Aarhus.

We have been very satisfied with the work performed by Murat Akosman and we wish him good luck in finishing his PhD and in his future research.

**Jens R. Nyengaard
Professor**