

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AZOSPERMİK OLGULARDAN ALINAN TESE
DOKULARININ ULTRASTRÜKTÜREL İNCELENMESİ VE
NOS İZOFORMLARININ ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Biyolog Ayşe ALTUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ



İSTANBUL, 2013

**T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AZOSPERMİK OLGULARDAN ALINAN TESE
DOKULARININ ULTRASTRÜKTÜREL İNCELENMESİ VE
NOS İZOFORMLARININ ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Biyolog Ayşe ALTUN

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Canan HÜRDAĞ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL, 2013

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarda etik dışı hiçbir davranışımın olmadığını, tezimdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması sonucu elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlar için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ayşe ALTUN



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ	5
4.1.1. Testis Histolojisi	6
4.1.1.1. Testisi Saran Yapılar	6
4.1.1.2. Testislerin Yapısı ve Fonksiyonu	7
4.1.2. Seminifer Tubüller	8
4.1.2.1. Spermatogenik hücreler	9
4.1.2.2. Sertoli hücreleri	14
4.1.3. İnterstisyel Doku	16
4.1.3.1. Leydig hücreleri	16
4.1.4. Semen	17
4.1.4.1. Semen Analizinde Spermatozoanın Mikroskopik İncelenmesi	18
4.2. ERKEK İNFERTİLİTESİ	22
4.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)	25
4.4. NİTRİK OKSİT	26
4.4.1. Nitrik Oksit Sentezlenmesi	27
4.4.2. Nitrik Oksit İzofomları	28
4.5. NO ve SİKLİK NÜKLEOTİDLER:	
Bağlantı Dinamikleri ve Spermatogenezdeki Rolü	31
4.5.1. NOS/NO ile Bağlantı Dinamikleri	31
4.5.2. NOS/NO ile Testis	34

4.5.3.NOS/NO ve Spermatogenesisiz	35
4.6. NOS/NO VE BAĞLANTI DİNAMİKLERİNİN FERTİLİZASYONLA İLİŞKİSİ	35
5. MATERYAL VE YÖNTEM	37
5.1. HASTA GRUPLARI	37
5.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	37
5.3. IŞIK MİKROSKOBU PREPARASYONU	38
5.3.1. Histokimyasal Yöntem	38
5.3.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması	38
5.3.1.2. Masson'un Üçlü Boyaması	38
5.3.1.3. Toluidin Mavi Boyaması	39
5.3.2. İmmünohistokimyasal Yöntem	39
5.3.2.1. NO izoformlarını (iNOS, eNOS, nNOS) İmmünohistokimya Boyaması	40
5.3.2.2. ZO-1 İmmünohistokimya Boyaması	41
5.4. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) PREPARASYONU	42
5.5. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME	42
6. BULGULAR	43
6.1. IŞIK MİKROSKOBU BULGULARI	43
6.1.1. Histokimyasal Değerlendirilmesi	43
6.1.2. İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi	50
6.1.2.1. NO izoformlarının (iNOS, eNOS,nNOS) İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi	50
6.1.2.2. ZO-1 İmmünohistokimyasal Değerlendirilmesi	58
6.2. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) BULGULARI	62

7. TARTIŞMA	69
8. SONUÇ	74
9. TEŞEKKÜR	75
10. KAYNAKLAR	76



SİMGE VE KISALTMALAR

AB	Aralıklı Bağlantı
AEC	Amino Etil Karbazol
AGER	Agranüler Endoplazmik Retikulum
AMH	Anti-Mülleryen Hormon
ATP	AdenozinTrifosfat
Ca²⁺	Kalsiyum
CaM	Kalmodulin
cAMP	3'-5'-Siklik Adenozin Monofosfat
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
cm	Santimetre
CNG	Siklik Nükleotid-Kapılı İyon Kanalları
cNOS	Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EC	Endotelyal Hücreler
EDRF	Endotel Kökenli Gevşetici Faktör
EDTA	EtilendiaminTetraasetik Asit
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz, NOS-3
ERK	Ekstrasellular Sinyal-Regülasyonlu Kinaz
FAD	Flavin Adenin Dinükleotid
FMN	Flavin Mononükleotid
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GSK	Glukojen Sentez Kinaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
H-E	Hemotoksilen–Eozin
HnRNPL	Heterojen Nükleer Ribonükleoprotein
ICSI	İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IFN-γ	İnterferon Gamma
IL-1	İnterlökin 1

IL-2	İnterlökin 2
ILK	İntegrin Bağlantılı Kinaz
IUI	İntrauterin İnseminasyon (Aşılama)
IVF	<i>InVitro</i> Döllenme
iNOS	İndükleyen Nitrik Oksit Sentaz, NOS-2
JAMs	Tutundurucu Moleküller
JNK (SAPK)	Stres-Aktiveli Protein Kinaz,
KTB	Kan-Testis Bariyeri
LH	Lütein Yapıcı Hormon
LHRH	Lüteinleştirici Hormonu Salgılatan Hormon
LPS	Lipopolisakkarit
m	Metre
M	Molar
MAGI	Membranla İlişkili GuanilatKinaz
MAP	Mitojenle Aktive Olan Protein
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MEKK2	Mitojenle Aktive Olan Protein KinazKinaz2
MESA	Mikrocerrahi İle Sperm Aspirasyonu
MIF	Mülleryenİnhibe Edici Faktör
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MMP	Matriksmetallo proteinaz
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
nm	Nanometre
nNOS	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz,NOS-1
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O₂	Moleküler Oksijen
PAF	Trombosit Aktive Edici Faktör
PBS	Fosfat Tamponu
PDE	Siklik Guanozin Monofosfat Düzenleyici Fosfodiesteraz

PESA	Perkutan Epididimal Sperm Aspirasyonu
PHSS	Hızlı Hareketli Sperm Sayısı
PKG	ProteinKinaz G
ROS	Serbest Oksijen Radikalleri
SB	SıkıBağlantı
SSHS	Sadece Sertoli Hücre Sendromu
sGC	Çözülebilir Guanil Siklaz
Sperm (-)	Spermatozoa İçermeyen Grup
Sperm (+)	Spermatozoa İçeren Grup
TB	Tutucu Bağlantı
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TESA	Testiküler Sperm Aspirasyonu
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TGFβ3	Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta 3
TIMP-1	Doku Metalloproteinaz İnhibitörü-1
TNFα	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TnNOS	Testise Spesifik Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
ZnPP	Çinko Proto Porfirin
ZO-1	Zonula Okludens-1
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar

T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye Kamu Hastaneleri Kurumu, İstanbul İli Beyoğlu Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği, Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 18.12.2012 tarih ve 2012 / 133 numaralı karar ile onaylanmıştır.

Araştırma Projesi No: HE/1122012

1. ÖZET

Evli çiftlerde yaklaşık olarak %10-15 oranında infertilite görülmektedir ve bunların da yaklaşık %50'sini erkeğe bağlı nedenler oluşturmaktadır. Erkek infertilitesinin başlıca sebeplerinden biri, semende hiç sperm bulunmayan azospermi olgusudur.

Nitrik oksit sentaz (NOS) izoformlarının (eNOS, iNOS, nNOS) testis dokusu ve bileşenlerinde varlığının gösterilmiş olması dikkatleri nitrik oksit (NO)'in spermatogenez üzerine olan etkisine çekmiştir. NO'in sperm maturasyonu ve motilitesi üzerine de etkili olduğu belirlenmiştir. Ayrıca spermatogenik seri hücre döngüsünde, hücreler arası bağlantılardaki bozukluklar sperm üretimini engellemektedir.

Bu çalışmada; azospermi olgularından testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile testiküler doku elde edildi. Testis dokularının Hematoksilen-eozin (H-E), Masson'un üçlü boyaması tekniğini ve Toluidin mavisi kullanarak ışık mikroskobu düzeyinde genel morfolojisini inceledik. İmmunohistokimyasal olarak NOS izoformlarını ve sıkı bağlantı proteini olan zonula okludensi (ZO-1) gösterdik. Bununla bağlantılı olarak geçirimli elektron mikroskobu (TEM) düzeyinde ultrastrüktürel yapısını incelemeyi planladık. Bunun sonucunda elde ettiğimiz bulgulara göre NOS izoformları ile tubüler yapının etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Elde ettiğimiz bulgularda spermatozoa bulunmayan gruplarda seminifer tubül yapısının bozulduğu ve hiyalinize olduğu görüldü. eNOS reaksiyonunun spermatozoa bulunan gruplarda bulunmayanlara göre oldukça yüksek olduğu belirlendi. iNOS reaksiyonu spermatozoa bulunmayan gruplarda oldukça yüksek gözlenirken nNOS reaksiyonunda anlamlı bir fark bulunamadı. Spermatozoa bulunan grupta, kan-testis bariyerinde normal ZO-1 reaksiyonu gözlemlendi. Sadece Sertoli Hücre Sendromu (SSHS) olarak değerlendirdiğimiz spermatozoa bulunmayan grupta, ZO-1 reaksiyonu Sertoli hücrelerinin tüm yan yüzeyinde gözlemlendi. Elektron mikroskobu bulgularımız ışık mikroskobu bulgularını desteklemekteydi.

Bu bulgular Sertoli hücrelerindeki bozulmuş ZO-1 reaksiyonunun ve seminifer tubüllerdeki artmış iNOS reaksiyonunun, spermatogenezin zarar görmesindeki faktörlerden biri olabilir. Bu nedenle Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar spermatogenezinin önemli bir rolü olduğu kabul edilir.

2. SUMMARY

Infertility is usually seen 10-15% in married couples and about 50% of all these cases depend on male dysfunction. One of the main reasons of the male dysfunction is the azoospermia, found no sperm spermatozoa in semen.

Nitric oxide synthase (NOS) isoforms (eNOS, iNOS, nNOS) isoforms have pointed out the presence of testicular tissue the said components of nitric oxide (NO) has attached the effect on spermatogenesis. NO has also been proved to be effective on sperm maturation and motility. Furthermore with this series of spermatogenic cell cycle, the disorder between the cells inhibit the production of spermatozoa.

In this cases of azoospermia testicular tissue were obtained by testicular sperm extraction (TESE). We examined using Hematoxylin-eosin (H-E), Masson's trichrome technique and Toluidine blue along with light microscopy at the level of morphology. We showed NOS isoforms and the existence of tight junctions protein ZO-1 using immunohistochemistry.. In connection with transmission electron microscopy (TEM) findings we aimed to investigate the structure of the ultrastructural level and as a result to evaluate the effect of NOS isoforms with a tubular structure.

Through our findings in spermatozoa absent groups the structure of seminiferous tubules were deteriorated, degenerated and hyalinized. eNOS reaction in spermatozoa detected group was considerably higher than spermatozoa absent group. While in spermatozoa absent group iNOS reaction was quite high, nNOS reaction was no significant difference. It was observed that ZO-1 expression normal in blood-testis barrier. Sertoli cell-only syndrome (SCOS) we refer to as the spermatozoa absent group ZO-1 reaction was observed between lateral surfaces of all the Sertoli cells. The ultrastructural results were also supported with light microscopy findings.

These findings suggested that disturbance of ZO-1 reaction in Sertoli cells and increased of iNOS reaction in the seminiferous tubules might be one of the factors involved in the impairment of spermatogenesis. Therefore tight junctions among Sertoli cells are regard as having crucial roles in spermatogenesis.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde NOS'un memelilerde seksüel ve üreme fonksiyonlarını düzenlediği ve NO'in penil ereksiyonu, mesane ve uterus kaslarının gevşemesini sağladığı ortaya koyulmuştur (1). Oksidatif stres, oksijen ve oksijen kaynaklı oksidanların serbest oksijen radikallerini (ROS) arttırmasıyla başlayan bir durumdur. Oksidatif stresin infertilitedeki rolü, üreme organlarındaki antioksidanlara karşı olan etki mekanizmalarının bilinmesi, tedavi edici potansiyel taşımaktadır (2). Serbest oksijen radikallerinden NO'in erkek üreme sisteminde birçok fonksiyonun kontrolünde düzenleyici görevi olduğu bulunmuştur (3). Vücutta birçok hücreden (endotel, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve makrofajlar) NO salınabilmektedir. NO, endojen L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenir. Üç farklı NOS formu vardır; nöronal (nNOS veya NOS-1), indüklenebilir (iNOS veya NOS-2) ve endotelyal (eNOS veya NOS-3) (4). NOS izoenzimleri, üreme sisteminde varolan NO biyosentezi için gereklidir (5). Artmış NO'in mitokondriyal respirasyonu ve Adenozin Tri Fosfat (ATP) sentezini inhibe ederek semen konsantrasyonunu azalttığı gösterilmiştir. NO, hücrelerdeki ATP sentezini inhibe ederek ATP seviyesini azaltır (5). ATP üretiminin azalması ile enerji eksikliği meydana gelir ve enerjinin %90'ı ATP'den sağlandığı için sperm motilitesi bozulmaktadır. NO düzeyindeki artış ve diğer oksidan ajanların testiküler distrese bağlı değişimlere yol açtığı ve bu değişimlerin histopatolojik dejenerasyona neden olduğu ileri sürülmüştür.(6)

Testiste bulunan NO ve NOS'un spermatogenez ile ilişkili olarak hücrel sinyalleşme, inflamasyon, sperm olgunlaşmasında ve bağlantı dinamikleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (7). Son çalışmalar göstermiştir ki; kan-testis bariyeri (KTB) arasında sıkı bağlantılar (SB) üç sınıftan oluşmuştur. Bu membran proteinleri; okludin, klaudin ve tutundurucu moleküller (JAMs) olarak bilinmektedir. Örneğin, okludin, klaudin ya da tutundurucu moleküller zonula okludinler (ZO-1) ile etkileşerek kompleks oluşturmaktadır. Son veriler göstermiştir ki; bazı büyüme faktörleri (ör;TGF β 3 (Dönüştürücü büyüme faktörü beta 3), TNF α (Tümör nekroz faktör alfa), diğer düzenleyiciler cAMP (3'-5'-Siklik Adenozin Monofosfat)ve NO/NOS, testiste sıkı bağlantıların (SB) düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Yeni yapılan çalışmalar, NOS'un çok önemli bir geçirgenlik düzenleyici olduğunu göstermiştir (8).

Testiküler dokularda NO üretiminin ve NOS izoformlarının ekspresyonunun olduğu ortaya koyulmuştur. Çalışmamızda semen örneğinde hiç sperm bulunmayan ve testis biyopsi işlemine alınan infertil erkeklerden TESE ile alınan testis dokularında spermatozoa bulunan ve bulunmayan gruplarda H-E ve Masson'un üçlü boyama tekniğini uygulayarak morfolojisini incelemeyi, immunohistokimyasal olarak NOS izoformlarını (eNOS, iNOS, nNOS) ve ZO-1 sıkı bağlantı proteinini göstermeyi ve elektron mikroskobu düzeyinde ultrastrüktürünü incelemeyi ve bunun sonucunda NOS izoformları, sıkı bağlantı yapısı ve testis ince yapısı arasındaki korelasyonu irdelemeyi amaçladık.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ

Erkek üreme sistemi;

1) Haploid erkek gametin (spermatozoa) devamlı üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından,

2) Erkek seks hormonlarının sentezi ve sekresyonundan sorumludur.

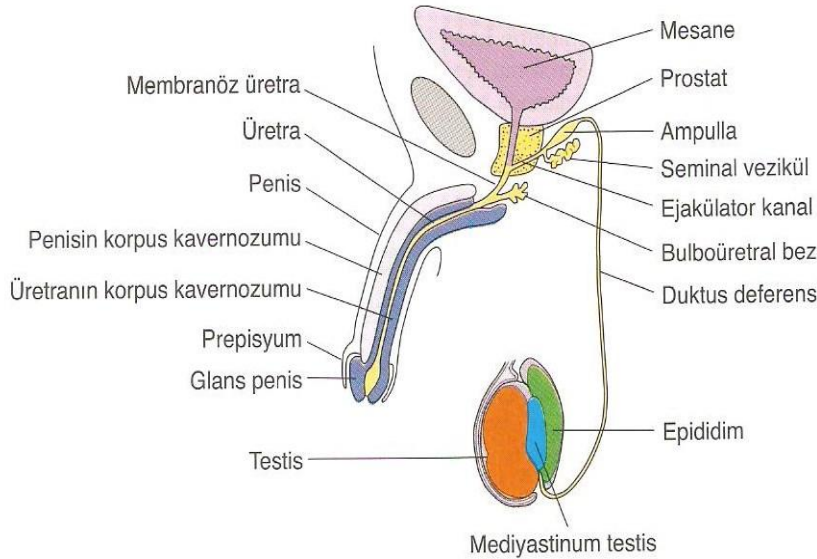
Erkek üreme sistemi 4 birimden oluşur;

1) Sperm üreten ve sentezleyen ve androjenleri salgılayan testisler,

2) Dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu olan dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, vaz deferens, ejakülatuar kanal ve erkek üretrasının bir parçası,

3) Salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoaya besinler sağlayan aksesuar bezler; seminal vezikül, prostat bezi ve bulboüretal bezler,

4) Erektile dokudan oluşan çiftleşme organı penis (Şekil 1) (9).



Şekil 1: Erkek genital sisteminin bileşenleri (10).

4.1.1. Testis Histolojisi

Testisler karın boşluğunun dışında, skrotum içinde yer alan çift organlardır. Testisler, skrotum denilen deri ile örtülü olan fibromüsküler yapıda bir kese içinde funikulus spermatikus (spermatik kordon) ile asılı olarak bulunur. Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2-3°C düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34°C ile 35°C ısı gereklidir (11).

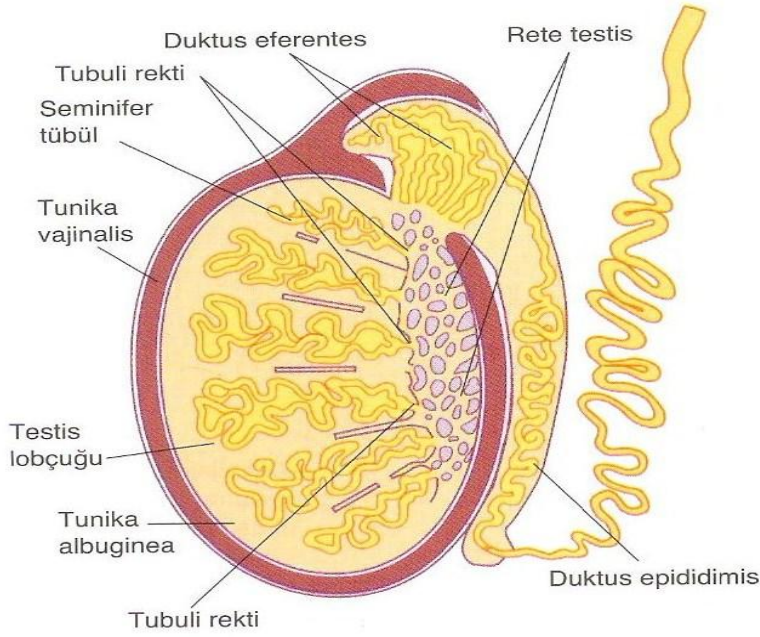
4.1.1.1. Testisi Saran Yapılar

Skrotum: Bol melanin pigmenti içerdiğinden kahverengi renkli, çok ince bir deriye sahiptir. Özel bir kokusu olan yağ bezleri ve bol ter bezi içerir. Sinir sonlanmasından zengin olup deri altında yağ dokusu bulunmaz. Dolayısıyla ısı kaybı için uygun bir yapısı vardır. Deri ile muskulus dartos (ince bir düz kas tabakası) arasında ince bir bağ dokusu (tunica dartos) bulunur.

Testiküler Kapsül: Skrotum ile testis arasında iki tabakalı bir kapsül bulunur. Bu tabakalar şunlardır:

1-Tunika Vaginalis: İki yapraklı periton zarıdır. Epiteli tek sıra mezotel hücrelerinden oluşur. Visseral yaprak tunika albuginea'ya yapışır, pariyetal yaprak ise skrotumun iç yüzüne tutunur. Bu iki yaprak arasındaki boşluk pelvis boşluğu ile ilişkidir. Testislerin skrotuma inmesi bu yolla gerçekleşir. Fakat testislerin inişinden kısa süre sonra bağlantı yeri kapanır.

2-Tunika Albuginea: En belirgin tabakadır, kalın fibro-elastik bağ doku arasında düz kas lifleri bulunur. Testis içinde tubüllerin arasını da doldurur. Tunika albuginea'nın altında damardan zengin tunika vaskuloza adlı gevşek bağ dokusu bulunur. Tunika vaskuloza, tunika albuginea'nın testis içine olan uzantılarının (septumların) iç yüzünü de örter. Bütün lobu saran pariyetal yaprağın dışında çizgili bir kas olan muskulus kremaster bulunur. Testiküler kapsül periyodik kasılmalar yapan dinamik bir membrandır. Ayrıca yarı geçirgen olduğundan testis fizyolojisinde önem taşır (Şekil 2).



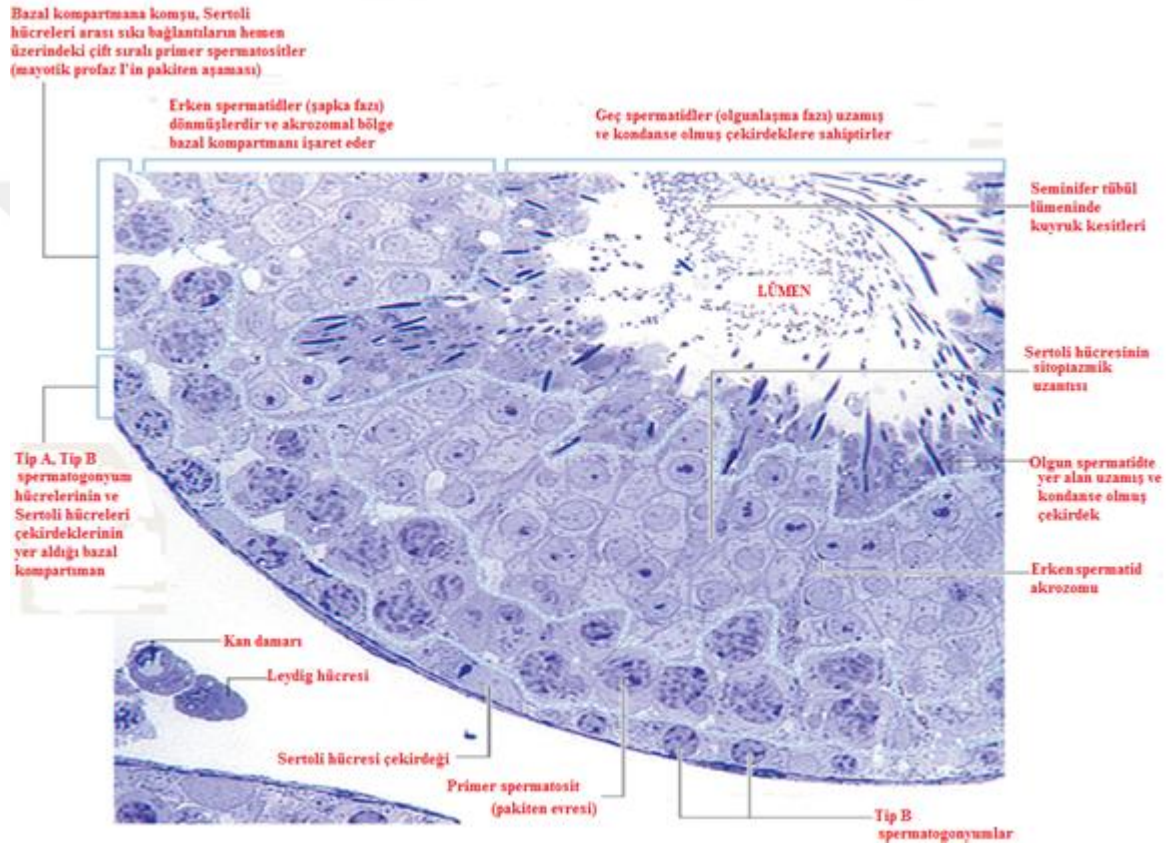
Şekil 2: Testisi saran yapılar (10).

4.1.1.2. Testisin Yapısı ve Fonksiyonu

Testis, ekzokrin ve endokrin fonksiyonu olan, bileşik tubüler yapıda bir çift bezdir. Ekzokrin salgısı, canlı spermium hücreleridir. Salgılama biçimi aktif holokrindir. Endokrin salgısı, Leydig hücreleri tarafından yapılan testosteron hormonu, intrauterin hayatta Sertoli hücreleri tarafından salgılanan anti-Müllerian hormon (AMH=MIF) ve yine Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin'dir. Tunika albuginea, testisin arka yüzü boyunca kalınlaşır ve mediastinum testis adını alır. Mediastinum testisten bez içine giren ışınal seyirli ince bağ dokusu septumları organı 200-300 kadar piramit biçimli lobüle ayırır. Ortadaki lobüller daha büyük ve uzundur. Lobüllerin tepe kısımları mediastinuma doğrudur. Her lobülde 1-4 adet aşırı kıvrımlı seminifer tubül bulunur. Lobülün tepesine doğru tubüller düzleşir ve tubuli rekti (rekti=düz) denen boşaltıcı tubüllerin ilk bölümünü oluşturur.

Tubüllerin arasını dolduran gevşek bağ dokusu interstisyum olarak adlandırılır; bu bağ dokusu tunika vaskülozadan köken alır ve bezin stromasını oluşturur. Her bir tubül yaklaşık 50 cm boyunda (30-70 cm arasında) ve 150-250 µm çapındadır. Toplam tubül

uzunluğu 250 m'ye kadar ulaşır. Tubüllerin epiteli germinal epitel olarak adlandırılır ve modifiye çok katlı kübik epitelidir. Tubüllerin bazal membranı elastik fibrilden zengin olup yaşlandıkça yoğunlaşır ve kalınlaşır. Bazal membranın hemen dışında, fibroblastları ve miyoid hücreleri (kasılabilen hücreler) içeren peritubüler fibröz, tunika propria bulunur. Peritubüler dokunun dış kısmında geniş lenfatik kılcal damarlar bulunmaktadır. Erkek kaynaklı kısırlık vakalarının çoğunda peritubüler dokunun kalınlaştığı bilinmektedir (12) (Şekil 3).



Şekil 3: Testisin ışık mikroskopik kesiti (9).

4.1.2. Seminifer Tubüller

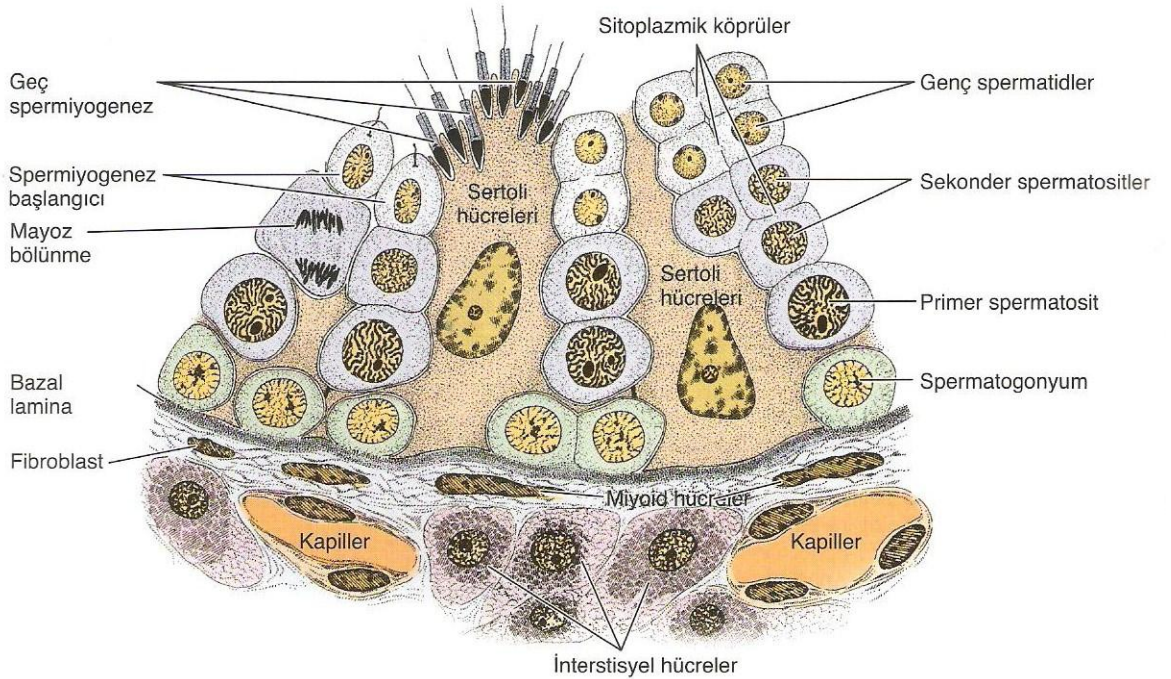
Seminifer epitelde bazal lamina üzerine oturan iki grup hücre vardır:

1. Spermatojenik hücreler
2. Sertoli hücreleri

4.1.2.1. Spermatojenik hücreler

Bazal lamina ile lümen arasında 4–8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Spermatojenyum'lardan spermatozoa'lar oluşana kadar görülen hücre tipleridir.

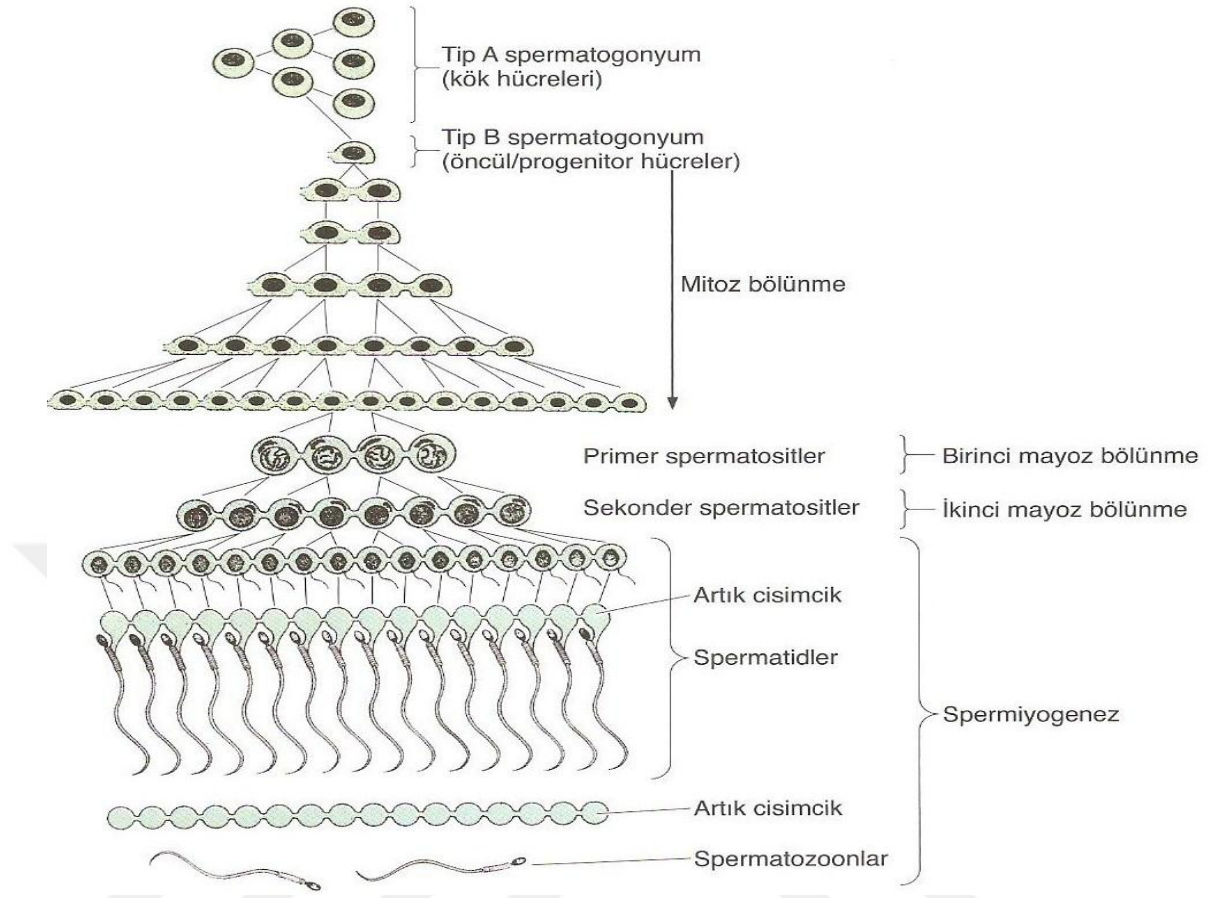
Fötal gelişimin ortalama 12–20. haftalarında fötal testiste Leydig hücreleri işlev görmeye başlar ve testosteron salgılar. Bu olay fetüsün erkek cinsiyeti yönünde farklılaşabilmesi ve erkek bireye özgü organ ve kanalların gelişebilmesi için gereklidir. Bununla birlikte fötal yaşamın 20. haftasından doğuma kadar olan evrelerinde ve doğumdan sonra puberteye kadar olan post-natal dönemde hormon salgısı olmaz. Böylece seminifer tubüller puberteye kadar kapalı kalırlar ve herhangi bir değişikliğe uğramazlar. Puberteye doğru seminifer tubüllerin lümenleri açılır ve bunun ardından primordiyal germ hücreleri de spermatojenyumlara dönüşürler. Spermatojenyumlar öncelikle A ve B tipi spermatojenyumlara ayrılırlar.



Şekil 4: Seminifer tubül duvarında spermatojenik hücreler ile Sertoli hücrelerinin yerleşimi (10).

A tipi spermatogonyumlar sürekli mitoz ile çoğalan oval çekirdekli hücrelerdir. A tipinin koyu ve açık olmak üzere iki alt tipi vardır. Koyu A tipi spermatogonyumlar, oval heterokromatik çekirdeğe sahip hücrelerdir. Bu hücreler depo hücrelerdir ve koyu A tipi ve açık A tipi hücreleri oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Açık A tipi spermatogonyumların çekirdekleri soluk boyanır ve çekirdekçik belirgin olarak izlenebilir. Bu hücreler testosteronun etkisiyle 4 defa mitoz bölünmeye girer ve bu bölünmeler sonucunda açık A tipi spermatogonyumlardan A1, A2, A3, A4 oluşur. Açık A tipi spermatogonyumlar sonra ara bir spermatogonyum oluşturup B tipi spermatogonyuma farklırlar. Spermatogonyumlar tubül duvarlarını döşeyen germinal epitelin en bazalinde yerleşen ve bazal laminaya direkt temas eden hücrelerdir. Koyu A tipi spermatogonyumların bölünmesiyle oluşan açık A tipi spermatogonyumlar birbirine sitoplazmik köprülerle bağlı kalır ve bunlardan oluşacak olan diğer bütün spermatogenik seriye ait hücreler de birbirlerine hep sitoplazmik köprülerle bağlı halde bulunurlar; böylece aynı ata hücreden gelişen kardeş hücreler belirlenebilir. Birkaç bölünmeden sonra açık A tipi spermatogonyumlar, B tipi spermatogonyumlara, onlar da birkaç mitoz bölünme geçirdikten sonra primer spermatositlere farklılaşırlar. B tipi spermatogonyumlar yoğun kromatine sahip yuvarlak bir çekirdek içermektedirler ve spermatogonyal fazın son basamağını oluştururlar. Primer spermatositler (46, 2n) seminifer tubülün adluminal kompartımanında yani Sertoli hücrelerinin birbirleriyle yaptıkları zonula okludenslerin hemen üzerindeki kısımda bulunurlar ve tubül duvarının en büyük hücreleridir. Primer spermatositler tubül duvarının daha orta bölümlerine göç ederken kendi DNA'larını eşleyerek 46 kromozomlu 4n DNA içerirler. Böylece 1. mayozun profaz evresi başlar (46, 4n). Bu evre ortalama 20–22 gün sürer. Bu aşama sonucunda 2 adet sekonder spermatosit oluşur (23, 2n). Bundan sonra 2. mayoz bölünme başlar ve sonuçta 23 kromozomlu n miktarda DNA içerikli spermatid hücreleri oluşur (23, n). Spermatidler spermiyogenez aşaması ile şekil değiştirerek spermatozoa denen olgun erkek cins hücresine dönüşürler. Bu gelişme basamaklarında sekonder spermatositler primer spermatositlerin yarısı kadar, spermatidler de sekonder spermatositlerin yarısı kadar büyüklüktedir (Şekil 4, 5).

Spermiyogenez: Spermatidlerin bir dizi değişim geçirmeleri sonucu spermiyum hücrelerine dönüşme olayıdır. Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma katlantılarında gerçekleşir.



Şekil 5: Spermatogenez ve spermiyogenez evreleri (10).

Spermiyogenez olayı başlıca 5 başlık altında incelenebilir:

1-Golgi evresi: Bu evrede Golgi kompleksinden şekillenen ve akrozomun öncülü olarak kabul edilen küçük salgı granülleri oluşur. Sonra bu granüller birleşerek tek ve büyük bir granüle dönüşür. Membranla çevrili bu yapıya akrozomal vezikül denir. Bu akrozomal vezikül çekirdeğin önünde yer alır ve çekirdek zarını örter. Çekirdek yüzeyinde giderek büyüyerek çekirdeğin ön yarısını kaplar ve akrozomal kep adını alır. Akrozom içinde eritici enzimler vardır. Bu nedenle akrozoma, özel tip lizozom da denir. Akrozom enzimleri (akrozin, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit-fosfataz, proteaz, asit-peptidaz vs.) sayesinde spermiumlar yumurta hücrelerinin çevresindeki korona radiata ve zona pellusida'dan geçerek yumurta hücresi içerisine girebilirler.

2-Sentriyollerin yer değiştirmesi ve kuyruk oluşumu: Çekirdeğin ön kutbunda akrozom oluşurken arka kutupta da sentriyoller yerleşir. Bu sentriyollerden çekirdeğe yakın olana proksimal sentriyol (noduli anterior) adı verilir. Proksimal sentriyolden

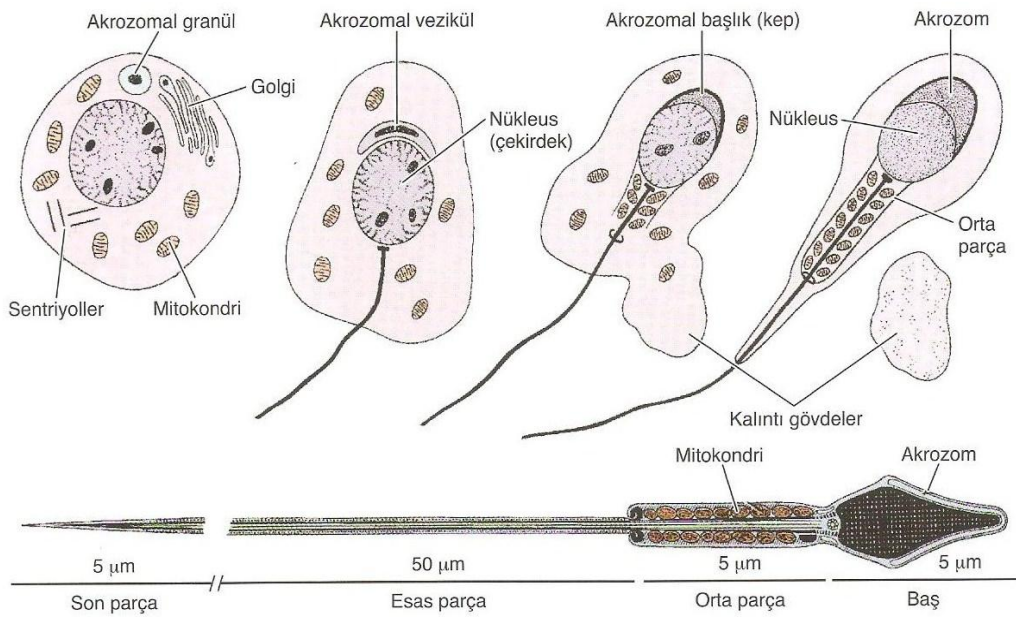
kuyruğun eksen fibrilleri (filum aksiyale) gelişir. Kuyruk uzadıkça etrafını çevreleyen fibrilden bir kılıf oluşur (dış fibriller). Bu kılıf, dış fibriller kuyruk tarafındaki distal sentriyol (noduli posterior) hizasından başlar ve kuyruk boyunca ilerler.

3-Sitoplazmik kayıp: Sitoplazmanın bir kısmı kuyruk ucuna doğru kayarak kuyruğu kuşatır. Geri kalanı boğumlanarak kopar ve artık cisim olarak Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler.

4-Mitokondriyumların göçü: Mitokondriyumlar kuyruğun orta parçasında proksimal sentriyol ile distal sentriyol arasında spiral oluşturacak şekilde yerleşirler ve böylece kuyruğun ilk bölümü mitokondriyal bir kılıf ile kuşatılır. Kuyruğun hareketi için gerekli enerjiyi mitokondriyumlar sağlar. Kuyruk hareketi ile mikrotübüller arasındaki karşılıklı ilişki, ATP miktarı ve dinein denilen protein ile sağlanır.

5-Nukleustaki değişiklikler: Nukleus kromatini yoğunlaştırır, çapı küçülür badem biçimini alır. Nukleus, akrozom ve çevresindeki çok az sitoplazma ile birlikte spermiyumun başını yapar. Bu şekilde oluşan spermiyumlar morfolojik olarak olgundur ama fonksiyonel değildir. Hareketsiz olup, dölleme yetenekleri sınırlıdır (Şekil 6).

Olgunlaşmanın son adımı olan kapasitasyon, ejakülasyondan sonra ve döllemeden önce spermiyumlarda görülen bir dizi enzimatik değişikliktir; kadın genital yollarında gerçekleşir.



Şekil 6: Spermatidin spermiyuma farklılaşma aşamaları (10).

Olgun spermium:

50–60 µm uzunluğunda hareketli bir hücredir. Spermium baş, boyun, orta parça ve kuyruk olmak üzere 4 bölümden oluşur.

1-Baş: Yassı oval biçimdedir. Yoğun kromatinli bir çekirdek, çekirdeğin üzerinde onu kep gibi saran akrozom ile bu ikisini kuşatan çok az sitoplazma içerir ve en dıştan hücre zarı ile çevrilidir.

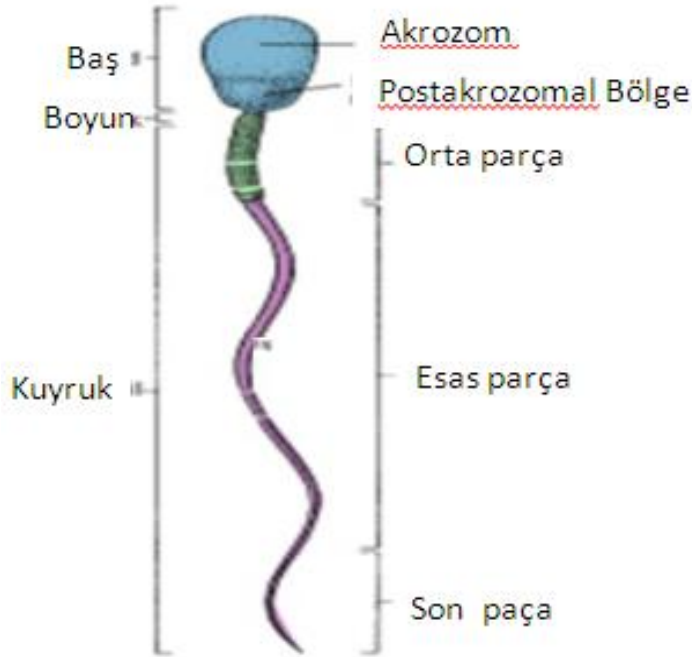
2-Boyun: Spermiumun baş ile kuyruk orta parçasını bağlayan kısa bir bölümdür. Hemen çekirdeğin altında yer alan transvers yerleşimli proksimal sentriyol ve bundan çıkan filum aksiyale bulunur (filum aksiyale= 9+2 düzeninde mikrotübül sistemi).

3-Orta parça: Bu bölümde spiral yerleşimli mitokondriyonlar bulunur alt tarafta distal sentriyol ile sonlanır.

4-Kuyruk: İki bölümdür:

- a) Esas parça,
- b) Son parça

Kuyruk ortada filum aksiyale, çevresinde kaba longitudinal seyirli dış fibrillerden ve her ikisini dıştan kuşatan fibröz bir kılıftan oluşur. Son parçaya doğru kuyruğu oluşturan bu yapılar yoğunluk yönünden giderek azalır ve son kısımda sadece mikrotübüller kalır (12) (Şekil 7).



Şekil 7: Olgun bir spermiumun yapısı (12).

4.1.2.2. Sertoli Hücreleri

Spermatogenik hücre serileri arasında yer alırlar. Çok sayıda agranüler endoplazmik retikulum ve iyi gelişmiş granüler endoplazmik retikulum, bol mitokondriyum, iyi gelişmiş Golgi ve değişik miktarlarda mikrotübüller, lizozomlar, lipid damlacıkları, veziküller, glikojen granülleri ve filamentler içerirler. Nukleus çoğu kez üçgen şeklinde uzamıştır. Belirgin bir nukleolus ve az miktarda heterokromatin içerir. Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantılarla (zonula okludens) bağlanmıştır. Böylece tubül dışından lümen içine makromoleküllerin geçişi önlenmiştir (Şekil 8).

Bu bağlantılar tubül çevresindeki doku ile birlikte kan-testis bariyerinin temelini oluşturur. Bu bariyer sadece antijenlerin değil, antikörlerin de geçişini önlediğinden, serumlarında yüksek düzeyde sperme karşı antikor bulunanlar da bile spermatogenik hücrelerde yıkım görülmez. Sertoli hücrelerinde ayrıca hücreler arası iyonik ve kimyasal madde alış verişine imkân sağlayan oluklu bağlantı (gap-junction, neksus) şeklinde bağlantılar vardır. Spermatogenik seriye ait hücreler, Sertoli hücrelerinin yan ve apikal duvarındaki derin kovuklara yerleşmişlerdir. Sertoli hücreleri olgun testiste (üreme periyodu boyunca) bölünmezler. Isı, radyasyon, toksik madde, enfeksiyon, beslenme yetersizliği gibi bir çok olumsuz etkene çok dayanıklıdırlar. Uzun ömürlü olduklarından sitoplazmalarında lipofuksin pigment granüllerine de sıklıkla rastlanır. Sertoli hücreleri içerisinde, bu hücrelere özgü Charcot Böttcher kristalleri denen inklüzyonlar vardır. Uzun filamentlerden oluşan bu inklüzyonların fonksiyonları ve önemi bilinmemektedir.

Sertoli hücrelerinin genel fonksiyonları şunlardır:

- 1. Destek;** Gelişmekte olan spermatozoonları destekler, korur ve beslenmesini düzenlerler. Bu fonksiyonlarından dolayı Sertoli hücrelerine hemşire hücre de denir. Ayrıca spermlerin oto-immun reaksiyonlardan korunmasında da önemleri vardır.
- 2. Fagositoz;** Spermatisit sitoplazmasının dökülen kısımlarını fagosite ederler.
- 3. Salgilama;** Sertoli hücrelerinin hem endokrin hem ekzokrin salgıları vardır. Lümene boşalan devamlı bir salgısı spermin ilerleyişini kolaylaştırır. Sertoli hücresi başlıca 4 madde salgılar:

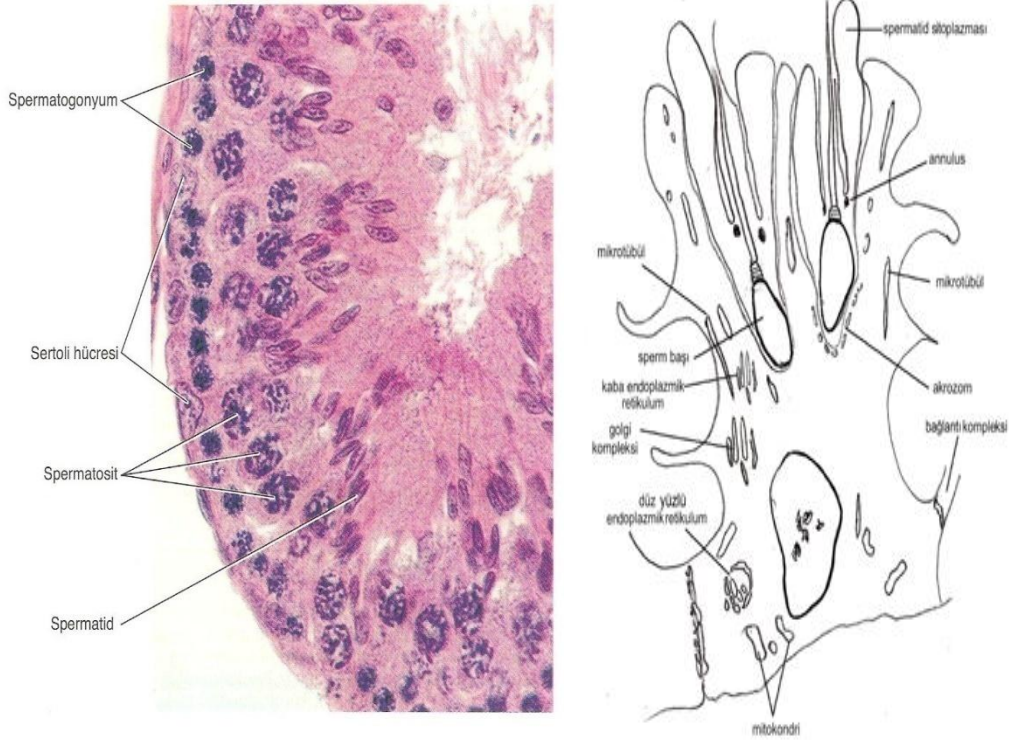
a) **Androjen bağlayan protein:** FSH etkisiyle salgılanır. Testosteronu kendisine bağlayarak seminifer epitelde spermatogenez için gerekli olan testosteron miktarını ayarlar. Bu hormon seminifer tubülün lümen sıvısına karışır. Böylece spermin geçtiği genital yollar olan duktus efferentes ve duktus epididimis de testosterondan yararlanır.

b) **Steroid olmayan faktör (inhibin):** Hipofizden FSH üretimini baskılayarak spermatogeneze girecek olan spermatogonyumların sayısının ayarlanmasına katkıda bulunur.

c) **Steroid olmayan anti-Müllerian hormon:** Embriyonal dönemde erkek fetüste salgılanarak Müller kanalının gerilemesi ve mezonefroz kanalın gelişmesi doğrultusunda etki eder.

d) **Luteinleştirici hormonu salgılatan hormona benzeyen peptit (LHRH-like peptit):** Leydig hücrelerinin salgılama fonksiyonunu düzenler.

4. **Hareket;** Filament ve mikrotübüller yardımıyla spermatogonik hücrelerin lümene salınmasını sağlar (10).



Şekil 8: Sertoli hücrenin yapısı (10,12).

4.1.3 İnterstisyel Doku

Seminifer tubüllerin arasını dolduran bağ dokusudur. Bu doku içerisinde pencereci tip kapillerlerin yanı sıra, fibroblast, makrofaj, mast hücreleri ve farklılaşmamış mezenkimal hücreler bulunur. Puberte ile birlikte bu hücrelere Leydig (interstisyel hücre) hücreleri de eklenir (10) (Şekil 9).

4.1.3.1. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri, testis hacminin %3'ünü oluşturur. Özellikle kan damarlarının etrafında tek tek ya da gruplar halinde bulunurlar. Erken fetal hayatta sayıları fazladır. Plasenta kökenli gonadotropinlerin etkisiyle testosteron hormonu üretirler. Bu hormon fetüsün erkek genital organlarının embriyolojik farklılaşmasında etkindir. Leydig hücreleri, gebeliğin 5. ayından sonra dejenerasyona uğramaya başlarlar ve sayıları gittikçe azalır. Böylece testosteron düzeyi de gittikçe düşer. Doğumdan sonra bu hücreleri uyaran plasenta ortadan kalktığından tamamen dinlenmeye çekilirler. Pubertede hipofizden salgılanan LH etkisiyle hücreler tekrar aktifleşir.

Leydig hücreleri, büyük ovoid ya da poligonal şekilli ve asidofil hücrelerdir. Tipik lipid damlacıkları taşırlar. İyi gelişmiş Golgi aygıtı ve çok sayıda mitokondriyon içerirler. İyi gelişmiş agranüler endoplazmik retikulum'a (AGER; steroid sentezleyen organel) sahip olan bu hücreler, çubuk biçimli Reinke kristalleri bulundurur. Bu kristallerin fonksiyonları tam olarak açıklanamamıştır.

Leydig hücrelerinin salgılamış olduğu testosteron (androjen) erkeklerde sekonder seks karakterlerinin oluşmasından da sorumludur.

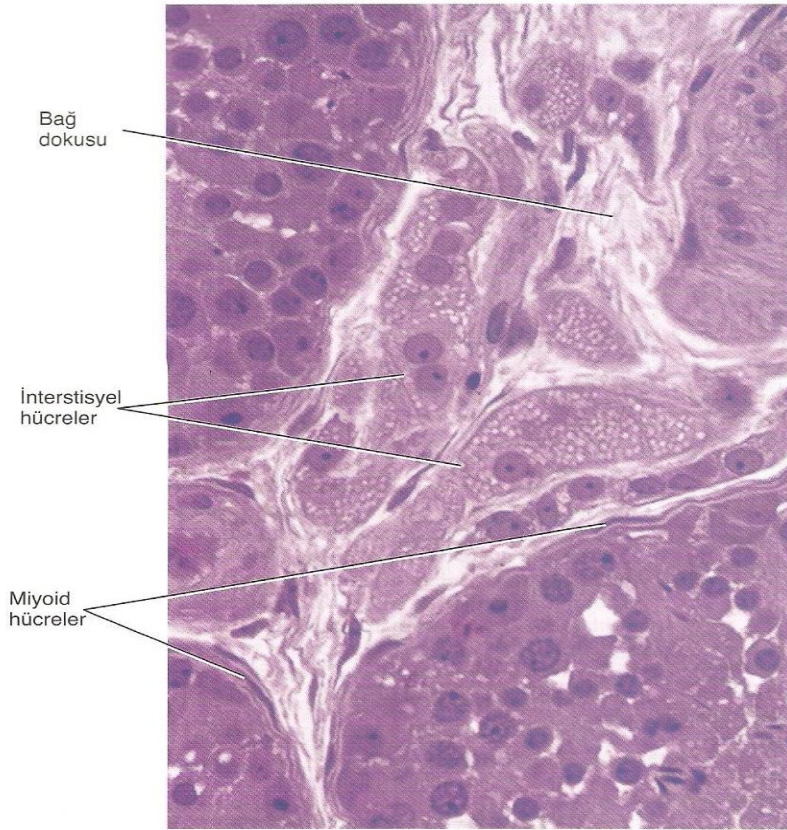
Spermatogenik hücreler yüksek ısıya dayanıksızdır. Bu hücreler için ideal ısı 35°C'dir. Bu düşük ısı düzeylerinin sağlanması birkaç mekanizma ile kontrol edilir:

1) Terleme ile ısı kaybedilir.

2) Zengin bir venöz pleksus, testiküler arterlerin etrafını sararak normal kan dolaşımına karşı bir ısı akımı sağlar.

3) Testisler sıcakta vücuttan uzak tutulur ve soğukta yukarı çekilir. Testiste yaşa bağlı olarak bazı değişiklikler olur. Şöyle ki; otuz beş yaşından sonra atrofik tubüller ortaya çıkmaya başlar, çok ileri yaşlarda spermatogenetik hücreler tamamen tükenir.

Kriptorşidizmde (inmemiş testis) spermatogenez vücut ısısı ile baskılanır, ancak Leydig hücreleri ısıya dayanıklıdır. Bu yüzden kısırlık vakalarının % 90'ında sperm üretimi bozulmasına rağmen sekonder seks karakterleri ve libido normaldir. Kötü beslenme, alkolizm, radyasyon, kadmiyum tuzları ve bazı ilaçlar spermatogenez hücrelerine toksik etki ederek kısırlığa yol açabilir. Zararlı etken ortadan kalkınca seminifer epitel geri kalan spermatogonyumlardan rejenere olabilir (12).



Şekil 9: İnterstisyel hücrelerin yapısı (10)

4.1.3. Semen

Semen sıvısı, spermatozoanın testis ve epididimis salgısının, ejakülasyon sırasında prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezlerin salgılarının birleşmesiyle oluşur. Sonuç olarak, oluşan viskozitesi yüksek salgı semen adını alır. Bu salgıda spermatozoa, semen sıvısının %5'ini oluşturur (13).

İnsanda ejakülat miktarı kişisel farklılıklar göstermekle birlikte 2-6 ml. kadardır. Semen pH'sı 7.2-8.0 arasında değişkenlik gösterir ve diğer pek çok memeliden farklı olarak insan semeni ejakülasyonun hemen sonrasında kuagüle olur ve yaklaşık 20 dakika içinde yeniden çözülerek likefiye olur (13,14).

4.1.4.1. Semen Analizinde Spermatozoanın Mikroskopik İncelenmesi

Olgun bir sperm, başlıca baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşur. Sperm başı ortalama 4-5 µm uzunlukta, 2,5-3,5 µm genişliğindedir. Başın büyük bir kısmını çekirdek oluşturur. Kromatin yoğunlaşır ve hacim olarak küçülür. Çekirdeğin 2/3'lük ön kısmını akrozom oluşturur. Akrozom başlık biçiminde olup zar ile sarılı bir organeldir. Kaudalinde hücre zarı ile çekirdek zarı arasında özelleşmiş postakrozom denilen, hücre zarına sıkıca yapışmış bir bant bulunur (14). Döllenme sırasında spermi saran hücre zarı, sekonder oositin hücre zarı ile bu postakrozom bölgesinden birleşerek erir ve spermin oosit sitoplazması içerisine geçişi sağlanır (15). Spermin boyun kısmı kısa bir parça olup bağlantıyı sağlamaya yönelik segmentli kolonlardan ve proksimal sentriyolden oluşur. Orta parça ise sperm hareketini sağlamak üzere gerekli enerjiyi sağlayan mitokondrileri barındırır. Kuyruk kısmı ise sperme diklik veren fibröz tabaka ve spermin hareketliliğini sağlayan aksonem tabakasından oluşur (14).

a) Konsantrasyon

Ejakülatta bulunan sperm sayısı, likefaksiyonunu tamamlamış örnekte iki yöntemle değerlendirilir.

- 1)Spermilerin hepsi immobilize edilerek sayım yapılır ya da
- 2)Hareketli ve hareketsiz spermeler birlikte değerlendirilir.

Sperm sayımı için hemositometre, microcell, CellVU, StandartCount, Makler gibi çeşitli sayım kamaraları tanımlanmış olmakla birlikte günümüzde yaygın olarak Makler sayım kamarası kullanılmaktadır. Makler kamara ile yapılan değerlendirmede iyi sonuç alınması için kamaraya konulan ejakülat miktarının 10 µl'yi geçmemesi, kamaranın üst kısmı kapatıldığında 4 nokta şeklinde inkübatörlerde gökkuşağının görülmesi, kamaranın analiz öncesinde 37°C'de ya da oda ısısında olması gerekir. Sağlıklı sonuç alabilmek için

100 karelik alan içerisinde en az on karede sayım yapılır ve on karede saptanan sayı milyon/ml olarak ifade edilir (16).

b) Motilite

Sperm sayımı yapılırken, sperm hareketleri 4 sınıfa ayrılır.

a) +4 hareketli spermatozoolar; lineer bir şekilde ileri yönde hızlı hareket ederler,

b) +3 hareketli spermatozoolar; ileri yönde daha yavaş harekete sahiptirler,

c) +2 hareketli spermatozoolar; oldukları yerde hareket ederler,

d) +1 hareketli spermatozoolar da immotil spermatozoolardır. Motilite hareketlilik anlamına gelmekte olup +4, +3 ve +2 hareketli spermatozooların toplam oranıdır. Hızlı hareketli sperm sayısı (PHSS) sadece +4 ve +3 hareketli spermatozooların oranıdır (13).

c) Morfoloji

Bir sperm hücrenin normal olarak kabul edilebilmesi için sperm başı, boynu (orta parça), ve kuyruğu normal olmalıdır (17).

	Kruger'in normal biçimler için tayin ettiği değerler:	Dünya Sağlık Teşkilatının normal biçimler için tayin ettiği değerler
Baş	Düzgün, oval biçimli Uzunluk: 5-6 µm Çap: 2.5-3.5 µm Akrozom: mutlaka sperm başının % 40-70 kadarını oluşturmali	Oval, düzgün biçimli Yuvarlak, armut şeklinde, iğne, çift ve şekilsiz başlar daimi anormal olarak değerlendirilir
Orta parça	İnce ve güzel hatlı, 1 µm genişliğinde ve yaklaşık olarak baş uzunluğunun 1.5 katında olmalı ve hiç bir sitoplazmik artık bulundurmamalı.	Düz, kuyruktan hafifçe kalın olmalı.
Kuyruk	Tek, kıvrılmamış, düzgün, 45 µm uzunluğunda olmalı.	Tek, kıvrılmamış, düz, bükülmemiş olmalı.

Tablo 1: Sperm morfolojisinin Kruger ve WHO'a göre karşılaştırılması (17).

c) Morfolojik Bozuklukların İnfertiliteye Etkisi

Normal ve normale yakın morfolojiye sahip sperm hücrelerinin seçilmesi, infertilite tedavisinde son derece önemlidir. Örneğin; akrozom, spermin oosite penetrasyonu için gerekli enzimleri içeren önemli bir bölge olduğundan, akrozom anomalileri, sperm zona pellusida bağlanmasında sorun yaratmaktadır (18). Nukleus anomalileri, DNA içerik bozukluğu anlamına gelmektedir. Bu da sağlıklı bir embriyo gelişimini engellemektedir (19, 20). Sitoplazmik artık, spermin olgunlaşmadığı anlamına gelmektedir (21). Globozoospermiya, akrozomu olmayan spermatozoiddir ve dölleme kabiliyeti yoktur (22). Orta parça, mitokondrilerin olduğu önemli bir kısımdır. Buradaki anomaliler, enerji desteğinin noksanlığına neden olmaktadır. Bu durum motiliteyi direkt etkilemektedir.

Spermin non-aksiyel orta parçaya sahip olması, progresif motilitesini düşürmektedir. Kuyruk, spermin hareketliliğini ve dikliğini sağlayan bölge olduğundan kuyruktaki anomaliler, sperm hareketini kısıtlayıcı etkiye sahiptir (23).

Akrozom: Sperm penetrasyonu

Nukleus: DNA içerik bozukluğu

Sitoplazmik artık: Sperm maturasyonu

Orta parça: Enerji noksanlığı

Kuyruk: Motilite düşüklüğü

Non-aksiyel: Motilite düşüklüğü

Globozoospermiya: Döllenme bozukluğu (13).

d) Terminoloji

Normospermi: ml'deki sperm sayısının 20 milyon/ml ve üzeri olmasıdır.

Oligospermi: ml'deki sperm sayısının 20 milyon/ml'den az olmasıdır.

Polispermi: ml'deki sperm sayısının 20 milyon/ml'den çok fazla olmasıdır.

Azospermi: tüm ejakülatta hiç sperm bulunmamasıdır.

Aspermi: seminal plazma üretiminin olmamasıdır.

Nekrospermi: spermelerin ölü olmasıdır.

Astenospermi: motilitenin %30'dan daha az olmasıdır.

Teratospermi: morfolojik olarak anormal spermelerin çoğunlukta olmasıdır.

Lökositospermi: semende lökositlerin 1 milyon/ml'den daha fazla olmasıdır.

Hiperspermi: semen hacminin 6 ml'den daha fazla olmasıdır.

Hipospermi: semenin 1 ml veya daha az olmasıdır.

Globozoospermi: spermde akrozom yokluğudur (13).

4.2. ERKEK İNFERTİLİTESİ

Dünya sağlık örgütü (WHO) infertilite tanımlamasını “en az bir yıl süreyle çiftlerin korunmasız olarak ilişkide bulunmalarına karşın çocuk sahibi olmamaları” olarak yapmaktadır. WHO’nun çok merkezli araştırmaları sonucunda, infertilite kliniklerine başvuran çiftlerin en az % 48’inde erkeğe bağlı nedenler bulunmaktadır. İnfertilite olgularının yaklaşık yarısı erkeğe bağlı olduğundan iyi bir semen analizi kaçınılmazdır. Semen parametrelerinin bilinmesi, bize hangi olgulara inseminasyon, hangi olgulara IVF ve hangi olgulara ICSI uygulaması yapmamız konusunda ışık tutacaktır (13).

Klasik in vitro fertilizasyonun yeterli sayıda motil spermin olması halinde erkek subfertilitesinde de çözüm olabileceğinin gösterilmesi üzerine IVF uygulamaları anovulasyon, tubal faktör ve açıklanamayan infertilite dışında erkek subfertilitesinde de kullanılmaya başlanmıştır. Ancak erkek subfertilitesinde sperm parametrelerinin yetersiz olmasının fertilizasyon oranının düşmesine neden olduğu bilinmektedir (16).

Fertilizasyonda etkili olan sperm parametreleri arasında sperm sayısı önemlidir. WHO standartlarına göre 20 milyon/ml ve daha fazla olması normal kabul edilmektedir. Ejakülatta hiç sperm bulunmaması anlamına gelen azospermi olgusu, erkeklerin %1’inde, infertilite olgularının ise %10-15’inde bulunur. Erkek infertilite olgularının tedavisinde en önemli ilerleme, azospermi olgularında testislerde spermatogenezin devam ettiği küçük odakların gösterilerek, bu odaklardaki matür sperm hücrelerinin elde edilmesi olmuştur (24). Günümüzde vaz deferens, epididim veya testisten sperm elde etmek için birçok farklı metod uygulanabilmektedir. Seçilen metod sadece cerrahi becerilere ve mevcut kliniklere bağlıdır. Eğer sperm ayaktaki hastadan elde edilecek ise teknik lokal anestezi uygulanabilir şekilde adapte edilmelidir. Ejakülat santrifüj edildikten sonra hiç motil spermatozoa elde edilmezse epididimal veya testiküler sperm elde etme metodları uygulanmalıdır (17).

Epididimal veya testiküler sperm elde etme metodları:

Semende hiç sperm bulunmayan azospermik vakalara uygulanan bazı yöntemler şunlardır;

- 1- MESA(Mikrocerrahi ile Sperm Aspirasyonu): MESA tekniğinde epididimisten alınan sıvı, medyum içeren enjektöre aspire edilir.
- 2- PESA (Perkutan Epididimal Sperm Aspirasyonu): MESA’dan farklı olarak bu işlemde kesi yoktur. Kelebek set ile epididimisten sıvı aspire edilir.

- 3- TESA (Testiküler Sperm Aspirasyonu): Bu işlemde medyuma sperm aspire edilir (13).
- 4- TESE (Testiküler Sperm Ekstraksiyonu): Ağır oligospermik ve azospermik hastalarda ya da başarısız intrauterin inseminasyon (IUI) sonrasında uygulanan üremeye yardımcı tedavi metodudur. TESE işlemi genel, spinal ya da spermatik kord ve skrotal cildin yüzeyel lokal anestezi ile yapılır. Ardından orta hat üzerinden ya da her iki hemiskrotuma ayrı ayrı insizyonlarla skrotal kesi yapılarak işleme başlanır. Tunika vaginalis açılarak testis dışarı alınır. Epididim ve vas deferens, obstrüktif bulgular ve konjenital anomaliler bakımından muayene edilir.

A) Konvansiyonel çoklu biyopsilerle TESE yöntemi

Her testis için tunika albuginea'ya 3-7 odaktan 3-4 mm'lik insizyon yapılır. Testisin damarlanmasının en az olduğu bölgeler alt kutup iç, dış ve ön yüzü ile üst kutup iç ve dış bölgeleridir ve insizyon sıklıkla bu bölgelere yapılır. Hemostaz bipolar koter ile yapılır. Testis dokusundan alınan 2-3 mm boyutundaki materyaller diseksiyon makası ile alınır ve yıkama mediumu içeren tüp ya da petri kutularına konulur. İşlem sonunda tunika genellikle ince bir sütür ile kapatılır.

B) Mikrodiseksiyon ile TESE yöntemi

İşlem, optik lup kullanılarak veya 15-25 X büyütmeli ameliyat mikroskobu altında yapılır. Tunika albuginea üzerinde, antimezenterik alandan avasküler bir alan seçilerek, ince bir bistüri ile 3-4 cm (testis volümüne göre değişir) uzunluğunda transvers bir kesi yapılır. Burada longitudinal kesit de tercih edilebilir. Transvers kesi subtunikal damarlara paralel yapılır, dolayısıyla longitudinal kesime göre daha az hemoraji olur. TESE esnasında damarlar dikkatli bir şekilde ve düşük voltajda koterize edilir. Daha sonra, dışarı doğurtulan testis dokusu incelenerek, seminifer tubüller mikrocerrahi aletleri kullanılarak muayene edilir. Diğerlerinden farklı, dolgun, geniş ve opak seminifer tubüller ayırt edilerek, yeterli miktarda doku atravmatize şekilde tutularak kesilir ve çıkartılır (24).

Araştırmaacı	Hasta Sayısı	Spermatozoa bulma oranı (%) Konvansiyel TESE	Spermatozoa bulma oranı (%) Mikrodiseksiyon TESE
Schlegel (1999)	49	45	63
Amer (2000)	100	30	47
Aydos (2001)	35	37	51
Okada (2002)	146	16	44
Tsujimura (2002)	93	35	43
Okuba (2002)	17	24	48
Ramasay (2005)	435	32	57

Tablo 2: TESE sonrası spermatozoa bulma oranının karşılaştırılması (24).

4.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)

Oositin başarılı bir şekilde fertilizasyonu için normal bir spermatozoa olmalıdır. Bu nedenle gonadal ve sperm fonksiyonlarını etkileyerek infertiliteye sebep olan oksidatif stres, araştırılması yapılan çalışmaların önemli bir bölümünü tutmaktadır. Oksidatif stres, oksijen ve oksijen kaynaklı oksidanların serbest oksijen radikallerini arttırmasıyla başlayan bir durumdur. Serbest oksijen radikalleri kanser, romatizmal hastalıklar, yaşlanma, toksin maruziyeti, fiziksel hasar, enfeksiyon ve inflamasyon gibi pek çok hastalıkta karşımıza çıkar. Birçok hücrenin antioksidan mekanizmaları oksidatif stres altında bozulur. Hem serbest oksijen radikallerinin üretiminin artımı, hem de hücrel antioksidan kapasitenin azalması oksidatif stresin gelişimine neden olur. Dolayısıyla, oksidatif stresin infertilitedeki rolü ve üreme organlarındaki antioksidanlara karşı olan etkilerine karşı koruma mekanizmalarının bilinmesi, büyük bir tedavi edici potansiyel taşımaktadır (25). Tüm hücreler her gün her dakika yüzlerce serbest radikalle karşı karşıya kalır. Bu radikaller, normal hücre metabolizma ürünleri olarak çevremizdeki kimyasallar tarafından oluşturulur, yediğimiz yiyecekte ve soluduğumuz havada bulunur (26). Testiste, gelişmekte olan germ hücreleri, kompleks hücre değişiklikleri ile birlikte seminifer epitelin bazal bölümünden adluminal bölümüne doğru dereceli bir şekilde göç etmektedir. Uzamış olan spermatidler en sonunda tubül lümenine sperm olarak salınmaktadır (9). Serbest oksijen radikalleri çok yüksek reaktif okside edici ajanlardır. Bir serbest radikal bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşır. Serbest oksijen radikalleri süperoksit anyon, hidrojen peroksit, peroksil radikaller ve reaktif hidroksil radikalleri içerir. Bu serbest oksijen radikallerinden birçoğu üreme biyolojisinde önemli rol oynarlar. Bunlara ek olarak, üreme ve sperm fonksiyonları üzerinde çok etkili olduğu gösterilmiş olan nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit anyonu gibi nitrojen kökenli serbest radikaller de yer almaktadır. Serbest oksijen radikallerinden nitrik oksitin erkek üreme sisteminde birçok fonksiyonun kontrolünde düzenleyici görevi olduğu da bulunmuştur (25).

4.4. NİTRİK OKSİT

1916'da, Mitchell ve ark. tarafından NO'nun memeli hücrelerinde salınımı keşfedildi. 1928'de, Tannenbaum ve ark. memelilerin NO sentezlediklerini doğruladı. 50 yıl sonra (1980), Furchgott ve Zawadski non prostanoit (EDRF) aracılığıyla damarın asetilkolin ile uyarılmış olduğunu kanıtladı. 1985 yılında, Stuehr ve Marletta tarafından aktive olmuş makrofajların nitrit /nitrat sentezlediği bildirildi. 1987 yılında ise, Hibbs ve ark. L-arginine'nin nitrit/nitratın bir substratı olduğunu yayınladı. Ayrıca, 1987'de Palmer ve Ignarro, birbirlerinden habersiz olarak; NO'nun bir EDRF olduğunu kanıtladı. Bir yıl sonra, Palmer ve ark. 1988'de NO'nun L-arginine'den sentezlendiğini yayınladı, Marletta ve ark. (1988) ise makrofajların, nitrit/nitratı L-arginin'den oluşturduğunu ortaya koydu. Aynı yıl içerisinde Garthwaite ve ark. tarafından (1988) NO'nun beyinde de sentezlendiği ileri sürüldü. 1988-1992 yılları arası, bilim alanındaki gelişmeler ile birlikte, NO'nun fonksiyonları ve görevleri ile ilgili pek çok ilerleme kaydedildi. 1992 yılında ise, D.E Koshland tarafından, NO 'yılın molekülü' ilan edildi (27).

Vücutta birçok hücreden (endotel, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve makrofajlar) nitrik oksit (NO) salınabilmektedir. NO, hem hücre içi hem de hücre dışında düzenleyici işlev gören küçük reaktif serbest radikal moleküldür. Yarı ömrü, 2-5 saniyedir. NO, endojen L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenir. NADPH, flavinmononükleotid (FMN), flavinadeninükleotid (FAD), tetrahidrobiopterin, kalmodulin ve kalsiyum (Ca) gibi kofaktörler kullanılır. Bu reaksiyon moleküler oksijen gerektirir ve N-hidroksi arjinin sentezinde L-sitruilin ile NO oluşur (25).

Mast hücrelerinin NO üretimini artırdığı bilinmektedir. Mast hücre sayısındaki artışın testiküler dokuda ciddi patolojik değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir(28). Mast hücrelerinin değişik mediatörlerin sentez ve salınımında rol oynamaktadır (29). İnsan mast hücre aktivitesi fibroblastları ve kollajen sentezini tetikler. Bu nedenle mast hücreleri kronik iltihap ve fibrosiz oluşumunda rol oynamaktadır. İnfertil erkek bireylerin testisinde, tubül duvarlarında fibrotik değişikliklerin olduğu bildirilmiştir. Çeşitli çalışmalarda da infertil erkek bireylerinin testisinde mast hücre sayısında belirgin artış olduğunu belirtmiştir (28).

Varikosel, genç erkeklerde çok sık görülen bir patolojidir. Ancak infertilite ile ilgisi henüz açıklanamamıştır. En yeni teoriler, testiküler geri akımın oksidatif stres yarattığı ve gonada zarar verdiği yönündedir. Yapılan çalışmalarda varikoseli olan hastalarda sperm

konsantrasyon ve motilitesinin seminal plazmadaki NO seviyesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (30,31). Varikoseli olan hastalarda seminal plazmadaki NO seviyesi varikoseli olmayanlardan 2-25 kat daha fazla bulunmuştur (5,32). Varikoseli olan hastalarda Leydig hücrelerinde de NOS aktivasyonunun artmış olduğu gösterilmiştir (32). Buna karşın bazı çalışmalarda NO seviyesinin özellikle varikosel ile ilişkili olduğu fakat infertilite ile bir ilgisinin olmadığı ileri sürülmüştür (33). Kısa ve arkadaşları, suprafizyolojik NO düzeylerinin testis ve sperm fonksiyonu üzerinde olumsuz etkisi olduğunu ve varikosel ile semen NO düzeyi arasında bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada deneysel olarak oluşturulan varikoselin histopatolojik hasarı henüz oluşmadan NO oranını artırdığı gözlenmiştir. NO düzeyindeki artışın ve diğer oksidan ajanların testiküler distrese bağlı değişimlere yol açtığı ve bu değişimlerin histopatolojik dejenerasyona neden olduğu ileri sürülmüştür. NO'nun varikoselin patogeneziinde önemli bir mediatör rolü olduğu sonucuna varılmıştır (6).

4.4.1. Nitrik Oksit Sentezlenmesi

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından sentezlenmektedir. NOS enzimleri temel olarak, yapısal NOS (cNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS, NOS 2) olarak iki gruba ayrılır. Yapısal NOS denmesinin nedeni bu tip NOS enzimlerinin hücrede normalde bulunuyor olması ve uyarana yanıt vermesi için yeni bir protein sentezine ihtiyaç duymamasıdır. cNOS da kendi içinde endotelial NOS (eNOS NOS 3) ve nöronal NOS (nNOS, NOS 1) olarak ikiye ayrılır (Tablo 3). nNOS sinir sisteminde mesajcı fonksiyon görürken eNOS daha çok damar endotelinde gevşeme faktörü olarak fonksiyon göstermektedir. cNOS formları Ca^{2+} /kalmodylin bağımlıdır. Alt birimlerinden biri kalmodylin (CaM) olmasına rağmen, iNOS, cNOS formlarından farklı olarak aktivitesi için kalsiyuma ihtiyaç duymaz. Normal hücre içi Ca^{2+} derişimi, iNOS aktivitesi için yeterlidir. Enzimlerin dokulardaki dağılımı normal ve patolojik durumlarda değişebilmektedir. Her üç NOS tipi de L-arjinin analogları tarafından inhibe edilebilmektedir (34).

NOS enzimleri birbirinin aynı iki alt birimden oluşur ve ancak alt birimler bir araya gelip dimer oluşturduklarında katalitik etki gösterirler. Aktivite göstermeleri tamamen koenzime bağımlıdır. Aktiviteleri ayrıca CaM, Ca^{2+} /CaM, yağ asitleri ve fosforilasyon-defosforilasyon ile de kontrol edilebilmektedir (34).

Bu izoenzimler %60 aminoasit yapısındadır. NOS izoenzimleri üreme sisteminde olduğu gibi birçok dokuda varolan NO biyosentezi için gereklidir. NOS protein ve aktivitesi insan ve sıçanların testis, epididim, prostat ve seminal veziküllerinde tespit edilmiştir (3). NOS antikoru ile yapılan deneysel çalışmalarda farelerin spermatozoa ve kuyruklarında NOS'un varlığı gösterilmiştir. İnsanlarda eNOS, nNOS ve iNOS kodlayan genler 7, 12 ve 17. kromozomlarda lokalizedir (35).

4.4.2. Nitrik Oksit İzofomları

NO ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalar, bu moleküllerin erkek üreme fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve özellikle de spermatogenezde önemli bir rol oynadığının altını çizmektedir. Literatürde 80'li yıllardan günümüze dek bu moleküller ile ilgili çalışmaların devam ettiği ve sperm üretimi ile bağlantısının çözülmeye çalışıldığı görülmektedir.

Yapılan immunohistokimyasal çalışmalar göstermektedir ki; eNOS ekspresyonu testiküler dokuların, seminal veziküllerin, prostat ve epididimisin fonksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Ancak bugüne kadar obstrüktif olmayan azospermi olgularında, eNOS lokalizasyonuna bakılmadığını ifade eden Foghi ve arkadaşlarının 2011'de yayınlanan çalışmalarında obstrüktif ve obstrüktif olmayan testis dokularındaki eNOS lokalizasyonu karşılaştırılmıştır (36). Bu çalışmada obstrüktif olmayan testis dokusu örneklerinde daha güçlü eNOS boyanmasının olduğu gösterilmiştir. Bu da NO'nun spermatogenezde önemli bir rolünün olduğu, anormal ve immature germ hücrelerindeki üretiminden dolayı germ hücrelerinin gelişiminde önemli olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır (37). Ayrıca plazma membran içerisinde oldukça önemli olan eNOS'un kaveol fonksiyonu içinde önemli olduğunu göstermiştir. Birçok hücre türünde ve belirli endotelial hücrelerde (EC), adipositler ve fibroblastların plazma membranlarında kaveoller spesifikdir. Kalsiyum seviyesi düşük olduğunda eNOS aktivitesi düşerek CaM bağlayıcısını da önlemektedir. Bazal eNOS aktivitesini de azaltan kaveolin-1'dir. Son çalışmalar oksidatif stres şartları altında plazma membranından eNOS'un geçişinin kaveolin-1 tarafından düzenlendiğini göstermiştir. Ayrıca eNOS; tirozin(Y), serin(S) ve trioninin(T) tarafında toplu fosforilasyonu ile düzenlenebilmektedir (38,1).

Gülperi Öktem ve arkadaşlarının 2009 yılında yayınlanan çalışmalarında, obstruktif sıçan testis biyopsi örneklerinde iNOS ve eNOS'un immün reaksiyonuna bakılmış ve çalışmalarında kantitatif immünohistokimya metodu tercih edilmiştir. İpsi lateral damar ligasyonu geçirmiş hayvanlarda eNOS immün reaksiyonu daha yoğun gözlenmiştir. iNOS ve eNOS immüno lokalizasyonundaki değişimlerin, hücre hasarı ile yakın ilişkisinin olduğu, germ hücre dejenerasyonunun ipsi lateral damar ligasyonu sonrası daha bariz olduğu rapor edilmiştir (39).

Zini ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada eNOS'un insan testisindeki lokalizasyonunun immünohistokimyasal olarak belirlenmesi ve NO'nun spermatogenez ve sperm maturasyonu üzerine etkisi rapor edilmiştir (1). eNOS'un hem immünohistokimyasal olarak hem de western immunoblot tekniği ile insan testisinde, epididimiste ve vas deferente varlığının gösterildiği çalışmada bu proteinin spermatogenezin tüm safhalarında Sertoli ve Leydig hücrelerinde de bulunduğu kaydedilmiştir. NOS'un Sertoli hücrelerindeki işlevi tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte Leydig hücrelerinde androjen üretimini sağladığı öngörülmektedir. NO'nun düşük konsantrasyonunun sperm motilitesini düşürdüğü ancak canlılığını etkilemediği kaydedilmiştir (40,32). Yüksek konsantrasyonunun ise motiliteyi ve canlılığı bozduğu belirlenmiştir. Düşük miktardaki NO'nun fizyolojik koşullarda sperm motilitesini inhibe eden serbest radikalleri nötralize ettiği düşünülmektedir (27). eNOS'un, NO üretiminden sorumlu bir protein olarak testis dokusunda bulunması, NO'nun spermatogenez ve androjen üretiminden sorumlu olduğunu göstermektedir (1).

Middendorff ve arkadaşlarının da NOS ve NO reseptörlerini immünohistokimyasal olarak Leydig hücrelerinin dışında peritübüler lamina propria, Sertoli hücreleri ve kan damarı hücrelerinde belirlemeleri, NO'nun bu yapılarda aktif bir rol oynadığını göstermiştir. Peritübüler lamina propriyadaki varlığı NO'nun tubüllerin peristaltik aktivitesine katıldığını düşündürmektedir ve bu durum sperm transportu için son derece önemlidir. Bu çalışma ayrıca NO'nun testiküler damarlar aracılığıyla oksijenin, besinlerin ve hormonların aktarımında ve ayrıca tubüllerin peristaltik hareketinde etkin olduğunu ortaya koymaktadır (41).

iNOS (Tip II NOS)	eNOS (Tip III NOS)	nNOS (Tip I NOS)
İndüklenebilir	Yapısal	Yapısal
Ca ²⁺ /CaM bağımsız	Ca ²⁺ /CaM bağımlı	Ca ²⁺ /CaM bağımlı
Aktivitesi yüksektir	Aktivitesi düşüktür	Aktivitesi düşüktür
Aktiviteleri glukokortikoidler tarafından engellenebilir	Aktiviteleri glukokortikoidler tarafından engellenmez	Aktiviteleri glukokortikoidler tarafından engellenmez
Aktivitesi transkripsiyonla belirlenir	Hücrelerde normal şartlarda da bulunmaktadır	Hücrelerde normal şartlarda da bulunmaktadır
Genellikle sitoplazmada bulunur	Hücre zarında bulunur	Genellikle sitoplazmada bulunur
Makrofajlar, nötrofiller, fibroblastlar, mast hücreleri, hepatositler gibi pek çok hücre tipinde sentezlenebilir	Mast hücrelerinde, plateletlerde, pankreasın hücrelerinde, damar düz kas hücreleri ve endotelinde bulunurlar	Sinir sistemi, adrenal bez, nonadrenerjik-nonkolinerjik nöronlar ve astrositlerde bulunurlar
LPS, IFN- γ , TNF- α , TNF- β , IL-1, IL-2, lipoteikoik asit ve pikolinik asit tarafından aktive edilebilir	Serotonin ve trombin tarafından aktive edilebilir	Ca ²⁺ iyonları, Asetil kolin, bradikinin, histamin, lökotrinler ve PAF tarafından aktive edilebilir
7. kromozomdan transkribe edilir	12.kromozomdan transkribe edilir	17.kromozomdan transkribe edilir

Tablo 3: Üç NOS izoformunun karşılaştırılması (34).

4.5. NO ve SIKLIK NÜKLOTİDLER: Bağlantı Dinamikleri ve Spermatogenezdeki Rolü

NO, NOS tarafından sentezlenmektedir. Üç farklı NOS formu vardır; endotelyal (eNOS), indüklenebilir (iNOS), nöronal (nNOS) bulunmaktadır (42,43). Testiste bulunan NO ve NOS'un spermatogenez ile ilişkili olarak hücrel sinyalleşme, inflamasyon, sperm olgunlaşması ve bağlantı dinamikleri ile ilişkili olduğu bilinmektedir (7). Son zamanlarda varsayılan eNOS ve iNOS bağlantı dinamikleri ile düzenlenmektedir. Testis içinde bulunan sıkı bağlantı (SB) ve aralıklı bağlantı (AB) bileşenleri de guanil siklaz/cGMP/ protein kinaz sinyal yolağı ile regüle edilmektedir. Ayrıca testis içindeki sitokin ve hormon seviyesinde NO/NOS tarafından kontrol edilmektedir. NO, germ hücrelerinin oluşumunda ve gelişiminde de büyük rol oynamaktadır. Dolaylı olarak erkek infertilitesinde ve testiküler patolojik şartlarda altında NOS'lar rol oynamaktadır. (42)

Kan-testis bariyerini (KTB) oluşturan Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (SB) üç sınıftan oluşmuştur. Bu membran proteinleri; okludinler, klaudin, ve tutundurucu moleküller (JAMs) olarak bilinmektedir. Buna karşılık, bu transmembran proteinler kan-testis bariyerinde yapısal olarak farklı adaptörler ile ilişkilendirilerek SB kompleksi oluştururlar. Örneğin, okludin, klaudin, ya da tutundurucu moleküller, zonula okludinler (ZO-1) ile etkileşerek kompleks oluşturmaktadır (8). SB bağlantısının diğer bağlantılara göre en belirgin adaptör örneği de ZO-1'dir (42). İlginç bir şekilde, son çalışmalar TGFβ3, TNFα gibi büyüme faktörleri, hem diğer düzenleyiciler, cAMP ve NO/NOS, testiste sıkı bağlantıların düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Diğer yeni çalışmalar da NOS'un gerçekten de çok önemli bir geçirgenlik düzenleyici olduğunu göstermektedir (8).

4.5.1. NOS/NO ile Bağlantı Dinamikleri

Testis içindeki bazal kompartman ve adluminal kompartmanda germ hücreleri spermatogenez sırasında olgunlaşarak farklılıklar yaratmaktadır. Testis içerisindeki kan-testis bariyeri (KTB) üç tane minimal bağlantı bulundurur: Sıkı bağlantı (SB), aralıklı bağlantı (AB), tutundurucu bağlantı (TB)'lardır. Buna karşı KTB'deki bağlantılar dinamik değişime bağlıdır.

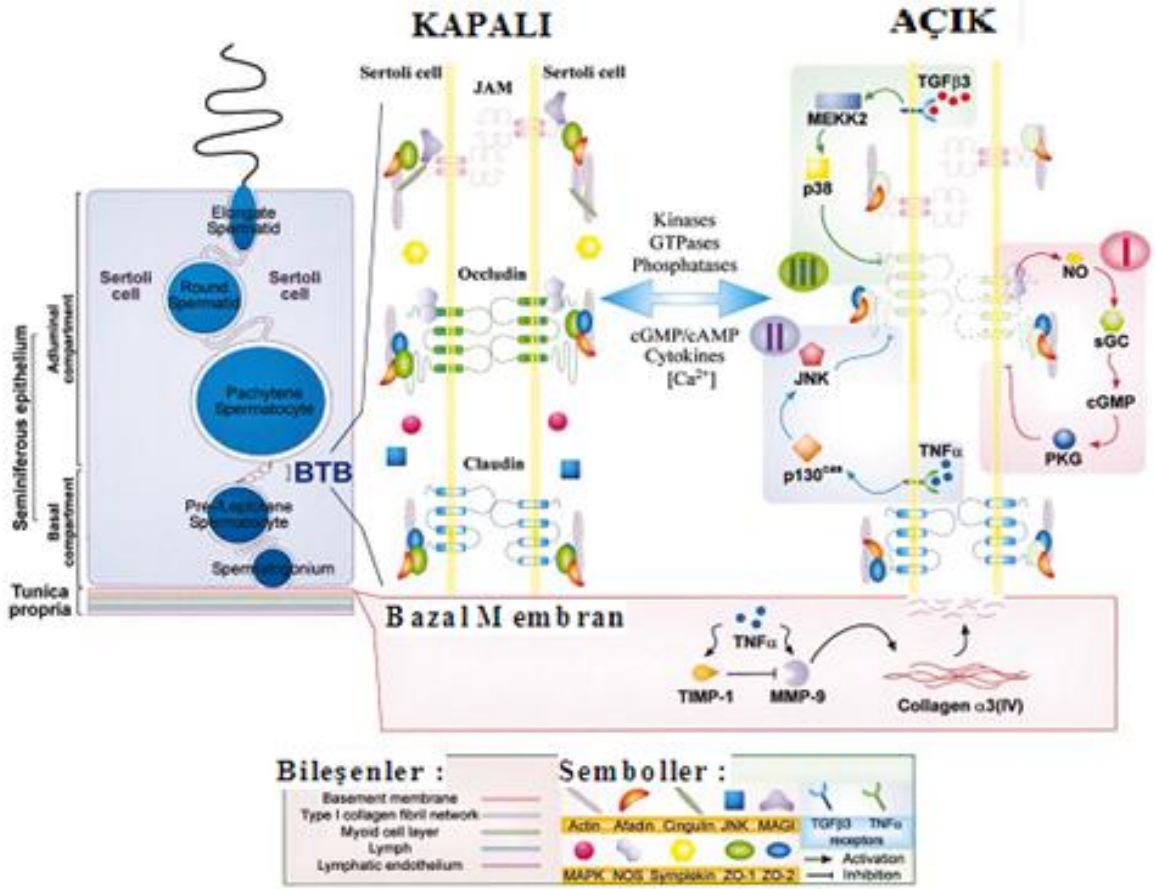
Birçok sinyal molekülüne karşı NOS/NO, seminifer epitelyumdaki bağlantılarda önemli regülatörlerinden biridir. NOS/NO endotelde ve epiteldeki bağlantı dinamiklerinde mevcuttur. Bu görüşlerin altındaki çalışmalar, testisin içinde bulunan NOS/NO bağlantı stabilitesi, integral membran proteinler, adaptörler, hücre iskeletleri ve regülatör proteinlerin bölünmez olduğunu göstermektedir .

Kan testis bariyerini oluşturan Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantıları, seminifer epiteli adluminal ve bazal kompartman olarak ikiye bölmektedir. Bazal kompartmanın altında bulunan lamina propria hücre bölgesi ve hücre içermeyen bölgeden oluşmuştur. Hücre içermeyen bölgesi bazal membrandan oluşur. Testiste bazal membranı kollajen tip IV, laminin, heparan sülfat, proteoglikan ve entaktinden oluşan ekstrasellüler matriks yapısından olmuştur. Hücre bölgesi miyoid hücrelerin tabakasından oluşur. Miyoid hücre tabakasının altında lenfatik endotel yer alır.

Sıkı bağlantı-integral membran proteinlerinin 3 sınıfı sırasıyla okludin, klaudin ve tutundurucu moleküller (JAM) testiste bulunur. Bu proteinler ZO-1, ZO-2, afadin, cingulin ve membran ile ilişkili guanilat kinaz (MAGI), aktin filament gibi adaptörler ile ilişkilidir. Diğer regülatör proteinler NOS, p38 mitogen-aktive eden protein kinaz (MAPK), JNK (SAPK), ILK, GSK ve p130 testiste tespit edilmiştir. Bu regülatör proteinler in vitro veya in vivo çalışmalarına dayanarak Sertoli hücresi sıkı bağlantı bariyerinin açılmasını ve bağlanmasını düzenler.

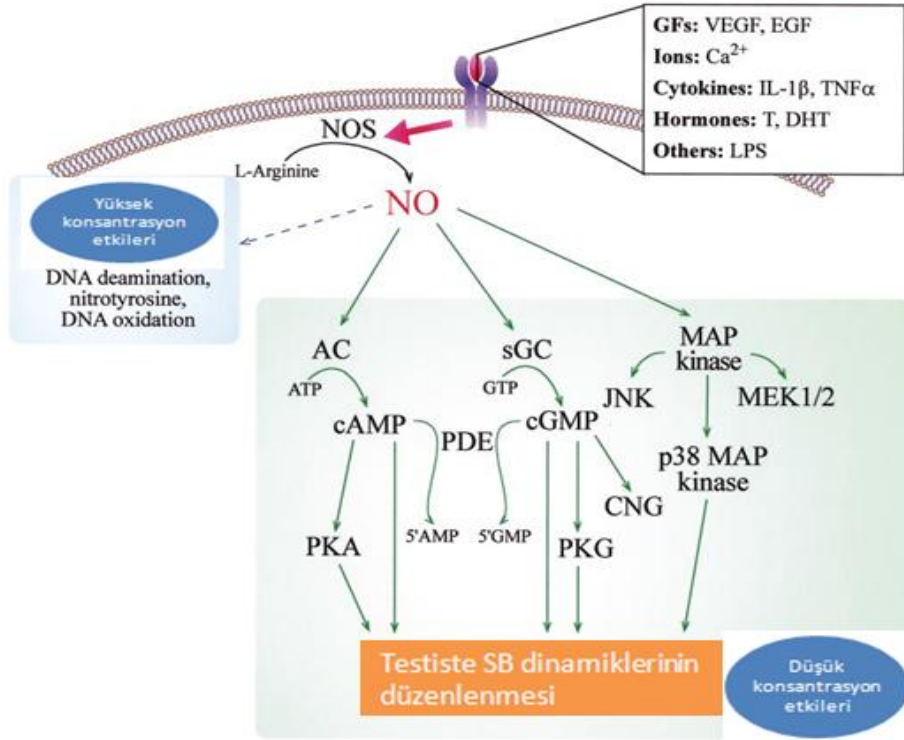
Sertoli sıkı bağlantı dinamiklerini düzenleyen 3 sinyal yolak bilinmektedir:

- 1- NO, cGMP'yi sentezlemek için sGC'yi stimüle eder. Bu durum sıkı bağlantı bozulmasına yol açar. cGMP okludindeki etkisi aracılığıyla sıkı bağlantı dinamiklerini etkileyen PKG'yi aktive eder. Sertoli hücresi sıkı bağlantı bölgesindeki okludin seviyesini azaltarak sıkı bağlantı bariyerine yol açar.
- 2- TNF- α , okludin seviyesini etkileyen ILK/GSK/p130/JNK(SAPK) sinyal yolağını aktive eder. Ayrıca TNF- α (TIMP)-1 metalloproteaz inhibitörü üretimindeki etkileri aracılığıyla sıkı bağlantı dinamiklerini düzenler.
- 3- Kan-testis bariyerindeki ZO-1 ve okludin seviyesinin etkileri aracılığıyla Sertoli hücre sıkı bağlantılarını bozmak için TGF β ₃, MAP/ERK kinaz 2 (MEKK2) ve p38 MAPK aktive eder (42) (Şekil 10).



Şekil 10: Kan Testis Bariyerindeki periferel proteinler ile ilişkili 3 sıkı bağlantı (SB)-integral proteinlerin moleküler yapısı (42).

NO'nun hücre konsantrasyonu $1\mu\text{M}$ 'den yüksek olduğunda, baskın olan NO ya da superoksit radikaller, DNA deaminasyonu, oksidasyonu veya nitrasyonunu içeren etkilere aracılık etmektedir. Böylece NO'nun etkileri yüksek konsantrasyonlarda çoğunlukla öldürücü olmaktadır. Yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun dolaylı etkilerinin aksine, konsantrasyonu $1\mu\text{M}$ dan daha az olan NO, O_2 veya superoksit radikalleri ile doğrudan etkilidir. Örneğin, NO, sGC ile siklik nükleotid kapı kanalları ve cGMP-düzenleyici fosfodiesteraz (PDE) protein kinaz G (PKG)'yi aktive eden cGMP'yi sentezler (44,45) (Şekil 11).



Şekil 11: Sertoli hüresinin sıkı bağlantı dinamiklerinin düzenlenmesinde NO/NOS aracılığıyla farklı sinyal yollarının anlatımı (42).

4.5.2. NOS/NO ile Testis

Testisin içinde birçok bağlantı proteinleri ve moleküllerin varlığı bilinmektedir. NO, küçük moleküler boyaya sahip olması ve doğal difüzyonu nedeniyle oldukça hareket halindedir. Testisteki NO'nun ana kaynağı makrofajlardan köken almaktadır. Bu makrofajlar, mikrodamarların ve interstisyumdaki tubüller arası bölgede yer alırlar. Leydig hücreleri de, NO'ya en hızlı cevap veren hücrelerden bir tanesidir. NO, seminifer tubül içindeki Sertoli hücre aktivitesini ve germ hücrelerini de etkilemektedir. Germ hücrelerinde eNOS, Leydig hücrelerinde iNOS sentezlenmektedir. Oldukça az miktarda Sertoli hücrelerinde de nNOS üretilmektedir. Bütün bu NOS'lara bakarak testise spesifik NOS çeşitliliğinde farklılık olarak tanımlanmıştır ve TnNOS olarak adlandırılmaktadır. Son çalışmalar gösteriyor ki, NO/NOS'un sinyal yolu, testis içindeki NO/NOS etkisini arttırmaktadır. Testis içindeki seminifer epitelde guanil siklaz(GC)/cGMP/protein kinaz G(PKG) sinyal yolağını kullanmaktadır. iNOS ve eNOS testisteki SB'deki okludin proteinleri ile bağlantılıdır (42).

4.5.3. NOS/NO ve Spermatogenezis

Testisdeki NOS/NO ve hormon/sitokin/parakrin/otokrin sistemi:

Hormonlar ve sitokinler, immun sistemin düzenlenmesinden endokrin sistemin modülasyonuna kadar çok değişken fonksiyonlara sahiptir. Testisdeki mikroçevrede başlıca erkek cinsiyet hormonu olan testosteron, spermatogenezis aşamasında etkilidir. Leydig hücrelerinden sentezlenen testosteron, hipofiz bezi tarafından salgılanan lütein hormonu (LH) kontrolü altındadır. Sitokinler, çoğunlukla dolaşımdaki özellikle immun hücrelerinden (örneğin; makrofaj) kaynaklanır ve kan damarları yoluyla testis içinde yayılır. En önemlisi, testis içindeki NO ürünlerinin büyük bir kısmı aktive olmuş testiküler makrofajdan kaynaklanır. En büyük NO ürünü, testiküler makrofajlar tarafından etkinleştirilir ve bunlar yüksek iNOS seviyelerine sahiptir. Diğer taraftan NO, hormon ve sitokinlerin testiküler ürünlerini düzenlemektedir. Bir NO donörü olan S-nitrozoglutatyona Leydig hücre kültürlerinin maruz kalması, in vitroda testosteron üretimini inhibe edebilir. Diğer çalışmalar aktive olmuş makrofaj kaynaklı NO Leydig hücrelerindeki testosteron üretimini düşmesiyle ilişkilidir. Sonuç olarak NOS/NO ve hormon/sitokin seviyeleri arasındaki ilişki testisin fizyolojik fonksiyonlarının devamında önemlidir (42).

4.6. NOS/NO VE BAĞLANTI DİNAMİKLERİNİN FERTİLİZASYONLA İLİŞKİSİ

Erkek infertilitesi insan üremesinde en çok ilgi odağı olmuştur. Moleküler seviyede üreme için, kadın ve erkeğe ait gametlerin başarılı bir şekilde birleşmesi gerekmektedir. Bu durum birçok faktöre bağlıdır. Spermlerin kalitesi ve miktarı üremeyi direkt olarak etkilemektedir. Apoptozis, testis içindeki germ hücrelerinin kalitesini ve kantitatifini sağlayan önemli işlemlerden birisidir. Eğer apoptozis kontrol edilmezse germ hücrelerinin sayısı ve canlılığının azalmasına neden olur. Böylece testiste yeterli sayıda sağlıklı spermatazoa üretilemez ve sonucunda infertilite kaçınılmazdır. Testisteki dengesiz NO seviyeleri, NOS sentez bozukluğuna neden olmaktadır. Testis içinde azalmış eNOS protein seviyesi, azalmış olan idiyopatik azospermi hastalarının yanı sıra obstruktif azospermi ya da varikosel ve sağlıklı bireylerde gözlenmiştir. NO konsantrasyonlarının değişikliğine bağlı olarak patolojiler görülmesine karşın belli orandaki NO varlığı sağlıklı

spermatogenez için gereklidir. NO, spermin rete testisten epididimise doğru taşınmasında da katkıda bulunmaktadır. Kısaca NOS/NO testis patogenezinde birçok rol oynar ve NOS/NO etkisinin olması, PKG sinyal yolağı ile regüle edilmektedir (42).

Ramya'nın 2011'de yayınlanan çalışmasında, infertil olgularda reaktif nitrojen türlerinin sperm fonksiyonu üzerine etkisi rapor edilmiştir. İnfertil erkeklerin semenleri rutin sperm parametrelerine göre alt gruplara ayrılmıştır. NO ve NOS bakılarak sperm fonksiyonu üzerine olan etkilerinin ortaya koyulması amaçlanmıştır. İnfertil erkeklerin semen örneklerindeki NO ve NOS aktivitesinin yüksek olduğu görülmüştür. Semendeki nitrik oksitin normospermik, astenospermik, lökositospermik, lökositostenospermik ve teratospermik olgularda sperm fonksiyonu ile ters orantılı olduğu da belirtilmiştir. Oligospermik örneklerde ise NO'nun sperm fonksiyonu ile pozitif ilişkili olduğu ortaya koyulmuştur. Bu durumun da yüksek miktardaki NO'nun sitotoksik etkisinin olması ve oligospermik erkeklerde düşük ya da suboptimal seviyelerin bu olguları diğerlerine göre ayırdığını düşündürmüştür (14).

5. MATERİYAL VE YÖNTEM

5.1. HASTA GRUPLARI

Bu çalışmaya, infertilite merkezine başvurmuş, yaşları 25-55 arasında değişen, semen örneğinde hiç sperm bulunmayan azospermik hastalardan elde edilen TESE örnekleri, sperm hücresi bulunan (n=20) ve bulunmayan (n=20) şeklinde iki gruba ayrılarak dahil edildi.

5.2. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Kliniğe gelen hastalar, lokal anestezi altında hastanın üstü operasyon sahasını göremeyeceği şekilde steril örtülerle örtüldü. Örtünün ortasında bulunan 5 cm çaplı boşluk operasyon alanı olarak belirlendi ve operasyon sahası antiseptik solüsyon ile temizlendi. Ardından konvansiyonel biyopsi ile TESE yöntemine geçildi. Her testis için tunika albuginea'ya 3-7 odaktan 3-4 mm'lik insizyon yapıldı. Testis dokusundan alınan 2-3 mm boyutundaki materyaller diseksiyon makası ile alındı ve yıkama mediumu içeren petri kutularına konuldu. İşlem sonunda tunika genellikle ince eriyebilen bir sütün ile kapatıldı. İçinde yıkama solüsyonu bulunan petri kabındaki testis dokusu insulin enjektörlerinin iğneleri arasında seminifer tubüller sağılarak disseke edildi. Invert mikroskop altında (Olympus Eppendorff TransferMan NK2) sperm hücrelerinin varlığına bakıldı. Dokular sperm varlığına göre gruplanarak fiksatif içine alındı ve doku takibine geçildi.

5.3. IŞIK MİKROSKOBU PREPARASYONU

5.3.1. Histokimyasal Yöntem

Morfolojik değerlendirme için graplardan alınan testis dokuları %10'luk Bouin fiksatifinde immersiyon fiksasyonundan sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi, ksilol ile şeffaflaştırılarak, 60°C'lik etüvde parafinde gece boyunca bekletildikten sonra oda ısısında parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan mikrotomda yaklaşık 5 µm kalınlığında alınan kesitlere genel morfolojik değerlendirme için hematoksilen-eozin boyası, Masson'un üçlü boyası ve toluidin mavisi boyası uygulandı.

5.3.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyama

Lamlara alınmış kesitler deparafinizasyon için 1 saat ksilolde tutuldu. Daha sonra alçalan alkol serilerinden (%100,%96,%90,%70 alkol) 5'er dakika geçirilerek suya indirildi, 5 dakika distile suda tutuldu. Lamlar Gill hematoksilende 7 dakika boyandı. Boyama sonrası 45 dakika akar su altında tutularak mordanlama yapıldı. Ardından lamlar eozinde 15 dakika tutulup distile sudan geçirildi. Yükselen alkol serilerinden geçirilip (%70, %96, %100) ksilole alındı ve 10 dakika sonra entellanla lamlar kapatıldı. Kapatma işleminden sonra morfoloji değerlendirilmesi için ışık mikroskopunda (Olympus DP72,Tokyo,Japon) X200, X400 büyütmelemlerde incelendi ve fotoğraflandı.

5.3.1.2. Masson'un Üçlü Boyaması

Ksilol ile deparafinize edilen lamlar, alçalan alkol serilerinden (%70, %96, %100 alkol) geçirilerek suya indirildi. Preparatlar 56°C'de Bouin solüsyonunda 15 dakika bekletildi. Lamlar şale içinde bulunan 18-26°C sıcaklığında olan musluk suyuna alındı.

Akar musluk suyu altına alınan lamlar, sarı renk gidene kadar bekletildi. Ardından Weigert's demirli hematoksilende 5 dakika bekletildi. Akar musluk suyu altında 5 dakika tutuldu ve distile suda durulandı. Scarlet asit fuksinde 5 dakika bekletildi ve tekrar distile suda durulandı. Lamlar fosfotungstik/fosfomolibdik asit solüsyonuna alındı 5 dakika bekletildi. Anilin mavisi solüsyonunda 5 dakika bekletildi. %1'lik asetik asitte 2 dakika tutuldu. Lamlar durulandı, alkol yoluyla (%70, %96, %100 alkol) dehidrate edildi, ksilenle yıkanıp lamelle kapatıldı. Hazırlanmış olan preparatlar, ışık mikroskopunda (Olympus DP72,Tokyo,Japon) X400 büyütmede incelendi ve fotoğraflandı.

5.3.1.3. Toluidin Mavi Boyaması

Lamlara alınmış kesitler deparafinizasyon için 1 saat ksilolde tutuldu. Daha sonra alçalan alkol serilerinden (%100,%96,%90,%70 alkol) geçirilerek suya indirildi, 5 dakika distile suda tutuldu. Lamlar, toluidin mavisinde 20 dakika boyandı. Boyanma sonrası distile sudan geçirildi. %96'lık alkolde 10 dakika bekletilip, ksilole alındı ve 30 dakika sonra entellan ile kapatıldı. Kapatma işleminden sonra mast hücre sayımı ve morfoloji değerlendirilmesi için ışık mikroskopunda (Olympus DP72,Tokyo,Japon) X200, X400 büyütmelede incelendi ve fotoğraflandı. Mast hücre sayımı için 200 büyütmede her kesitte 5 alan sayıldı ve elde edilen değerler, istatistiksel olarak değerlendirildi

5.3.2. İmmünohistokimyasal Yöntem

İmmünohistokimyasal protokol için bouin fiksatifine alınan doku örnekleri, 5-6 saat fiksatif içinde fikse edildikten sonra %1 lityum karbonat içeren %70 alkolde rengi berraklaşana kadar 3-4 banyo halinde bekletildi. Fiksatiften arındığına emin olduğumuz dokular, daha sonra yükselen alkol serilerinden (%70, %90, %96, %100) geçirilerek dehidrate edildi, ksilol ile şeffaflaştırıldı, 60°C'lik etüvde parafinde gece boyunca bekletildikten sonra oda ısısında parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan mikrotomda pozitif şarjlı lamlara alınan 4-5µm kalınlığındaki kesitlere NOS izoformları ve ZO-1 immunohistokimya boyaması uygulandı.

5.3.2.1. NO İzofomlarının (eNOS, iNOS, nNOS) İmmunohistokimya Boyanması

Kesitler, 45°C'deki etüvde bir gece, ertesi sabah 60°C'deki etüvde 1 saat bekletildikten sonra parafinin uzaklaştırılması için 2 kez 10'ar dakika ksilolde tutuldu. Kesitler %100, %90, %80 ve %70'lik alkollerde 5'er dakika tutulduktan sonra 5 dakika distile suda bekletildi. Kesitler, dokudaki antijenik maskelenmeyi ortadan kaldırmak amacıyla, sitrat tamponu (pH 6.0) (Sigma C-2488) içinde Decloacking chamber'da (Bicare Medical DC2008) 110°C'de 40 dakika tutuldu ve 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için oda sıcaklığında ve nemli ortamda %3 hidrojen peroksit (H₂O₂)'de 15 dakika tutulduktan sonra, distile su ile çalkalanıp PBS'ye (Fosfat Buffer Saline, pH:7.2-7.4, Merck 524650) alındı. Hidrofobik kalem (Pappen, DAKO) ile kesitlerin çevresi çizildikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika Ultra V blok (Invitrogen Blocking Solution REF: 859043) uygulandı. Kesitler eNOS (Thermo Scientific Lab Vision Tavşan Pab RB 9279-P) primer antikorda (1:50), iNOS (Thermo Scientific Lab Vision Tavşan Pab RB 9242-P1) primer antikorunda (1:100) ve nNOS (Nova Castro Fare Monoclonal NCL-NOS-1) antikorunda (1:25) 1 gece inkübe edildi. Antikorlar, Large Volume UltraAb Diluent (LabVision TA-125-UD) ile sulandırıldı. Kesitler PBS'de 3-4 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra 20 dakika oda sıcaklığında biyotinlenmiş anti-polyvalent sekonder antikor (Invitrogen Broad Spectrum REF: 859043) ile inkübe edildi. Daha sonra, PBS ile yıkandı ve peroksidaz enzimi ile işaretli streptavidin (Invitrogen HRP–Streptavidin REF: 859043)'de oda sıcaklığında 20 dakika tutuldu. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için 5 dakika 3,3'-Diaminobenzidine, tetrahydrochloride, dihydrate (DAB) (Invitrogen, D22187) kromojen ile inkübe edildikten sonra distile su ile yıkanarak, Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve entellan (Shandon REF: 999040) ile kapatıldı. Dokudaki NOS reaksiyonunun dağılımı, ışık mikroskopunda (Olympus Bx53, Japonya) X200'lük büyütmede incelendi ve fotoğraflandı.

NOS dağılımının immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi, HSCORE kullanılarak yapıldı. eNOS, iNOS ve nNOS'un immünohistokimyasal reaksiyonları, her grubun her bir bireyinde 5 farklı alan olacak şekilde X400 büyütmede değerlendirildi. Değerlendirmeler, rastgele seçilen 5 farklı alanda reaksiyon veren hücrelerin yüzdesi belirlenerek ve reaksiyon yoğunluğu; 0 (reaksiyon yok), 1+ (kontrolden düşük zayıf reaksiyon), 2+ (belirgin) ve 3+ (şiddetli) şeklinde skorlanarak yapıldı. Her bir dokuda bir

HSCORE değeri hesaplandı. Deney gruplarının dokularında, reaksiyon veren hücrelerin yüzdesi (Pi) ile yoğunluğu (i) belirlendi ve $HSCORE = S \cdot Pi^{(i+1)}$ formülüne uygulandı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

5.3.2.2. ZO-1 İmmunohistokimya Boyaması

Pozitif şarjlı lamlara alınan kesitler parafinden uzaklaştırılmak için 5'er dakika 3 kez ksilenden geçirildi. Daha sonra 10'ar dakika 2 kez %100'lük alkolden geçirilerek suya indirildi. Ardından kesitler endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için oda sıcaklığında %3 hidrojen peroksit (H_2O_2)'de 20 dakika süre ile tutuldu. Önce musluk suyundan sonra distile su ile 3 defa çalkalandıktan sonra durulandı. Ardından kesitler, dokudaki antijenik maskelenmeyi ortadan kaldırmak amacıyla, 1/10 luk EDTA içinde Decloacking chamber'da (Bicare Medical DC2008) ($110^\circ C$) 20 dakika tutuldu ve 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Sonra musluk su ile çalkalanıp ardından distile suyunda 3'er kez çalkalanıp durulandı ve kesitler 5'er dakika 2 defa PBS'e (Fosfat Buffer Saline, pH:7.2-7.4, Merck 524650) alındı. Hidrofobik kalem (Pappen, DAKO) ile kesitlerin çevresi çizilerek oda sıcaklığında 10 dakika protein blokajı (Ultra V blok (Invitrogen Blocking Solution REF: 859043) uygulandı. Kesitler 1/100 oranında Zonula okludens-1(ZO-1) (Millipore Anti-ZO-1 Tavşan Polyclonal Antibody AB 2272) ile $+48^\circ C$ 'de bir gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün kesitler PBS'de 2 kez 5'er dakika yıkandı. Ardından 10 dakika oda sıcaklığında sekonder antikor ile inkübasyondan sonra 10 dakika süre ile streptavidin peroksidaz (Invitrogen HRP–Streptavidin REF: 859043) uygulandı. Tekrar kesitler PBS'de 2 kez 5'er dakika yıkandı. Renkli reaksiyon ürünün oluşması için 3-10 dakika AEC kromojen ile inkübe edildi. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı ve gliserol ile kapatıldı. Boyanmış kesitler, ışık mikroskobu (Olympus DP72, Tokyo, Japon) altında X400 ve X1000 büyütmelerde incelenip, fotoğraflandı.

5.4. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) PREPARASYONU

Testislerden alınan doku örnekleri, %2,5'lük 0.1 M PBS tamponlu (pH 7.2) glutaraldehit fiksatifinde +4 °C'de 4 saat fikse edildikten sonra tamponda yıkandı sonrasında %1'lik osmiyum tetroksitle 1 saat postfiksasyon yapıldı. Yükselen alkol serilerinden (%70-5dk, %90-10 dk, %96-10 dk, %100-2x15 dk) geçirilerek dehidrate edildi, ardından dokular propilen oksitten geçirildi. Sonrasında epon 812'ye gömülerek 60 °C'deki etüvde polimerize edildi. Ultramikrotomda (Reichert, Supernova ultramicrotome) alınan yarı ince kesitler (1 µm) toluidin mavisi ile boyandı. Yarı ince kesitlerde yer tayini yapıldıktan sonra bakır gridler üzerine alınan yaklaşık 60 nm kalınlığındaki ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. İnce kesitler, JEOL 1200 SX TEM ile X3000, X5000, X75000, X20000 büyütmelemlerde incelenip fotoğraflandı.

5.5. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi için INSTAT İstatistiksel Paket Programı (Instat GraphPad Software, San Diago, CA, Amerika) kullanıldı. Sonuçlar, ortalama ± standart hata olarak gösterildi. Grupların dağılımlarının normal dağılıma uygunluğu test edildikten sonra, deney grupları tek yönlü varyans analizi uygulanarak, Tukey'in çoklu karşılaştırma testi (Tukey's Multiple Comparison Test) ve Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. IŞIK MİKROSKOBU BULGULARI

Çalışmamızın sonucunda testis biyopsilerinden elde edilen doku örneklerinde spermatozoa içeren ve spermatozoa içermeyen gruplara ait örnekler ışık mikroskopunda incelenerek aralarında oluşan farklılıklar gözlemlendi.

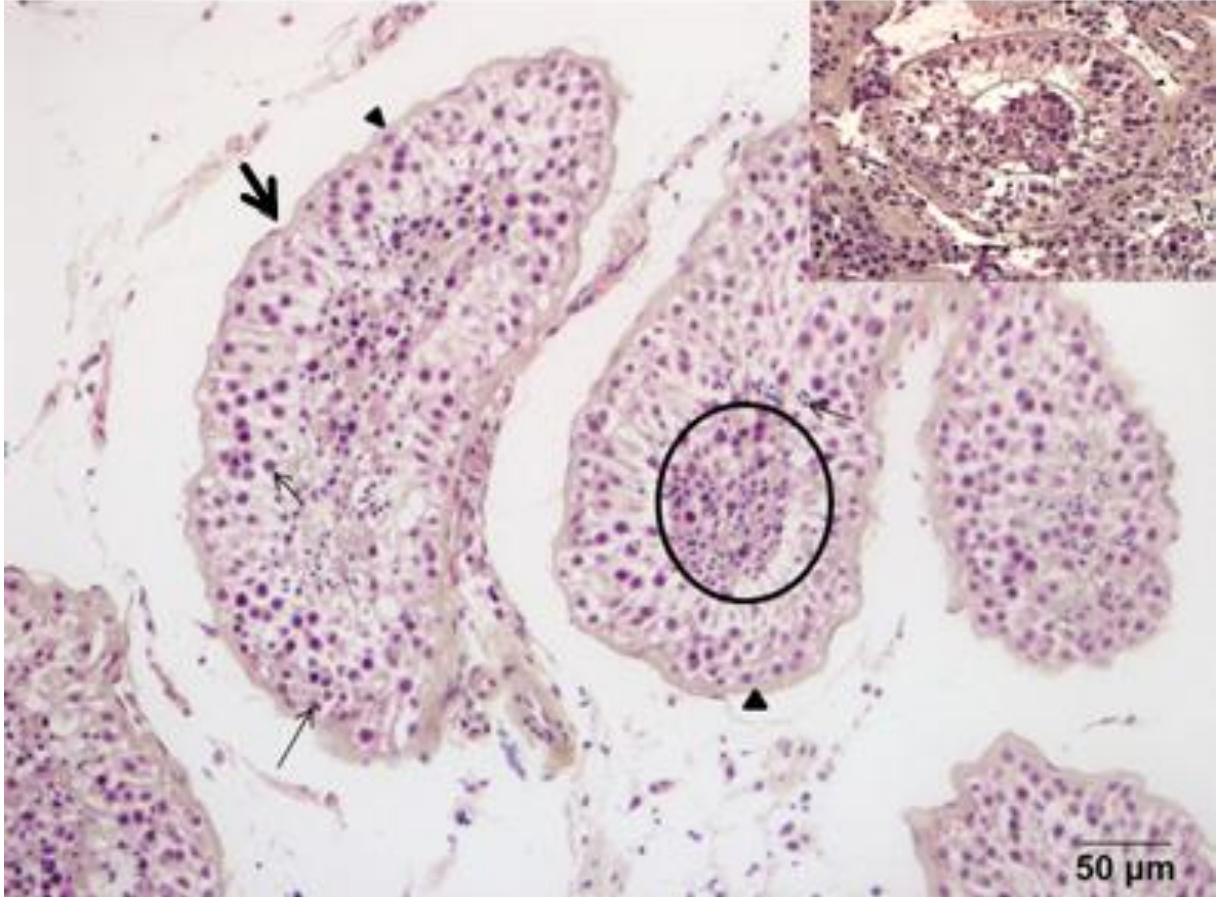
6.1.1. Histokimyasal Değerlendirme

Spermatozoa içeren gruba ait H-E ile boyanmış testis dokuları, ışık mikroskopunda incelendiğinde, seminifer tubüllerin birçoğunda bazal membranının hücrelerle ilişkide olduğu, tubül duvarında bulunan spermatogenezin farklı evrelerindeki hücrelerin birbiriyle etkileşimde olduğu görüldü. Tubül duvarını oluşturan spermatogenik seriye ait hücrelerin diziliminde düzensizlikler ile özellikle spermatogonyumlarda hipertrofi ile birlikte sitoplazmalarında boyanmayan alanların olduğu belirlendi (Resim 1). Ayrıca, spermatidlerin ve kondense nukleusa sahip olan primer spermatositin belirgin olarak gözlenebildiği tespit edildi. Testis dokusunda bazı alanlarda, sadece Sertoli hücrelerini içeren seminifer tubüller gözlemlendi. Bu tubüllerde, Sertoli hücrelerin sitoplazmalarında eozinle boyanmamış şeffaf alanlar görüldü. Birçok seminifer tubüllerin lümeninde spermatogenik seriye ait farklı evrelerde hücre toplulukları ile hücre kalıntılarına rastlandı. Masson'un üçlü boyaması yapılan kesitlerde seminifer tubülleri çevreleyen interstisyel alanda bağ doku düzeninin bozulduğu, bazı alanlarda ödem ve kanama alanlarının olduğu belirlendi (Resim 2).

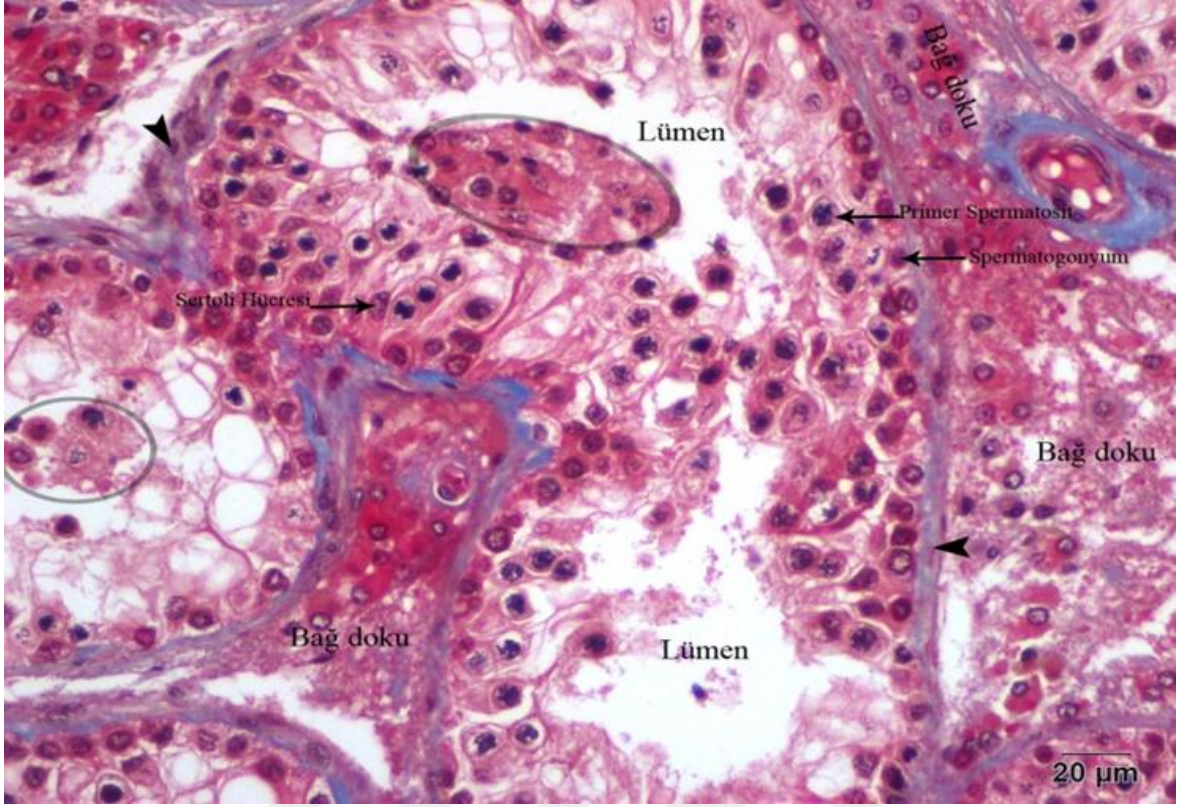
Spermatozoa içermeyen gruba ait H-E ile boyanan testis dokusu, ışık mikroskopunda incelendiğinde, seminifer tubül yapısının bozulduğu, sadece bazı tubüllerde spermatogonyumların görüldüğü, spermatogenezin diğer evrelerindeki hücrelerin görülmediği belirlendi. Ayrıca düzensiz yapıya sahip olan Sertoli hücreleri olduğu tespit edildi. Masson'un üçlü boyaması yapılan kesitlerde birçok alanda, sadece çok kalın bazal membranın mevcut olduğu ve tubül duvarında tüm hücrelerin kaybolduğu hiyalinleşmiş seminifer tubüller görüldü. Bunlarla birlikte, tubül duvarındaki hücrelerin intersellüler

bağlantılarını ve bazal membran ile olan bağlantılarını kaybettiği dejenere olmuş seminifer tubüllerin olduğu belirlendi. Seminifer tubülleri çevreleyen interstisyel dokuda kalınlaşma ile bağ doku düzeninin bozulduğu ve bazı alanlarda ödemin ve kanama alanlarının olduğu tespit edildi (Resim 3-4).

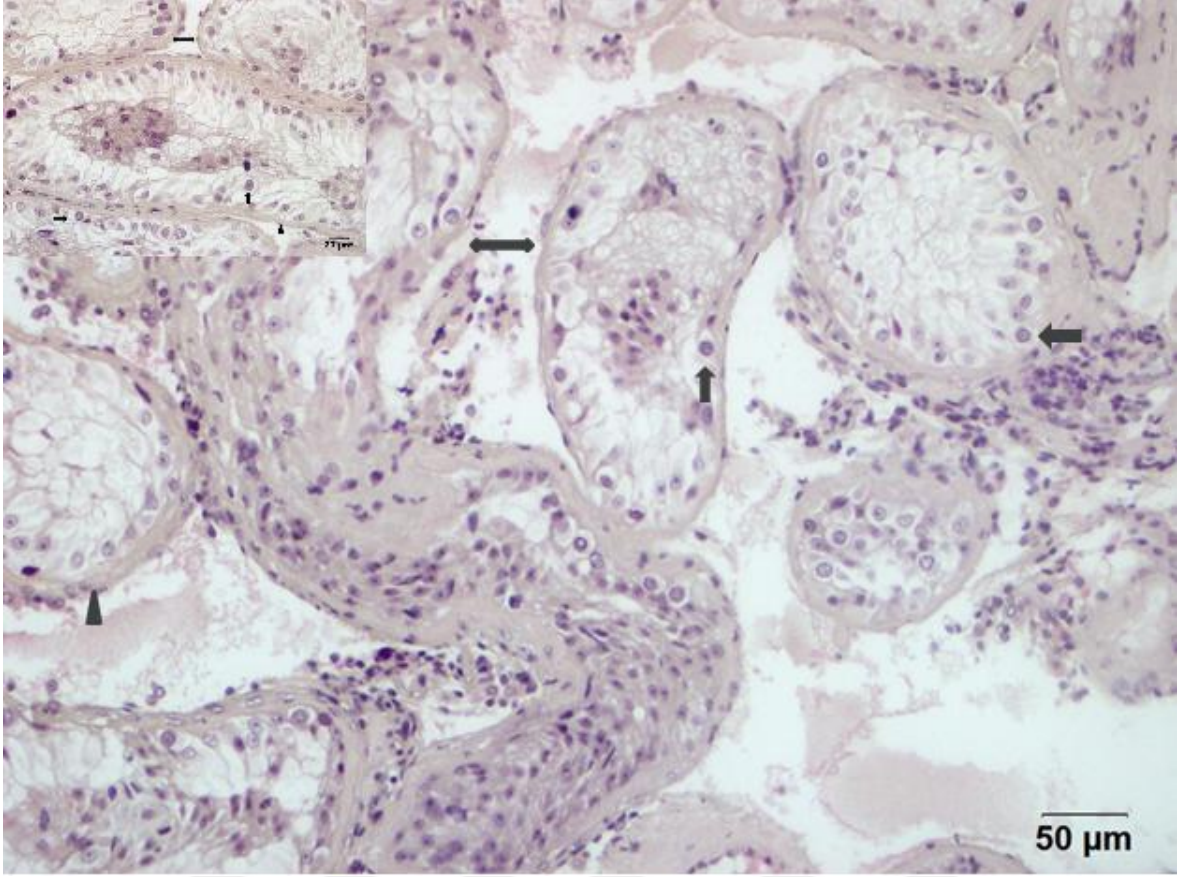
Spermatozoa içermeyen grubun testis dokuları ışık mikroskopunda incelendiğinde, spermatozoa içeren gruba göre seminifer tubülleri çevreleyen interstisyel alanda mast hücre sayısında artış görüldü. Buna bağlı olarak tubül duvarlarında fibrotik değişiklikler gözlemlendi (Resim5,6). İki gruba ait mast hücre sayımları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde spermatozoa içermeyen grupta ($18,5 \pm 7,31$) spermatozoa içeren gruba oranla ($9,66 \pm 5,64$) mast hücrelerinin anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0.05$) (Grafik1).



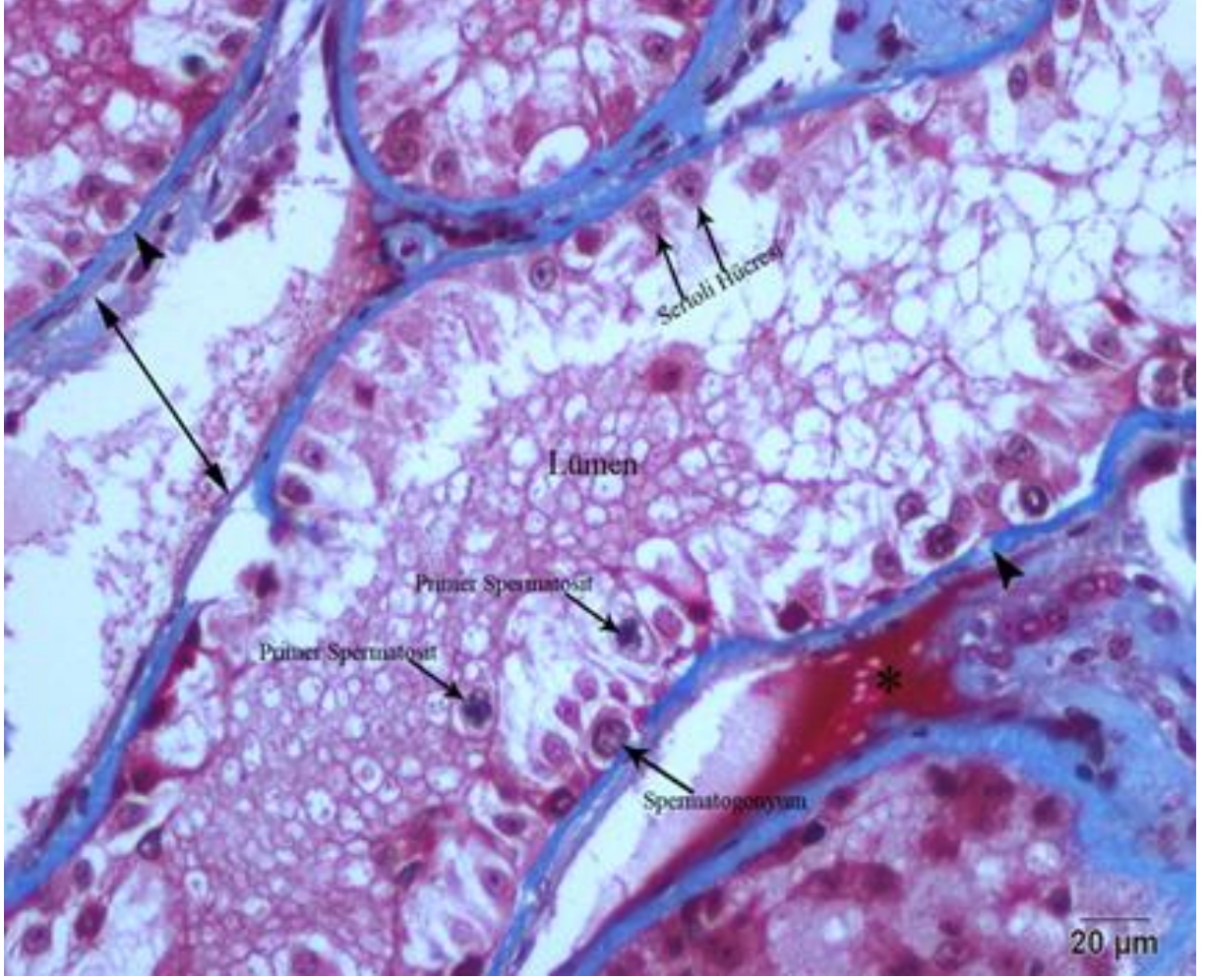
Resim 1: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunda, seminifer tubülde spermatogonyum, primer spermatisit, spermatid, Sertoli hücresi(→), miyoid hücre (→), bağ doku, bazal membran (▶) ve tubül lümenindeki yapılar (○). Bar: 50 µm, İncet Bar:20 µm,H-E boyama.



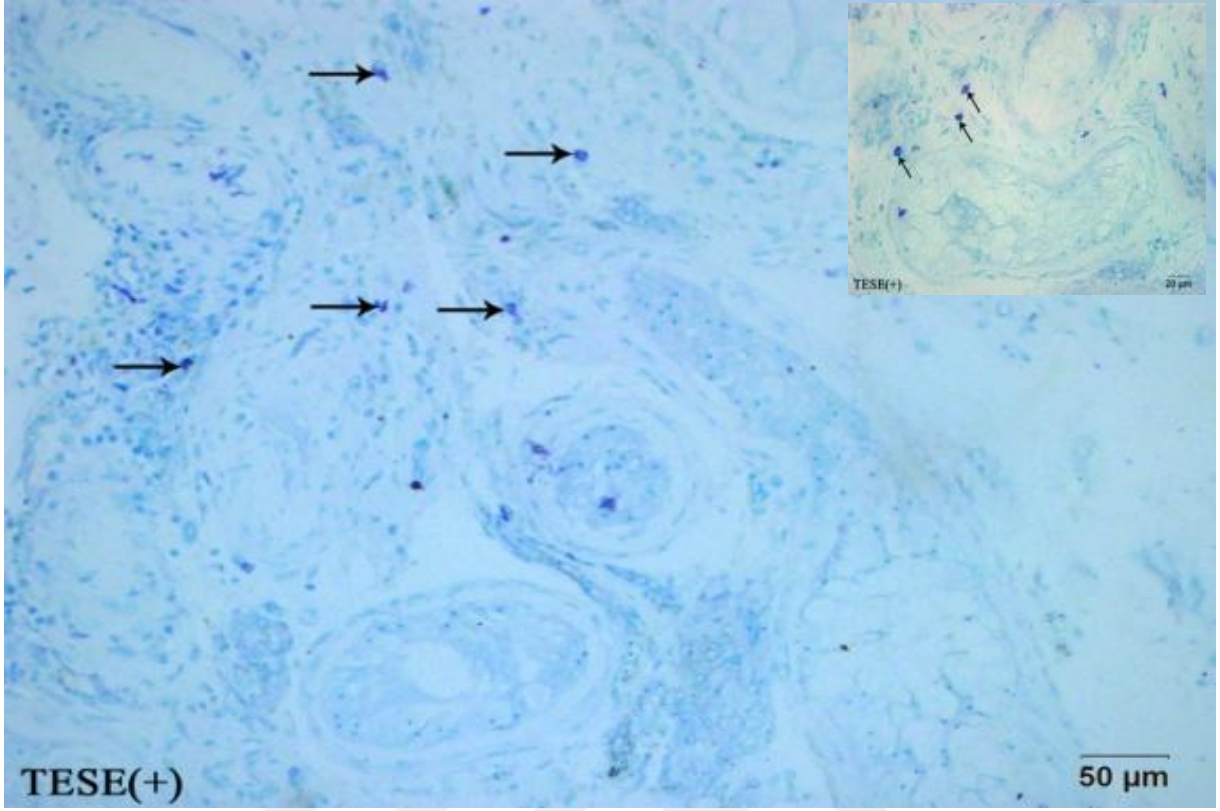
Resim 2: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunda, seminifer tubülde spermatozoid, primer spermatozoid, sekonder spermatozoid, Sertoli hücresi, spermatozoid, bağ doku, bazal membran (▶) ve tubül lümenindeki yapılar (○). Bar: 20µm, Masson'un üçlü boyaması.



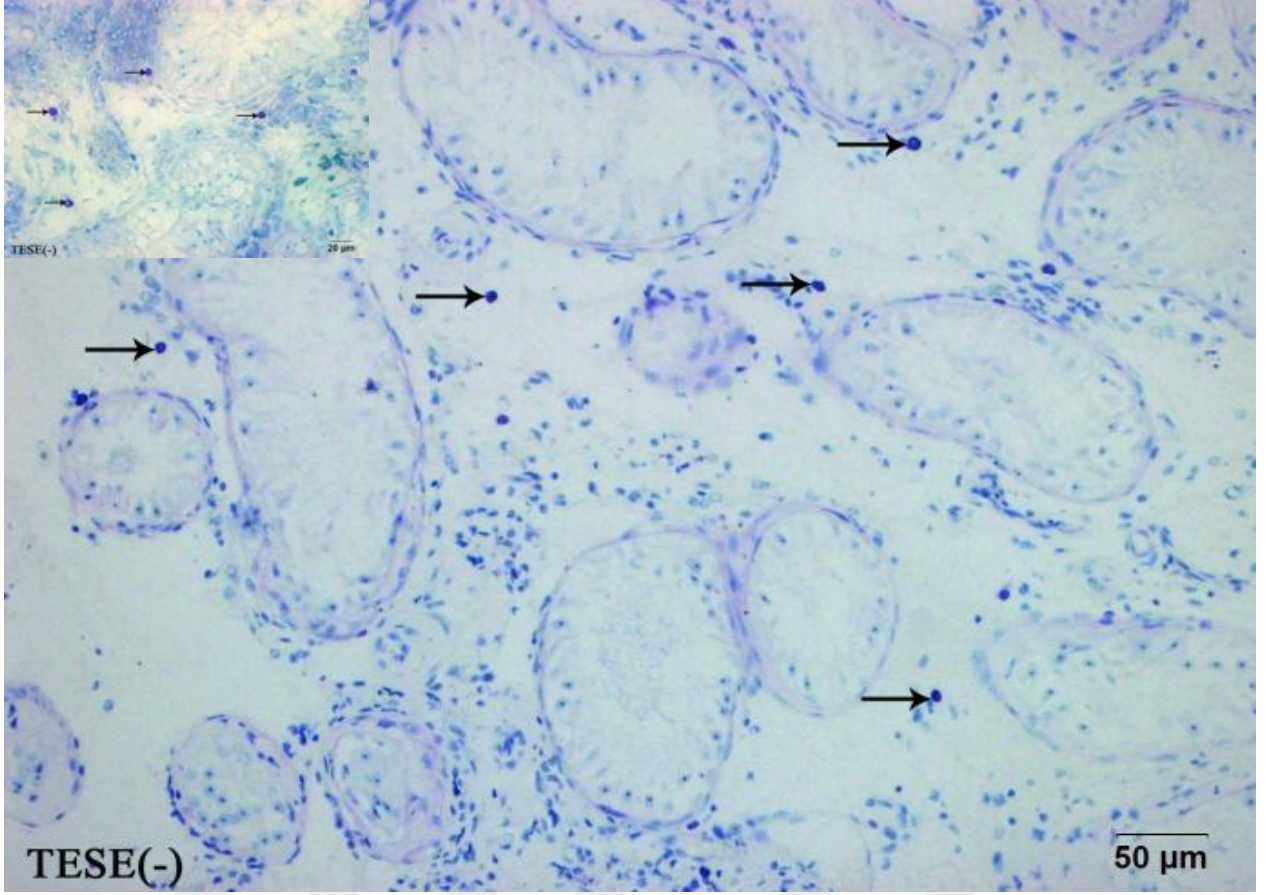
Resim 3: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunda, sertoli hücresi (→), seminifer tubüller, interstisyel alan (↔) bağ doku ve bazal membran(▶) Bar: 50µm, İncet: 20 µm, H-E boyama.



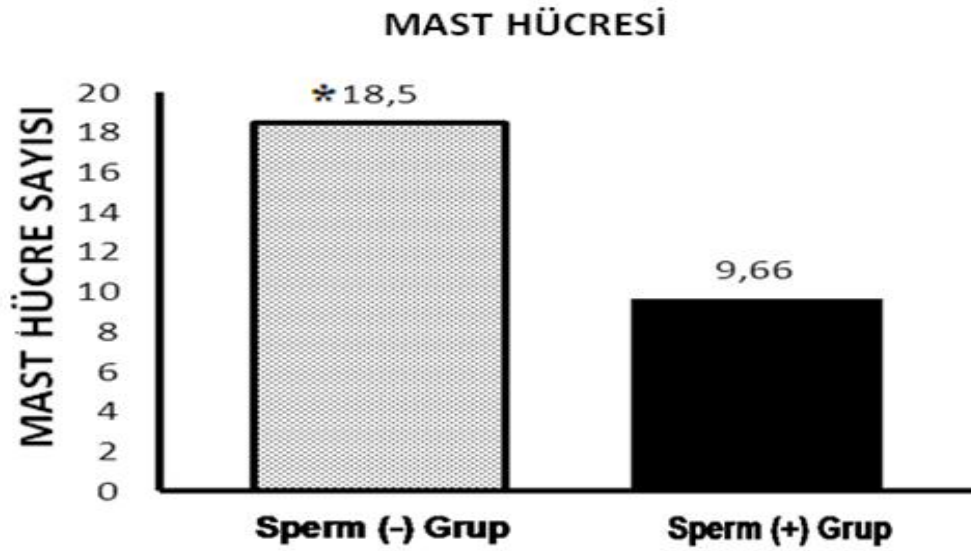
Resim 4: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunda, seminifer tubüller, interstisyel alan, bağ doku (↔), kanama alanları (*) ve bazal membran (▶). Bar: 20 µm, Masson'un üçlü boyaması.



Resim 5: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunun Toluidin mavisi boyaması ile histokimyasal gösterimi. İnterstisyel alandaki mast hücreleri (→). Bar: 50µm, İnet Bar: 20 µm.



Resim 6: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunun Toluidin mavisi boyaması ile histokimyasal gösterimi. İnterstisyel alandaki çok sayıda mast hücresi (→). Bar: 50 µm, İnset Bar: 20 µm.



Grafik 1: Spermatozoa içermeyen ve spermatozoa içeren gruplar arasında yapılan kıyaslama sonucunda aradaki fark anlamlı bulundu ($p < 0.05$).

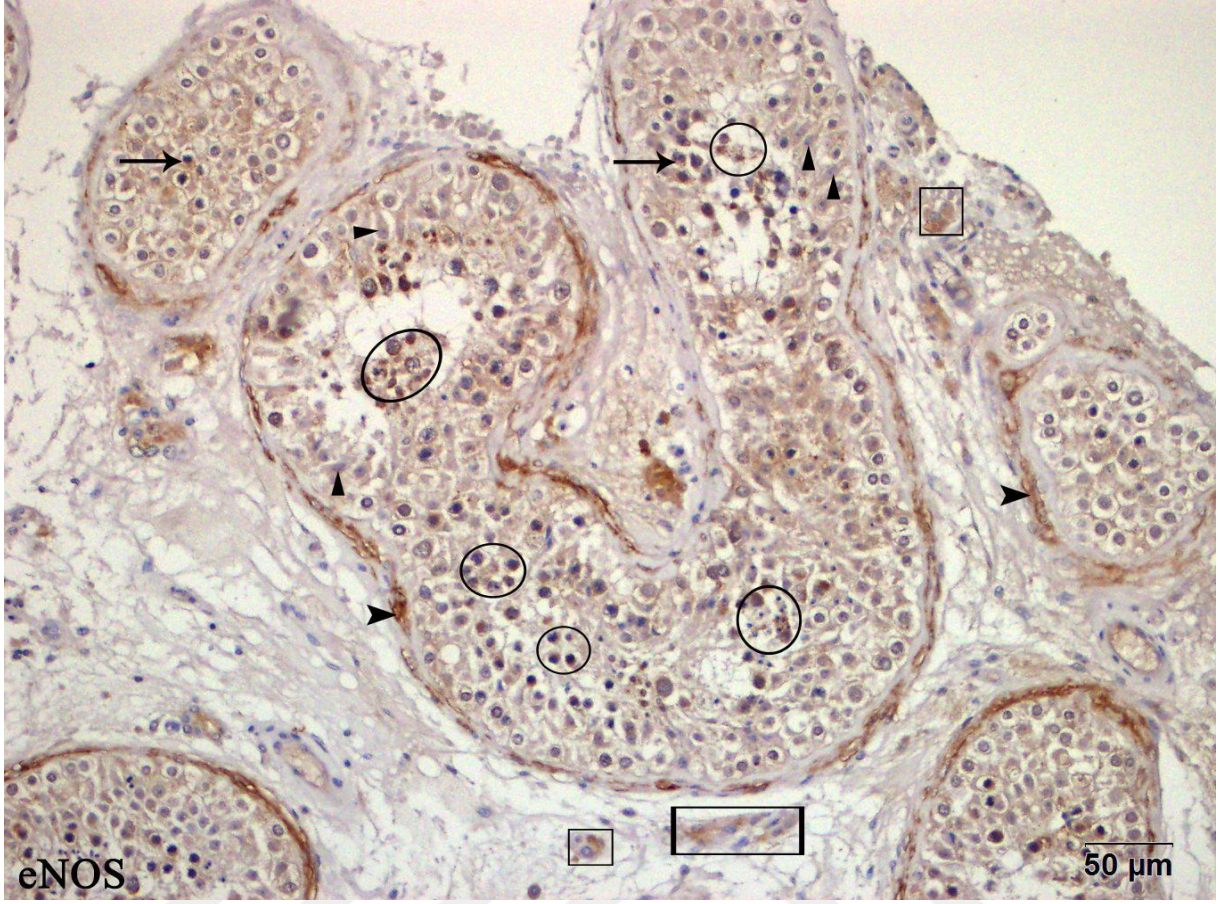
6.1.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

6.1.2.1. NO izoformlarının (iNOS, eNOS, nNOS, ZO-1) İmmunohistokimyasal Değerlendirilmesi

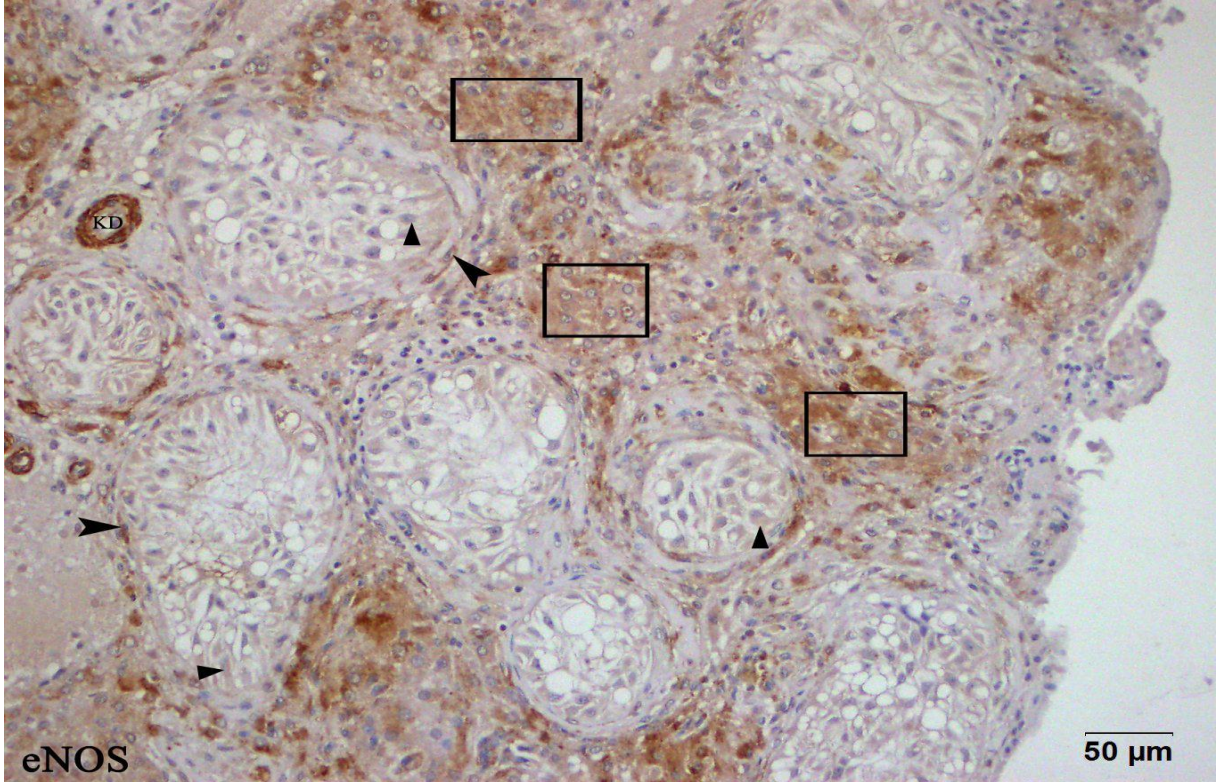
eNOS İmmunohistokimya Bulguları:

Testis biyopsilerinden elde edilen doku örneklerinde spermatozoa içeren gruba (127.9±4.86) ait eNOS immun reaksiyonunun spermatozoa içermeyen gruba (105.±4.6) göre anlamlı olarak fazla olduğu ($p<0.001$) belirlendi (Grafik 2). Reaksiyon özellikle seminifer tubüllerin çevresinde yer alan miyoid hücrelerde, Sertoli hücrelerinde ve primer spermatositlerde gözlemlendi. Bunun yanı sıra, seminifer tubül lümenindeki spermatogenik seriye ait hücrelerde de eNOS reaksiyonunun olduğu belirlendi. Ayrıca eNOS reaksiyonunun, interstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerinde ve kan damarlarında da olduğu görüldü (Resim 6).

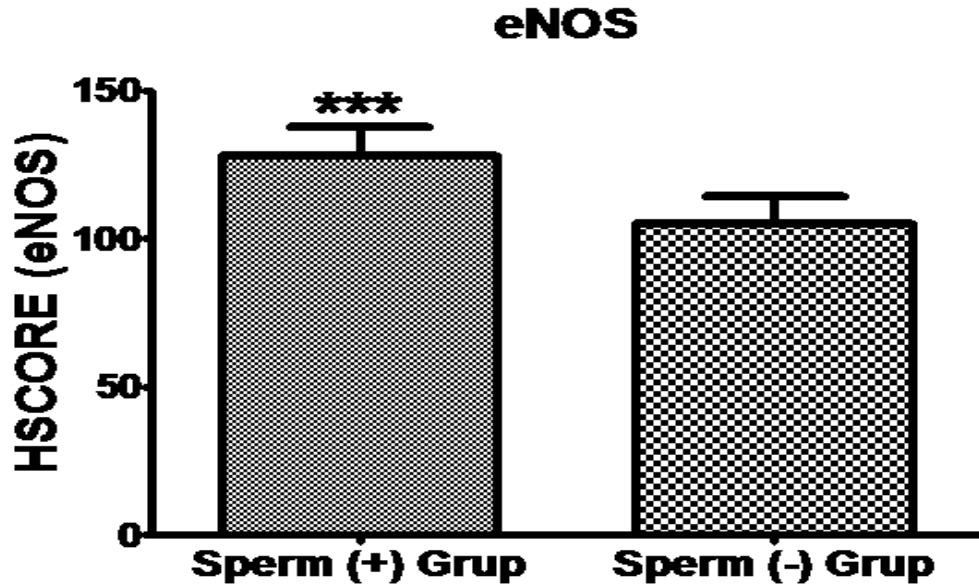
Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokularında eNOS reaksiyonunun spermatozoa içeren gruba göre az olduğu tespit edildi. eNOS reaksiyonu bağ dokuda, miyoid hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde gözlemlendi. Ayrıca eNOS reaksiyonunun, interstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerinde ve kan damarlarında da olduğu görüldü (Resim 7).



Resim 6: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunda, seminifer tubüllerde primer spermatisitte (▶), Sertoli hücrelerinde (→), miyoid hücrelerinde (▶), tubül lümenindeki hücrelerde (○) ve Leydig hücrelerinde (□) eNOS reaksiyonu. Bar: 50 µm.



Resim 7: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunda, seminifer tubüllerde Sertoli hücrelerinde (▴), miyoid hücrede (▶), kan damarında (KD) ve Leydig hücrelerinde (□) eNOS reaksiyonu. Bar: 50 μm

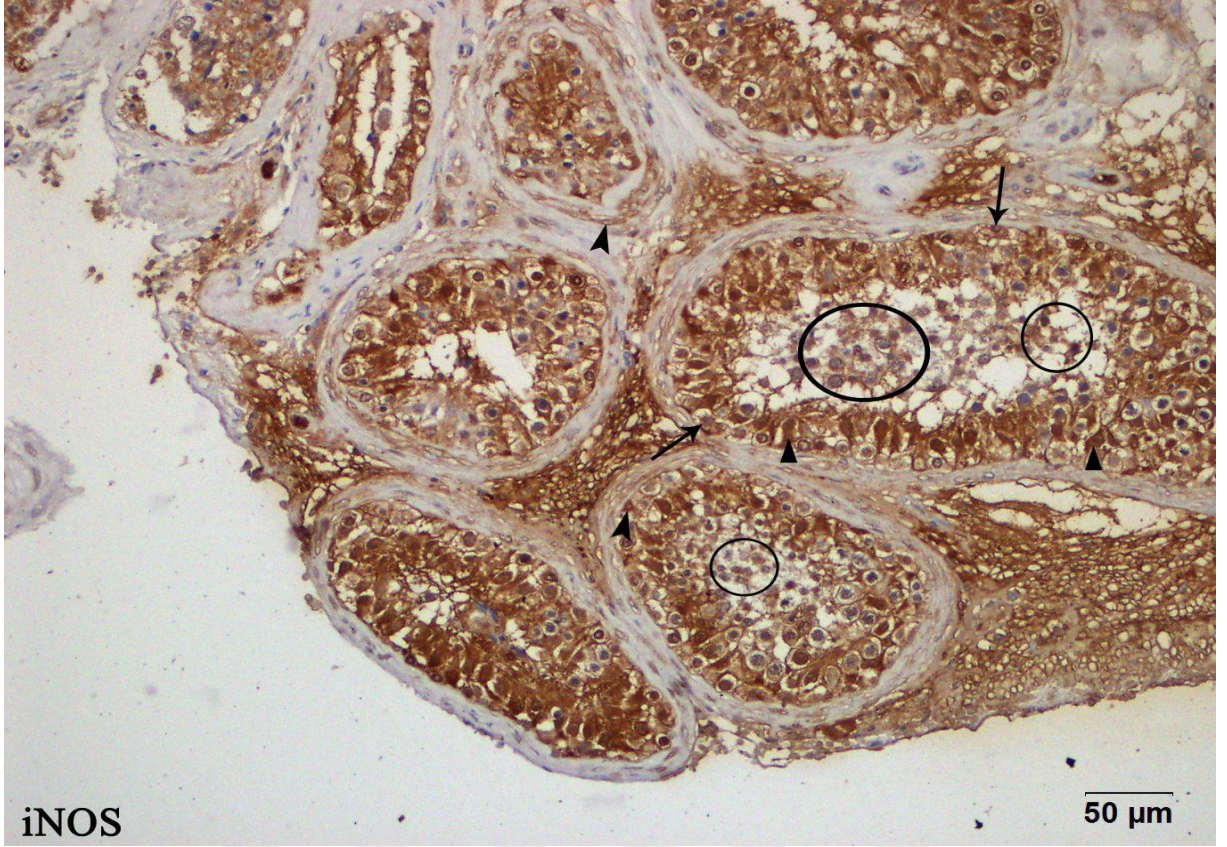


Grafik 2: Spermatozoa içeren gruba ait eNOS immün reaksiyonunun spermatozoa içermeyen gruba göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0.001$).

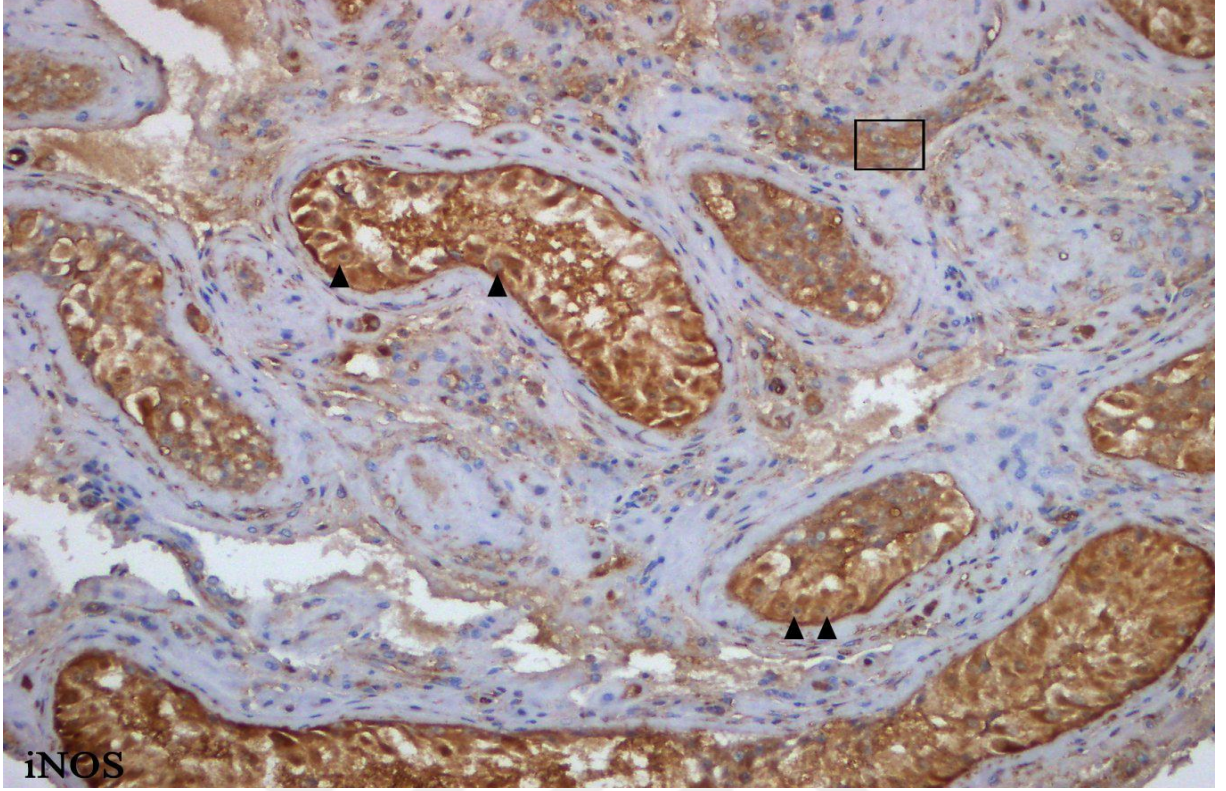
iNOS İmmunohistokimya Bulguları:

Spermatozoa içeren gruba (228.7 ± 6.67) ait iNOS immün reaksiyonunun spermatozoa içermeyen gruba (254.4 ± 8.50) göre az olduğu, spermatozoa içermeyen grupta ise reaksiyonun anlamlı olarak fazla olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Grafik 3). Ayrıca iNOS reaksiyonunun, eNOS reaksiyonuna göre çok daha fazla olduğu görüldü. Seminifer tubüllerde, miyoid hücrelerde, spermatogonyumlarda, primer spermatositlerde ve Sertoli hücrelerinde reaksiyon çok belirgindi. Bunun yanı sıra, seminifer tubül lümenindeki spermatogenik seriye ait hücrelerde, interstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerinde ve bağ dokusunda da iNOS reaksiyonunun olduğu belirlendi (Resim 8).

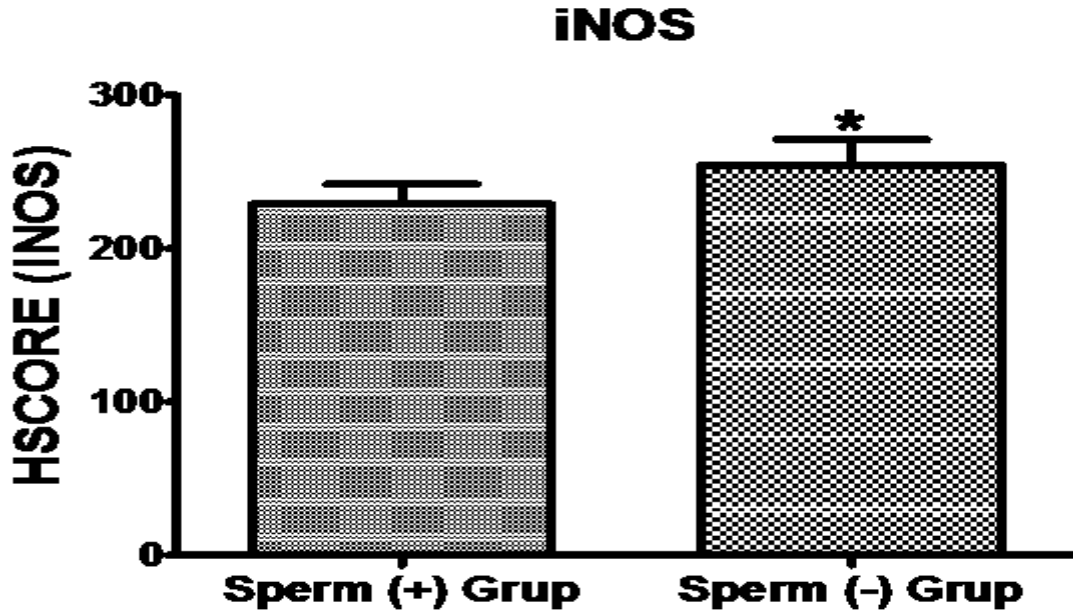
Spermatozoa içermeyen gruba ait iNOS immün reaksiyonunun eNOS reaksiyonuna göre çok daha fazla olduğu görüldü. Seminifer tubüllerde yer alan tüm hücrelerde özellikle Sertoli hücrelerinde reaksiyon çok belirgindi. Bunun yanı sıra, seminifer tubül lümenindeki spermatogenik hücrelerde, interstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerinde ve bağ dokusunda da iNOS reaksiyonunun çok yoğun olduğu belirlendi (Resim 9).



Resim 8: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunda, seminifer tubüllerde spermatogonyumda (→), primer spermatisitte (▶), miyoid hücrede (▶) ve tubül lümenindeki yapılarda (O) iNOS reaksiyonu. Bar: 50 µm



Resim 9: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunda, seminifer tubüllerde Sertoli hücrelerinde (►) ve Leydig hücrelerinde (◻) iNOS reaksiyonu. Bar: 50 µm

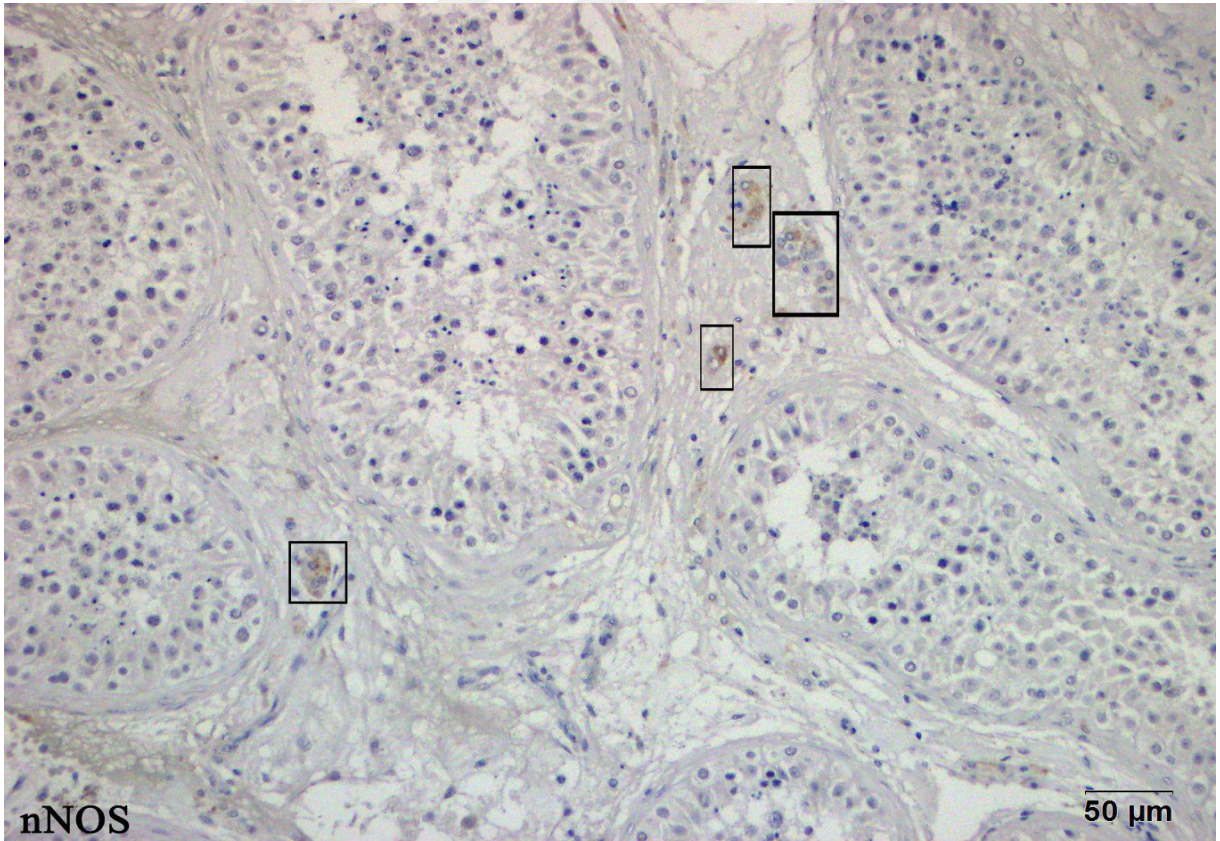


Grafik 3: Spermatozoa içermeyen gruba ait iNOS immün reaksiyonunun spermatozoa içeren gruba göre anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p < 0.05$).

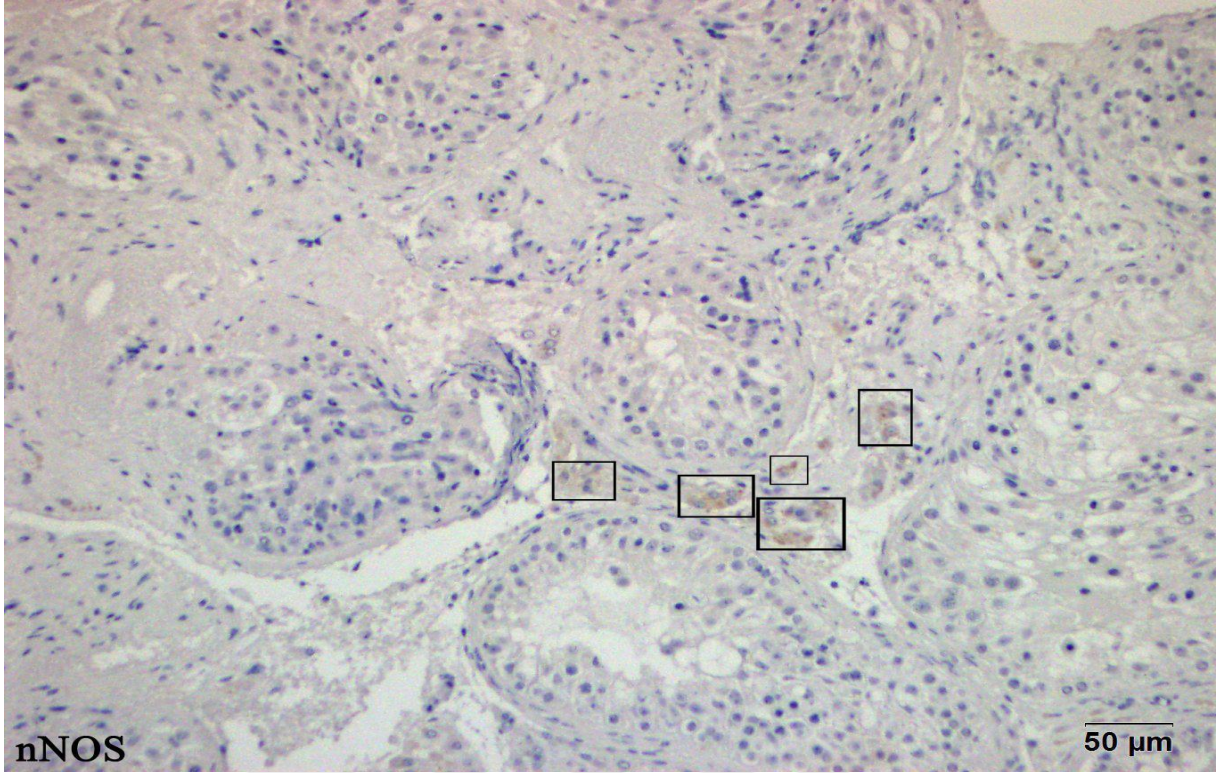
nNOS İmmunohistokimya Bulguları:

Spermatozoa içeren gruba ait nNOS immün reaksiyonunun spermatozoa içermeyen gruba ait nNOS reaksiyonuna benzer olduğu tespit edildi. nNOS immün reaksiyon yoğunluğu spermatozoa içeren gruplar (92.50 ± 3.819) ile spermatozoa içermeyen gruplar (87.5 ± 5.29) arasında anlamlı bir fark bulunamadı (Grafik 4). nNOS reaksiyonunun, interstisyel alanda yer alan bağ doku hücreleri ile Leydig hücrelerinde olduğu görüldü. Seminifer tubüllerde yer alan diğer hücrelerde nNOS reaksiyonuna rastlanmadı (Resim 10).

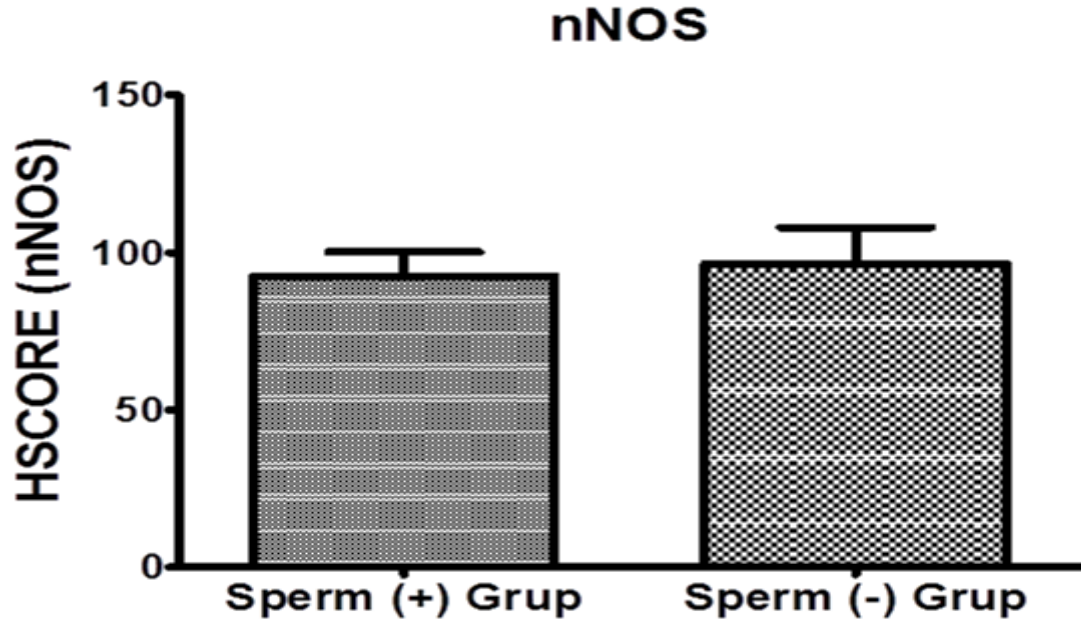
Spermatozoa içermeyen gruba ait nNOS immün reaksiyonunun spermatozoa içeren gruba benzer olduğu belirlendi. nNOS reaksiyonunun interstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerinde olduğu görüldü. Seminifer tubüllerde yer alan diğer hücrelerde nNOS reaksiyonuna rastlanmadı (Resim 11).



Resim 10: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunda, interstisyel alanda Leydig hücrelerinde (□) nNOS reaksiyonu. Bar: 50 µm.



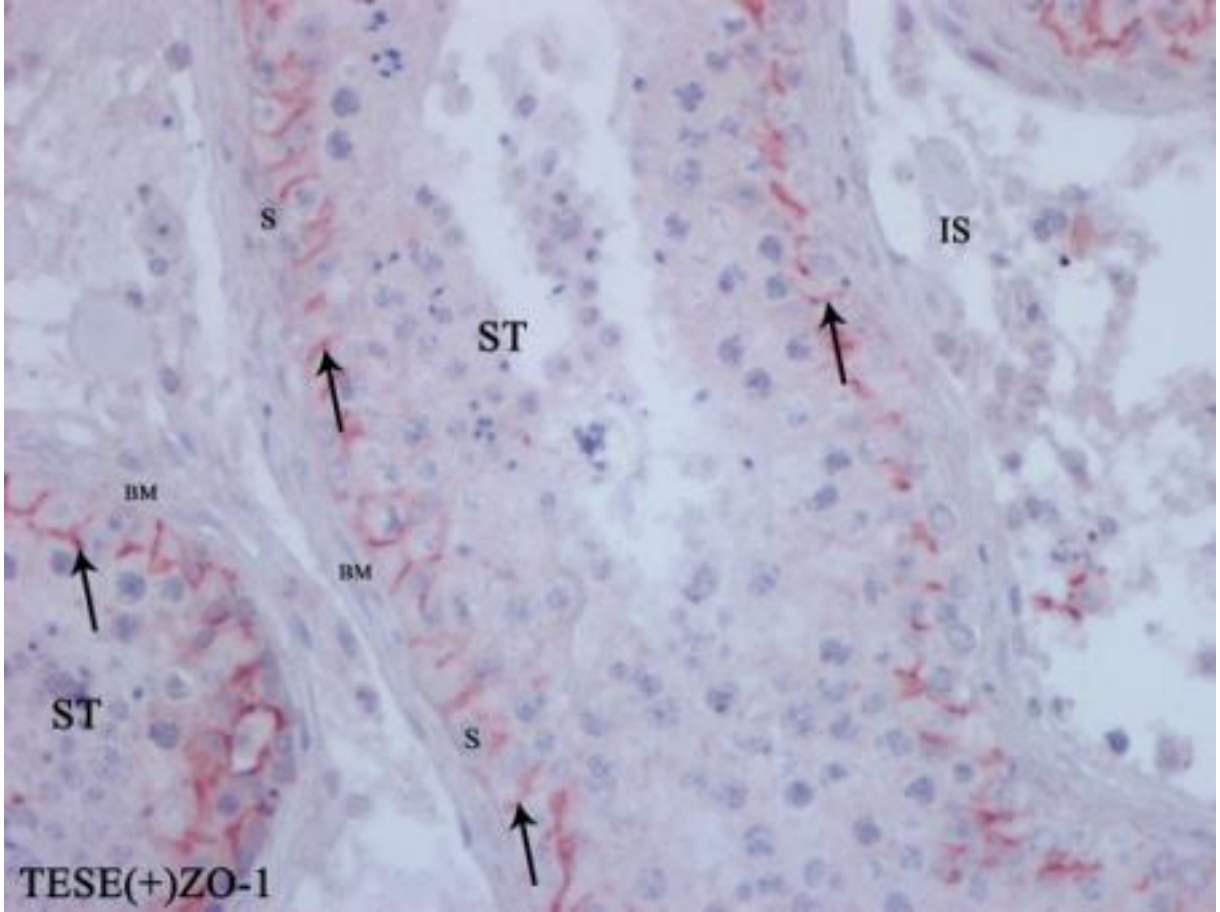
Resim 11: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunda, interstisyel alanda Leydig hücrelerinde (□) nNOS reaksiyonu. Bar: 50 µm



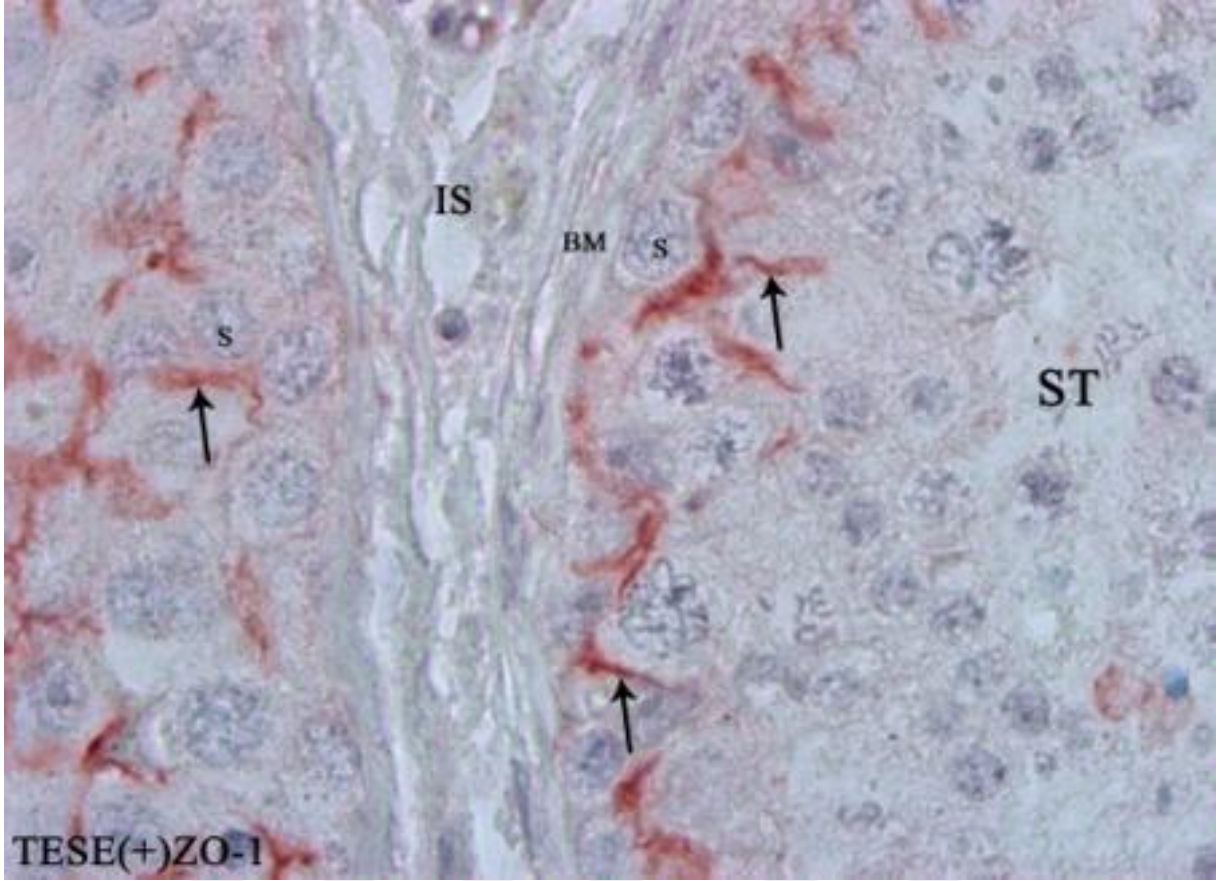
Grafik 4: Spermatozoa içermeyen gruba ait nNOS immün reaksiyonunun spermatozoa içeren gruba göre anlamlı olarak bir farklılık gözlenmedi.

6.1.2.2. ZO-1 İmmunohistokimya Değerlendirmesi

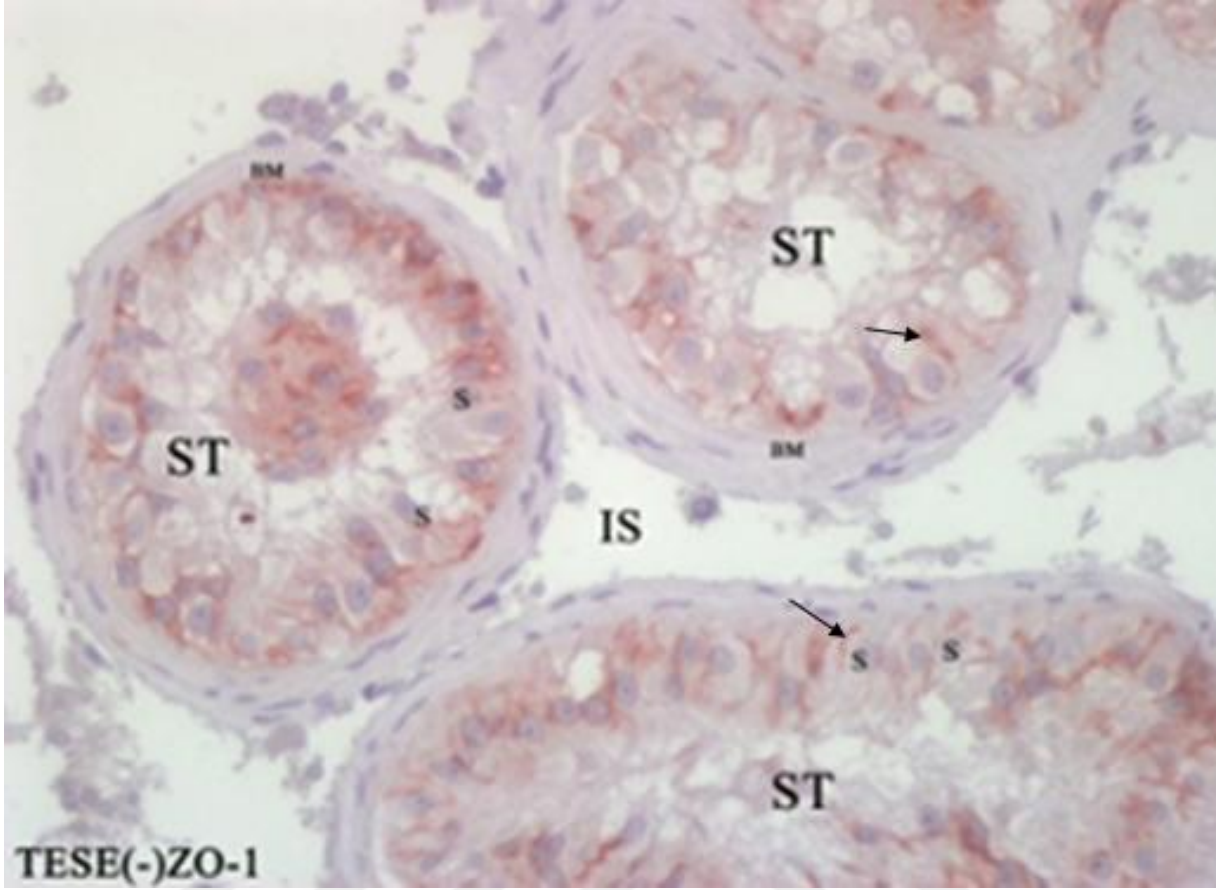
Testis biyopsilerinden elde edilen doku örneklerinde spermatozoa içeren gruba ait ZO-1 immunohistokimyasında Sertoli hücreleri arasında normal ZO-1 reaksiyonu gözlemlendi (12A,12B). Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunda bazı alanlarda, sadece Sertoli hücrelerini içeren seminifer tubüller gözlemlendi ve bu grupta Sadece Sertoli Hücre Sendromu (SSHS) tespit edildi. Spermatozoa içermeyen gruba ait seminifer tubüllerin bazal kompartmanın bir kısmında ve adluminal bölgeyi kaplayan yan yüzeyinde ZO-1 immun reaksiyonu görüldü (13A,13B).



Resim 12A: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunda Sertoli hücreleri (S) arasında normal ZO-1 (→) reaksiyonu mevcuttur. Seminifer tubüllerin (ST) çapı normal olup ve Sertoli hücreleri ve spermatogenik seriye ait hücreler ile döşelidir. Seminifer tubüller bazal membranla (BM) çevrili olup interstisyumda (IS) Leydig hücreleri normal görünürler. Büyütme: X400.



Resim 12B: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunda Sertoli hücreleri (S) arasında normal ZO-1 (→) reaksiyonu mevcuttur. Seminifer tubüllerin (ST) çapı normal olup ve Sertoli hücreleri ve spermatogenik seriye ait hücreler ile döşelidir. Seminifer tubüller bazal membranla (BM) çevrili olup interstisyumda (IS) Leydig hücreleri normal görünürler. Büyütme: X1000.



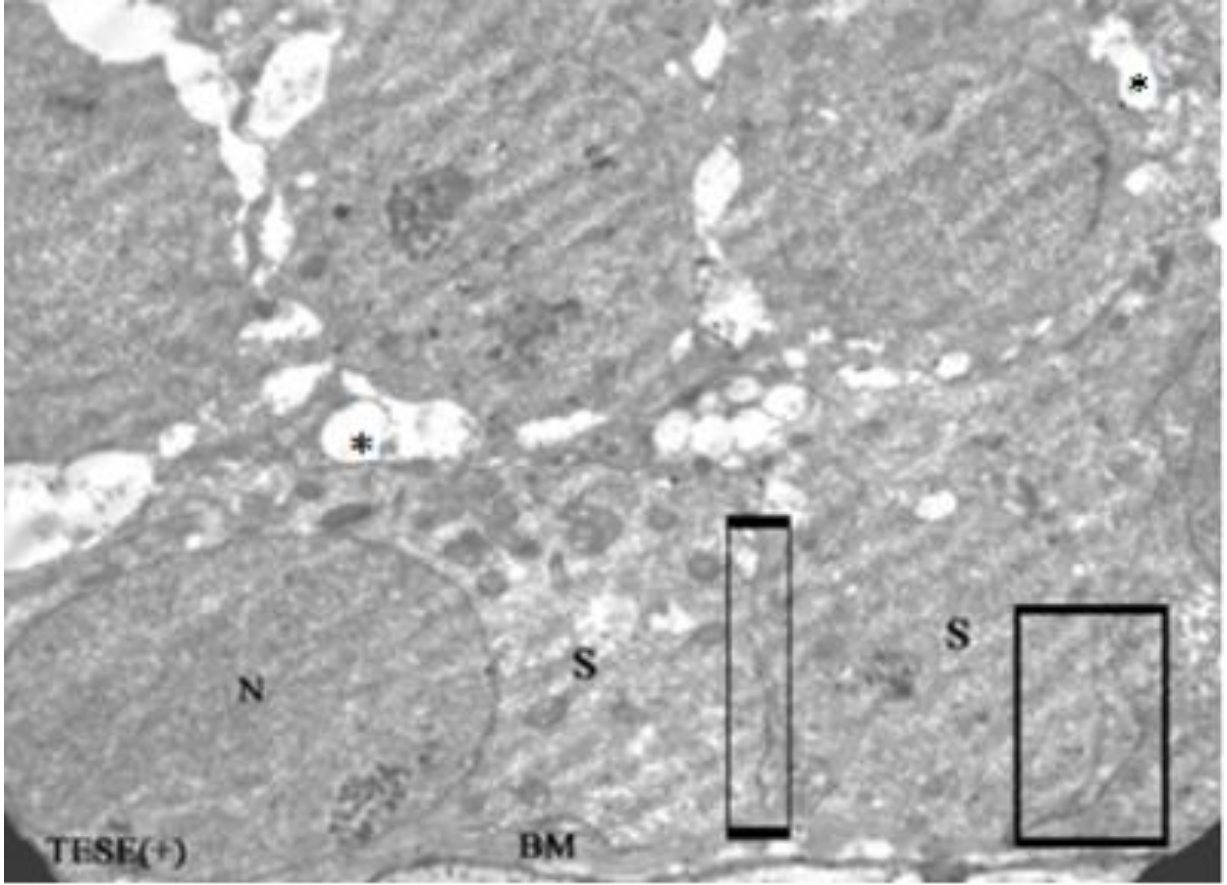
Resim 13A: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunda tubüllerde SSHS tespit edilmiştir. Seminifer tubüllerin (ST) bazal kompartmanın bir kısmında ve adluminal bölgeyi kaplayan yan yüzeyinde de ZO-1 (→) boyanması görüldü. İnterstisyum alanı(IS), Sertoli (S) Büyütme: X400.



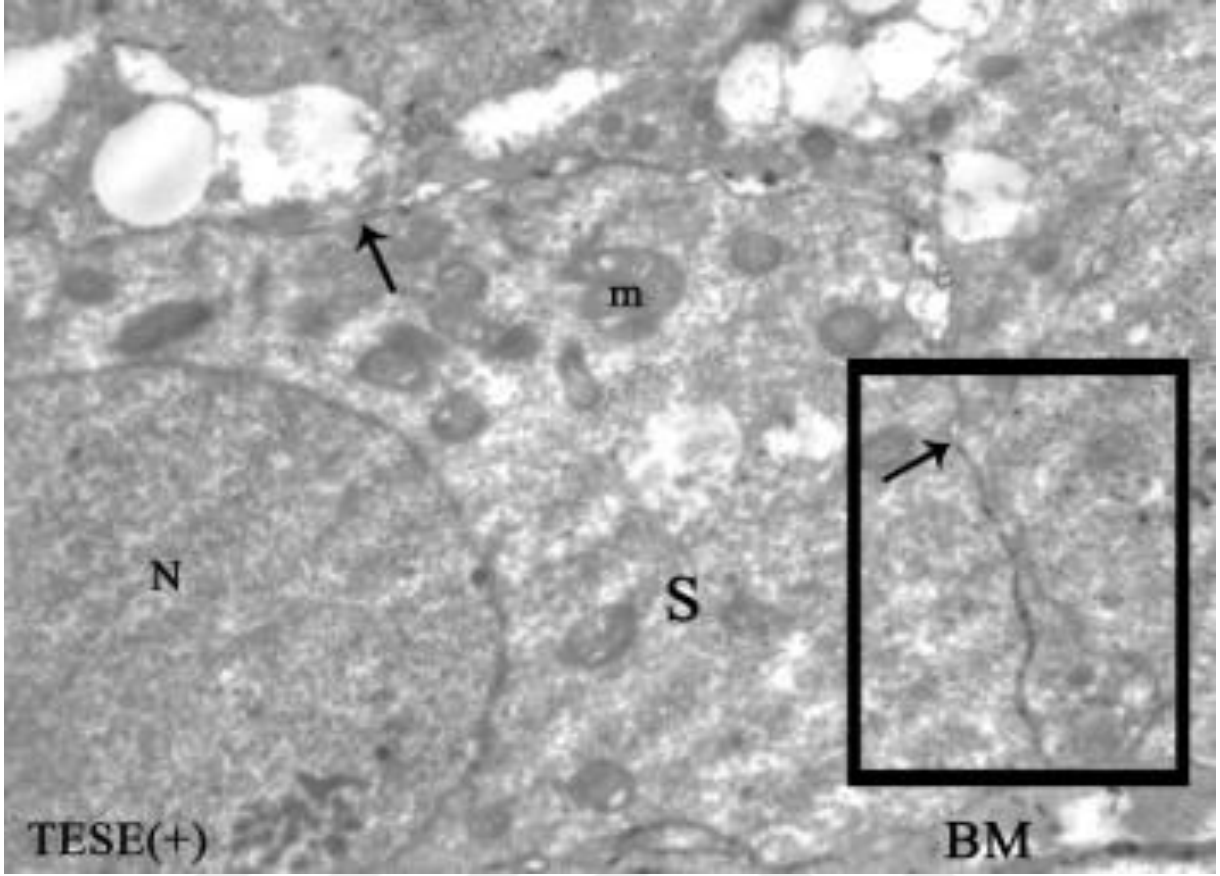
Resim 13B: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunda tubüllerde SSHS tespit edilmiştir. Seminifer tubüllerin (ST) bazal kompartmanın bir kısmında ve adluminal bölgeyi kaplayan yan yüzeyinde de ZO-1 (→) boyanması görüldü. Bazal Membran(BM), İnteristiyum alanı(IS), Sertoli (S) Büyütme: X1000.

6.2. GEÇİRİMLİ ELEKTRON MİKROSKOBU (TEM) BULGULARI

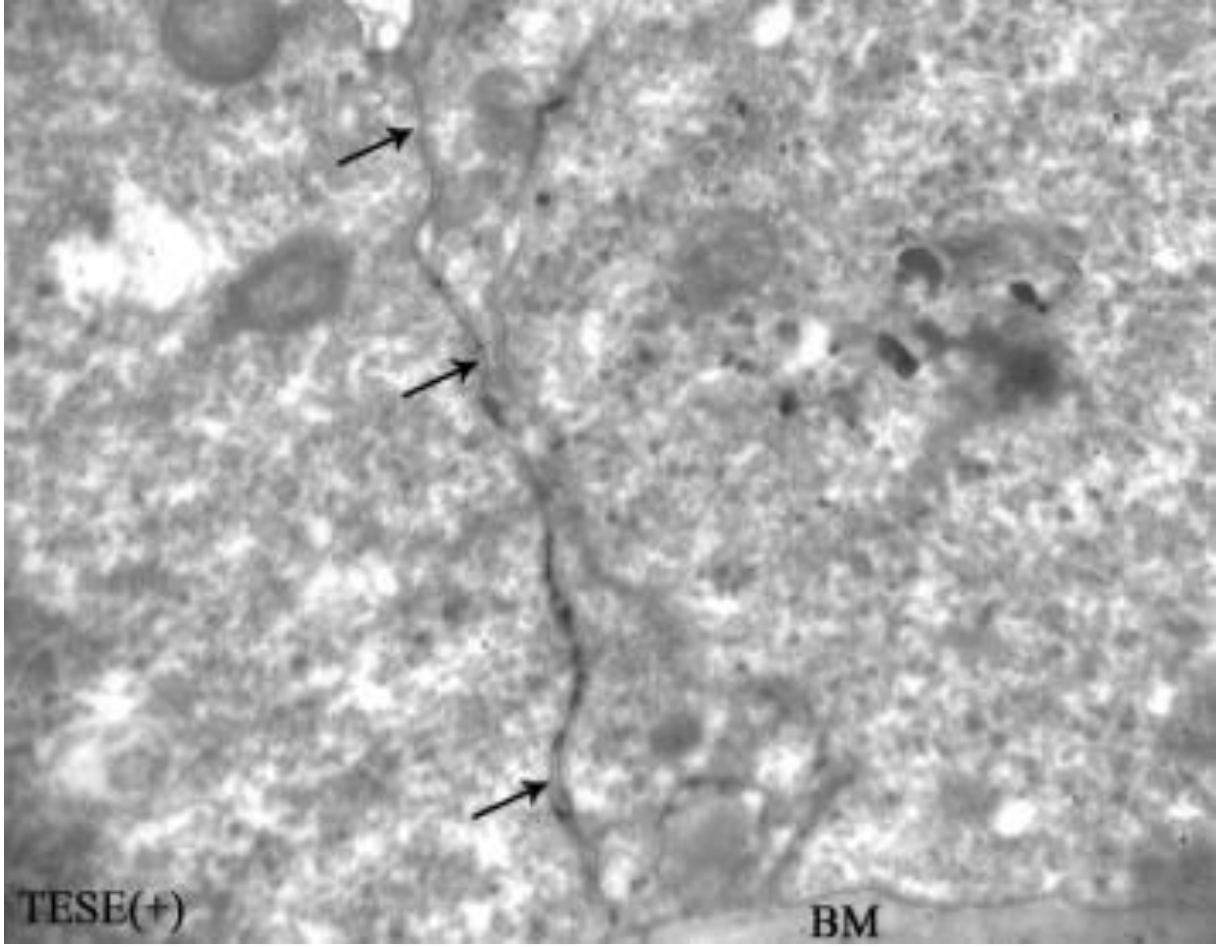
Spermatozoa içeren grubun testis dokuları geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) incelendiğinde, seminifer tubülleri çevreleyen bazal membran ve bu membranın altında ince düzgün kollajen fibril ağı bulunmaktaydı. Bazal kompartmanda yer alan spermatogoniya'nın bir seri hücre bölünmesi sonucu oluşan primer spermatosit ve sitoplazmasında çok sayıda büyük lipid inklüzyonları gözlemlendi. Seminifer tubül içerisinde bulunan Sertoli hücreleri arasında sıkı bağlantılar görüldü (Resim 14A,14B,14C). Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunda ise peritubüler duvarın artan kollajen liflerinden dolayı kalınlaştığı gözlemlendi. Bazal membranla çevrili olan tubüler duvarında çoğunlukla Sertoli hücreleri gözlemlendi. Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında vakuolize olmuş hiyalin maddeleri görüldü. Ayrıca sıkı bağlantılar, Sertoli hücrelerinin tüm lateral yüzeyi boyunca gözlemlendi. (Resim 15A,15B,15C)



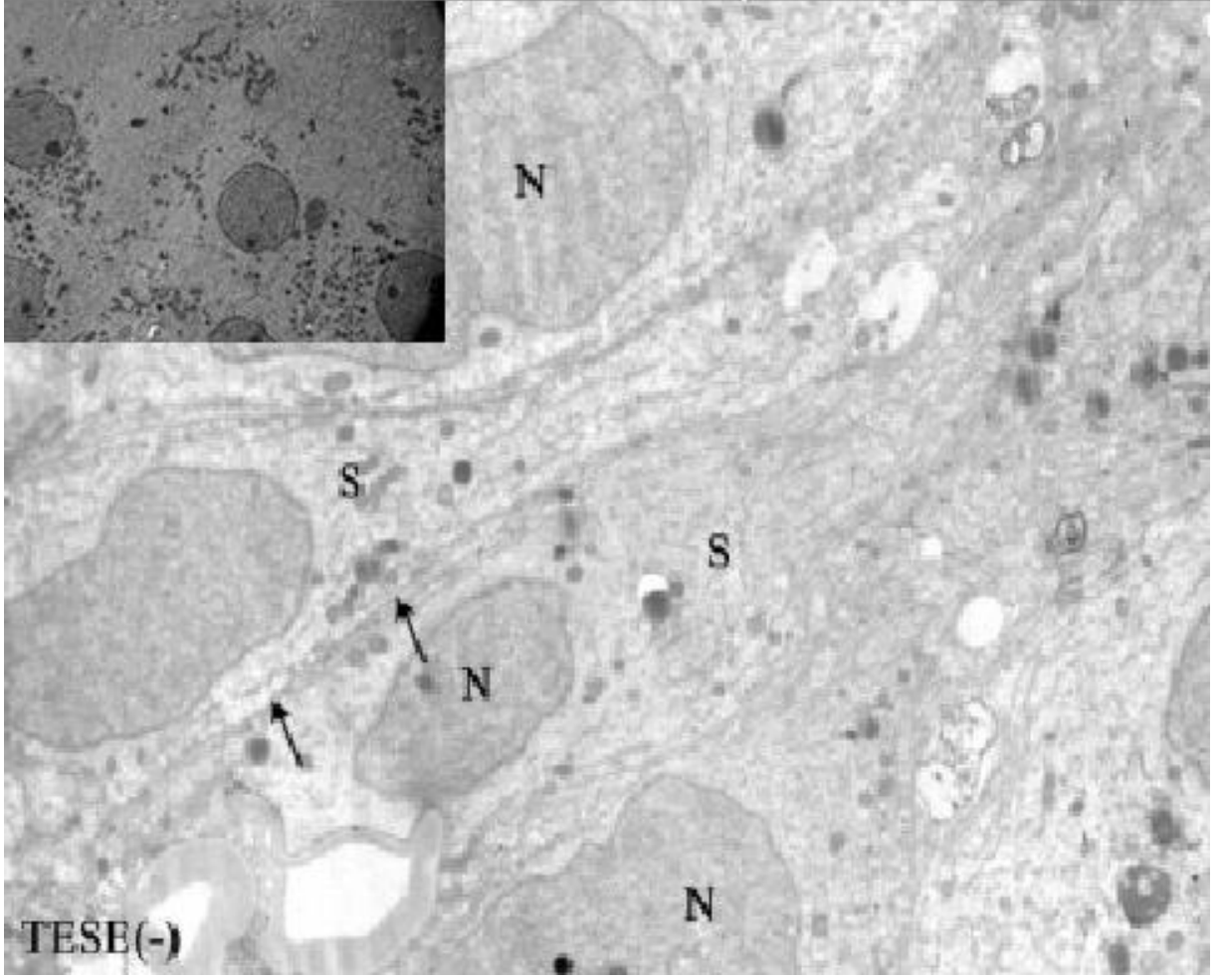
Resim 14A: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunun elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (□) Sertoli hücreleri arasında görüldü. Sertoli hücreleri (S), Sertoli hücre çekirdeği (N), Bazal Membran (BM), Lipid inklüzyonları (*). Büyütme X5000.



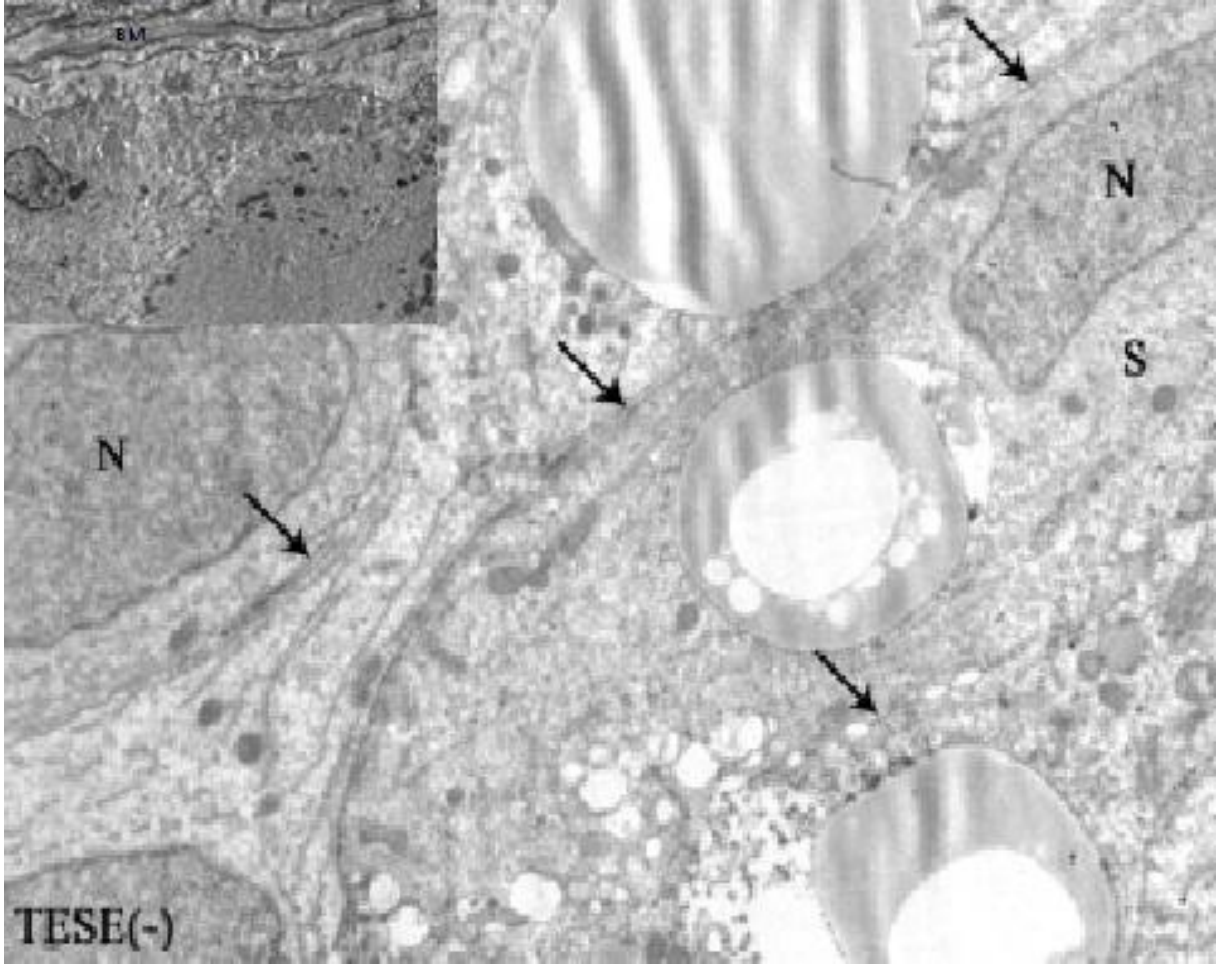
Resim 14B: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunun elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (□,→) Sertoli hücreleri arasında görüldü. Sertoli hücreleri (S), Sertoli hücre çekirdeği (N), Bazal Membran (BM) ve mitokondri(m). Büyütme X75000.



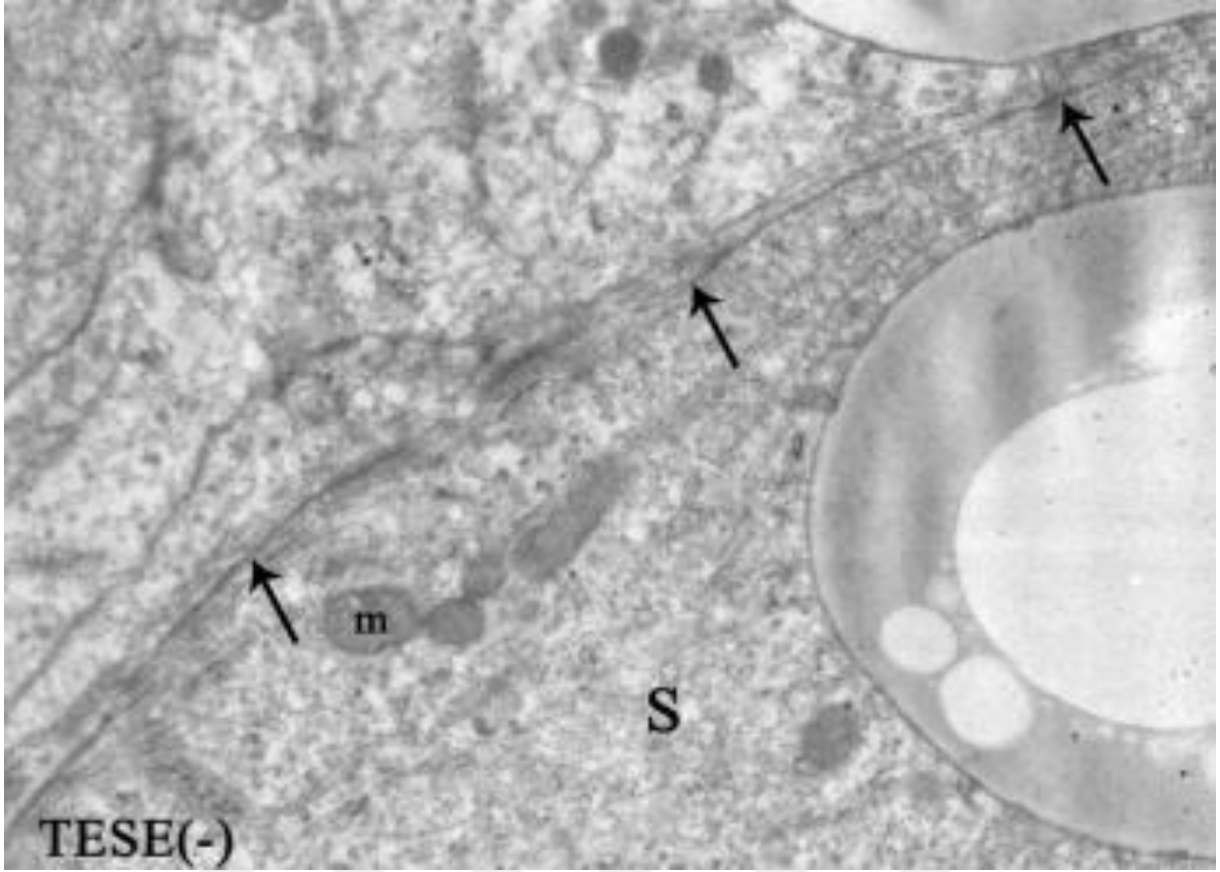
Resim 14C: Spermatozoa içeren gruba ait testis dokusunun elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) Sertoli hücreleri arasında görüldü. Bazal Membran (BM). Büyütme X20000.



Resim 15A: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunun elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) adluminal bölmede görüldü. Sertoli hücreleri (S), Sertoli hücre çekirdeği (N). Büyütme X5000, İnet Büyütme: X3000.



Resim 15B: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunun elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) adluminal bölgede görüldü. Sertoli hücreleri (S), Sertoli hücre çekirdeği (N), Bazal Membran (BM). Büyütme X7500, İnet Büyütme: X5000.



Resim 15C: Spermatozoa içermeyen gruba ait testis dokusunun elektron mikroskobu görüntüsü. Sıkı bağlantılar (→) adluminal bölmede görüldü. Sertoli hücreleri (S), mitokondri (m). Büyütme X20000.

7. TARTIŞMA

Son 15-20 yıldır gonadlar ve sperm fonksiyonları üzerine yapılan çalışmalar, erkek infertilitesinin önemini anlamamıza yol açmıştır. Sperm fonksiyonlarındaki hasar idiyopatik erkek infertilitesinin en sık nedenlerinden birisidir ve tedavisi zordur. Günümüzde sperm fonksiyon bozukluğu ve infertilite arasındaki ilişkinin açıklanabilmesi için yapılan çalışmalar, serbest oksijen radikalleri üzerine odaklanmıştır ve oksidatif stresin erkek üreme fonksiyonu üzerine olan rölatif etkisi araştırılmıştır. Bu bilgiler ışığında yola çıkarak, azospermi oluşturan hasta gruplarının testis dokularında oksidatif stresle olan ilişkisini anlamamız için serbest radikallerden biri olan nitrik oksiti sentezleyen NOS izoformlarının testis dokusundaki dağılımını ve buna bağlı olarak rolünü anlayabilmek için bu çalışmayı amaçladık.

NO'nun fizyolojik sistemler içerisinde, çeşitli önemli işlevsel rolleri olduğu bilinmektedir. Damar içinde NO, damar genişlemesini indükler, trombosit kümelenmesini inhibe eder, endotel hücreleri, nötrofil/platelet yapışmasını engeller, düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve yayılmasını inhibe eder, programlanmış hücre ölümünü düzenler ve endotel hücresi bariyer fonksiyonunu korur. İşgalci mikroplara karşı makrofajlar tarafından üretilen NO, bir antimikrobiyal ajan olarak hareket eder oysa ki nöronlar tarafından üretilen nitrik oksit, bir nörotransmitter olarak hareket eder. Nöronlar, kan damarları ve bağışıklık sisteminin hücreleri üreme organlarının ayrılmaz bir parçasıdır ve nitrik oksit bu sistemlerin görevini yerine getirmede fonksiyonel bir role sahiptir. NO, üreme sistemi biyolojisi ve fizyolojisi için önemli bir düzenleyicidir. Son 10 yıl içinde, NO, kadında olduğu gibi erkek üreme sisteminde de fonksiyonu belirleyici bir rol oynayan, birden fazla işlevi düzenleyen, hem fizyolojik hem de patolojik koşullarda etkili çok değerli bir molekül haline gelmiştir (27).

Yapmış olduğumuz çalışmanın sonuçlarına göre bağ dokuda morfolojik olarak bozuklukların her iki grupta da görülmesi, bu meydana gelen değişikliklerin testis dokusunu fonksiyonel açıdan da etkileyebileceğini düşündürmektedir. Spermatozoa içermeyen örneklerde, seminifer tubül yapısının bozulduğu, dejenere tubüller ile hiyalinleşmiş tubüllerin varlığı ve spermatogenezin farklı evrelerindeki hücelere rastlanmaması spermatogenez sürecinin gerçekleşmediğini ispatlatmaktadır. Aynı zamanda bu grubu oluşturan örneklerde mast hücre sayısının artmasının seminifer tubül yapısındaki

morfolojik deęişiklikler ile iliřkili olduęu dūřunūlmektedir. Mast hūcreleri, normal insan testisinde tespit edilebilmektedir. İnfertil erkeklerin testisinde mast hūcre sayısında artıř olduęunu gōsteren çalıřmalar (46,47,48) mast hūcre aktivitesinin fibroblastları ve kollajen sentezini tetikledięini, bu nedenle mast hūcre patogenezinin kronik iltihap ve fibrozis oluřumunda rol oynadıęını gōstermiřtir.

NOS aktivitesinin fizyolojik uygunluklarını deęerlendirmek için, NOS reaksiyonunun daęılımı çeřitli testis hūcreleri tarafından karakterize edilmiřtir. Bu baęlamda, cNOS aktivitesi Leydig hūcreleri, Sertoli hūcreleri ve insan testis endotel hūcrelerinde tespit edilmiřtir (49,1). ōzūnūr guanil siklaz sGC ve cGMP, seminifer tubūllerin artık cisimlerinin sitoplazması içerisinde, bazı apikal yerleřmiř spermatidlerde ve Leydig hūcrelerinin sitoplazmalarında bulunmuřtur (50). Testosteron, kalmodulin, aspartat, glutamat ve Ca^{+2} /kalmodulin baęımlı protein kinaz II'nin NOS1 ile birlikte Leydig hūcrelerinde lokalize olduęu gōsterilmiřtir. Bunun da ötesinde, NO sentezi ve sitokinle indüklenen iNOS anlatımı, Leydig hūcrelerinde (51) olduęu gibi kūltüre edilmiř Sertoli hūcrelerinde de gōsterilmiřtir (52). Bu sonuçlar doęrultusunda, testis hūcrelerinin, iyi geliřmiř NO-cGMP yolu ile spermatogenez ve steroidogenezis gibi testiküler fonksiyonların dūzenlenmesinde önemli bir rolü olduęu ileri sürūlmüřtür.

Zini ve arkadařları tarafından spermatogenezin her ařamasında yer alan Sertoli hūcrelerinde ve de Leydig hūcrelerinde eNOS anlatımı olduęu gōsterilmiřtir. eNOS aktivitesinin normal germ hūcrelerinde olmadıęı, ancak bozulmuř veya apoptotik intraepitelyal germ hūcrelerinde olduęu rapor edilmiřtir. Ayrıca eNOS'un, spermatogenez ve germ hūcre dejenerasyonunda, erken dōkūlen spermatozoid ve spermatidlerde rolü olduęunu ileri sürmüřlerdir. İlginç bir Őekilde, Leydig hūcrelerindeki eNOS aktivitesinin, bu hūcrelerdeki steroid konsantrasyonlarının aktivitesini dūzenledięini ve NO'in otokrin/parakrin Őeklinde hareket ettięini ifade etmiřlerdir. Bununla birlikte testis içinde NO'in, kan akımı, hūcre geçirgenlięi ve steroid sentezi ile tařımayı dūzenleyen fibroblastik kasılma fonksiyonunu dūzenledięi gōsterilmiřtir (53,49). Son zamanlarda, testiste nNOS bir testis-spesifik varyant (TnNOS) olarak belirlenmiřtir. Testiste otokrin-parakrin faktörler, steroidi dūzenleyici olarak bilindięi için, bu süreci dūzenleyen NO'in rolü yoęun bir arařtırma konusu olmuřtur.

Bizim de çalışmamızın sonucuna gōre; spermatozoa bulunan örneklerde, eNOS reaksiyonunun spermatozoa bulunmayan gruba gōre fazla olması ve spermatogenezin bu

grupta gerçekleşmesi, eNOS'un spermatogenezde önemli bir rolünün olduğunu göstermektedir. NOS, testiste tüm hücre tiplerinde bulunduğundan NO/NOS varlığı spermatogenez için gerekli olduğu gösterilmiştir (51). Ayrıca eNOS reaksiyonunun miyoid hücrelerde de görülmesi, seminifer tubüllerin gevşemesi ve sperm iletiminde de eNOS'un etkili olduğunu göstermektedir. Chaki ve arkadaşları çalışmalarında, kriptorşidizm hastalarında artan ROS'un azalan testosteron hormon seviyesi ile ilişkisi olduğunu, İshikawa ve arkadaşlarının yaptığı kriptorşidizm fare modelinde ise aşırı eNOS ekspresyonuna bağlı artan NO'in germ hücre apoptozisi ile bir bağlantısının olduğunu ortaya koymuşlardır (54,55). Bazı araştırmacılar sıçan testisinde ve insan semeninde antioksidan kapasitesinin azalmasının varikosel ile ilgili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Varikoselin oluşumunda oksidatif stres kaynaklı peroksinitritin rolü olduğunu işaret etmişlerdir (56). Varikoselin temel patobiyolojisi hakkında halen anlaşılmamış olmasına rağmen testikular oksidatif stresin bir faktörü olduğu ortaya çıkmaktadır.

Çalışmamızın bulgularına göre; iNOS reaksiyonu her iki grupta da eNOS reaksiyonuna göre fazla olmakla birlikte gruplar karşılaştırıldığında iNOS reaksiyonun spermatozoa içermeyen örneklerde arttığı belirlenmiştir. Aynı grupta mast hücre sayısı incelendiğinde spermatozoa içeren gruba göre artış olduğu saptanmıştır. İnfertil erkek testisinde mast hücreleri ve iNOS ekspresyonu arasındaki ilişkiyi dolayısıyla spermatogenezde bozuklukları incelemek için birçok çalışma yapılmıştır (28). Sezer ve arkadaşları da çalışmalarının sonucunda, infertil erkeklerin testis biyopsisi bulgusunda peritubüler alanda kalınlaşma olduğunu, mast hücre artışı ve spermatogenezde bozukluk olması ile birlikte fibrozisinde geliştiğini göstermişlerdir. Sadece Sertoli hücre sendromunda olduğu gibi yüksek iNOS boyanma ile arasındaki korelasyon anlamlı olarak ilişkili bulunmuştur (28).

Testislerde NO'un en önemli kaynağı ona en hızlı yanıt veren intertubüler bölmesinde yer alan Leydig hücreleri ve mikrodamar çevresinde bulunan makrofajlardır. Leydig hücrelerinin metabolik faaliyetlerindeki değişiklikler, steroidogenez sırasında salınan testosteron ile düzenlenmektedir. Bunun dışında NO, seminifer tubüller içinde Sertoli ve germ hücrelerinin aktivitesini de etkiler. nNOS erkek cinsiyet fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Fertilizasyonda yumurta aktivasyonunu, seksüel karakterlerin gelişimini ve testisteki Leydig hücrelerinden testosteron sentezlenmesini de etkilemektedir (57). Bizim de çalışmamızın bulgularına göre; nNOS

reaksiyonu spermatozoa bulunan ve bulunmayan grupta benzer şekilde ancak sadece interstisyel alanda yer alan hücrelerde ve özellikle Leydig hücrelerinde görülmüştür. Bu da bize nNOS'un özellikle steroidogenez sürecinde rol oynadığını düşündürmektedir.

Testiste bulunan birçok protein ve moleküller, bağlantı bütünlüğünden ve fonksiyonunun düzenlenmesinden sorumludur. NO, küçük molekül yapısı ve yayılabilme özelliği nedeniyle bu fonksiyonları yerine getirmek de son derece etkilidir. Son zamanlarda eNOS ve iNOS'un okludin ile yapısal ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı şekilde, eNOS ve iNOS'un seminifer epitelin üç yapısal iskelet elemanı olan aktin, tubülin ve vimentin ile bağlantısı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, eNOS ve iNOS'un sıkı bağlantılarında görev alan bir yapıtaş proteini olduğunu ifade etmektedir ve ayrıca hücre-hücre arasında yer alan aktin-merkezli tutundurucu bağlantılar ve dezmozom benzeri bağlantıların yapılımasını, seminifer epiteldeki bağlantıların yeniden düzenlenmesini sağlamaktadır. eNOS, immunohistokimyasal olarak seminifer tubüllerin lamina propriyasında sGC ve sGMP ile bağlantılı bulunmuştur. Ayrıca iNOS ve sGC seminifer epiteldeki Sertoli hücrelerinde aynı alanda gösterilmiştir. Bununla birlikte nNOS, Leydig hücrelerinde cGMP ve sGC ile bağlantılı izlenmiştir. Bu sonuçlar, NOS/sGC/cGMP'nin testis tarafından spermatogenez düzenleyen sinyal yolağı olduğunu vurgulamaktadır (8).

Jingping ve arkadaşlarının SSHS'li hastalarda apoptotik işaretleyici olan heterojen nuklear ribonukleoprotein (HnRNPL)'nin spermatogenezde düzenleyici bir rolü olduğunu göstermişlerdir (58). Aynı zamanda elde ettikleri sonuçlarda HnRNPL'nin neden olduğu apoptozisde iNOS'un sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir. eNOS apoptotik germ hücrede lokalizedir ve DNA fragmantasyonu geçiren apoptotik germ hücrelerin dejenerasyonunda rol oynamaktadır. Buna ek olarak, iNOS germ hücre apoptozunun olumlu bir düzenleyicisidir. Çünkü iNOS farelerin testisinde germ hücre sayısında (özellikle pakiten spermatosit ve yuvarlak spermatidler) önemli ölçüde artış göstermektedir. iNOS'un epitelyum germ hücre sayısını koruyarak germ hücre apoptozu için çok önemli olduğu öne sürülmüştür.(8) iNOS spermatogenez testisteki germ hücre sayısının sınırlandırılmasında büyük bir rol oynamaktadır. iNOS -/- olan farelerden alınan testisler normal farelerin testisleri ile kıyaslandığında ortalama ağırlıkları daha fazladır ve germ hücre apoptozisde bir azalma görülmüştür. iNOS spermatogenez süresince meydana gelen hızlı değişikliklere aracı olmaktadır (59). Elde ettiğimiz bulgulara göre spermatozoa içermeyen grupta iNOS reaksiyonunda spermatozoa içeren gruba göre daha fazla artış ve

mikroskopi bulgularımızı değerlendirildiğimizde germ hücre sayısında bir azalma tespit edilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Sertoli hücre sıkı bağlantıların düzenlenmesinde NO/NOS rollerinin olduğu bilinmektedir. NO, testiste kan-testis bariyeri, beyinde kan-beyin bariyeri ve gözde kan-retina bariyerinde sıkı bağlantı (SB) dinamiklerinin çok önemli bir düzenleyicisidir. Sıkı bağlantılarla NO arasındaki etkileşimi, cAMP ve cGMP'nin farklı konsantrasyonları iki yönlü etkilemektedir. Örneğin, cAMP analoglarının 4-20 μ M veya 100-500 μ M konsantrasyonlarında, Sertoli hücreleri arasındaki SB yeniden düzenlenebilmektedir ya da bozulabilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda testislerde Sertoli hücre sıkı bağlantı dinamiklerinin düzenlenmesinde NOS/NO/sGC/cGMP/PKG yolağının kullanıldığı gösterilmektedir. Bu sonuçlar ışığında bariyer geçirgenliğinin düzenlenmesinde, NO/NOS oranının etkili olduğu söylenebilmektedir. NOS ve NO donörleri, inhibitörleri veya stimülatörleri düzeyindeki değişiklikler, hücreler arasında yer alan sıkı bağlantı bileşenlerinin, özellikle okludin, ZO-1 ve aktin ağının düzenlenmesini etkilemektedir. Yapılan bir çalışma (60) NOS'un bir inhibitörü olan ZnPP varlığının sadece Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılarının düzenlenmesini değil aynı zamanda Sertoli hücrelerinden okludin üretimini de uyardığını göstermektedir. Sonuç olarak hücre bağlantı yapılarında bulunan okludin, aktin ve vimentin gibi yapısal proteinler, NO ve NOS'un hedef proteini olarak varsayılmaktadır (8). Bizim yaptığımız çalışmada da spermatozoa içeren grupta Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantı yapılarını gösteren ZO-1 proteini spermatozoa içermeyen gruba göre daha yoğun olarak gözlenmiştir. ZO-1 reaksiyonu, spermatozoa içeren grupta, Sertoli hücreleri arasında beklenen bölgede lokalize iken spermatozoa içermeyen grupta, Sertoli hücrelerinin tüm yan yüzeyleri boyunca izlenmiştir. Bununla paralel olarak dokuların ultrastrüktürel yapılarının incelenmesinde; spermatozoa içeren grupta, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantı yapıları, adluminal ve bazal kompartman arasında iken spermatozoa içermeyen grupta sıkı bağlantılar, Sertoli hücrelerinin tüm yan duvarı boyunca gösterilmiştir. Bu sonuçlar da bize daha önce yapılan çalışmalarla uyumlu olarak NO/NOS varlığının, hücreler arasında yer alan bağlantı dinamiklerinin fonksiyonunun düzenlenmesinde etkili bir rol oynadığını düşündürmektedir.

8. SONUÇ

Çalışmamızda azospermi olgularından TESE ile elde edilen testis dokuları sperm bulunan (n: 20) ve bulunmayan (n: 20) olarak iki grubu ayrıldı. Bu grupların morfolojisi histokimyasal olarak ve NO yoğunluğu, sıkı bağlantı yapıları immunohistokimyasal olarak değerlendirildi. Bununla bağlantılı olarak seminifer tubüller ince yapı düzeyinde incelendi.

Bulgularımız doğrultusunda;

1- Spermatozoa içermeyen örneklerde spermatozoa içeren gruba göre seminifer tubül yapısının bozulduğu, dejenere tubüller ile hiyalinleşmiş tubüllerin bulunduğu gözlemlendi. Ayrıca seminifer tubüllere de spermatogenezin farklı evrelerindeki hücrelere rastlanmadı. Aynı grupta mast hücre sayısında artış gözlemlendi.

2- Spermatozoa bulunan örneklerde eNOS reaksiyonunun spermatozoa bulunmayan gruba göre yüksek olduğu, iNOS reaksiyonunun ise spermatozoa bulunan grupta daha düşük olduğu görüldü. nNOS reaksiyonlarında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi.

3- Spermatozoa içermeyen grupta germ hücre sayısının azaldığını ve kan testis bariyeri proteini olan ZO-1 reaksiyonu spermatozoa bulunan gruba göre daha az yoğun olduğu görüldü. Buna dayanarak elektron mikroskopi bulguları da aynı paralellikteydi.

Daha önce yapılan çalışmalar ve bizim değerlendirmelerimiz sonucunda NO, hücre ve damar geçirgenliği koordinasyonundan bağlantı düzenlenmesine kadar değişen çeşitli fonksiyonları olan, çok yönlü bir moleküldür. NO, eNOS, iNOS ve nNOS gibi 3 izoform tarafından üretilir. NOS/NO'nun testislerdeki sıkı bağlantıların bağlantı dinamiklerini farklı bir şekilde düzenlediği tanımlanmıştır. Bununla beraber NOS/NO'nun önemi bu dezmozom ve aralıklı bağlantı gibi diğer bağlantı türlerinin düzenlenmesinde tam olarak açıklanamamıştır ve bir çok çalışma, ilgili mekanizmaları ortaya çıkarmak ve söz konusu proteinleri tanımlamak için devam etmektedir. Bunun dışında NOS/NO, hormon ve sitokinlerin seviyelerinin izlenmesi, dolaylı olarak spermatogenez sürecinin kontrol edilmesini sağlamaktadır. Bununla beraber NOS/NO, germ hücre gelişimi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol alır, kısmen de germ hücre apoptoz koordinasyonunu sağlar ve epiteldeki Sertoli hücre/germ hücreleri doğru oranını korumak, canlı ve verimli sperm üretiminde etkinliğini güvenceye alır. Bu nedenle NOS/NO erkek fertilitasını ve patogenezi korumak için önemlidir.

9. TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam süresince, bilgi birikimini paylaşan, katkılarını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, tezimi hazırlama döneminde deneyimleri ve desteği ile her zaman yanımda olan çok sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Canan HÜRDAĞ'a, Çalışmam da örnek teminatında elinden gelen tüm özveriye gösteren sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Evrim ÜNSAL'a

Laboratuvar çalışmalarım süresince yanımda olan, yardımını ve bilgisini benimle paylaşan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yasemin Ersoy ÇANILLIOĞLU'na

Işık mikroskobik çalışmalarım da desteğini esirgemeyen Dr. Aslı KANDİL'e

Elektron mikroskobik çalışmalarım da desteğini esirgemeyip her türlü olanağı sağlayan Prof.Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na

İstatiksel çalışmalarım da her türlü bilgi ve deneyimlerini paylaşan Yrd. Doç. Dr. Esra ÇIKLER'e

Çalışmam boyunca her an yanımda olan yüksek lisans arkadaşlarım Ayşegül İLKAN'a ve Narin AHMETOĞLU'na

Yüksek lisans eğitimi almam için beni cesaretlendiren, desteğini ve sevgisini her daim hissettiren, üzerimde sonsuz bir emeğe sahip olan başta sevgili anneme, sevgili babama ve aileme minnettarı borç bilirim.

10. KAYNAKLAR

1. Armand Zini, Moira K. O'Bryan, Margret S. Magid and Peter N. Schlegel. Immunohistochemical Localization of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Human Testis, Epididymis, and Vas Deferens Suggests a Possible Role for Nitric Oxide in Spermatogenesis, Sperm Maturation, and Programmed Cell Death. *Biology of Reproduction*. 1996, 55: 935-941.
2. De Lamirande E, Gagnon C. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa.II. Depletion of Adenosine Tri Phosphate Plays an Important Role in the Inhibition of Sperm Motility. *J Androl*. 1992, 13(5): 379-86.
3. Burnett, A.L, Ricker, D.D. Chamness, S.L, Maguire, M.P, Crone, J.K, Bredt, D.S, Snyder, S.H.,Chang, T.S. Localization of Nitric Oxide Synthases in Reproductive Organs of the Male Rat. *Biol.Reprod*. 1995, 52: 1-7.
4. Nathan C, Xie QW. Nitric Oxide Synthases Roles, Tolls, and Controls. *Cell*. 1994, 78: 915-918.
5. Weinberg JB, Doty E, Bonaventure J, Haney AF. Nitric Oxide Inhibition of Human Sperm Motility. *Fertil Steril* 1995, 64: 408-412.
6. Kısa Ü, Baflar M, Ferhat M, Yılmaz E, Başar H, Çağlayan O, Batiislam E. Testicular Tissue Nitric Oxide And Thiobarbituric Acid Reactive Substance Levels Evaluation with Respect to the Pathogenesis of Varicocele. *UrolRes*. 2004, 32: 196-199.
7. Nikki P. Y. Lee, Dolores D. Mruk, Ching-hang Wong and C. Yan Cheng. Regulation of Sertoli-Germ Cell Adherens Junction Dynamics in the Testis via the Nitric Oxide Synthase (NOS)/cGMP/Protein Kinase G (PRKG)/b-Catenin (CATNB)Signaling Pathway: an in Vitro and In Vivo Study. *Biol Reprod*. 2005, 73(3):458-71
8. Nikki P.Y. Lee and C. Yan Cheng. Nitric Oxide/Nitric Oxide Synthase, Spermatogenesis, and Tight Junction Dynamics, *Biol Reprod.*, 2004, 70(2):267-76.
9. Abraham L. Kierszenbaum. Çev. Ed. Demir R. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Patolojiye Giriş. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006; 531-544.
10. Junqueira L.C. Carneiro J. Temel Histoloji. Çeviri editörleri: Solakoğlu S. Aytekin Y.İstanbul. Nobel Tıp Kitapevi. 2009.

11. Keith L. Moore. T.V.N. Persaud. İnsan Gelişiminin Başlangıcı. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Ed. Dalçık H. Yıldırım M. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi. 2009.
12. Ross. M. H. Histology a Text and Atlas with Cell and Molecular Biology, Fourth Edition, Lippincott Williams&Wilkins, 2003.
13. WHO (Dünya Sağlık Örgütü) Laboratuvar El Kitabı: İnsan Semeni ve Sperm-Servikal Mukus Etkileşimi Değerlendirilmesi. Çeviri Editörü: Günalp S. Ankara, Tıp Teknik Kitapevi, 2002.
14. Green DP. Mammalian Fertilization as a Biological Machine: a Working Model for Adhesion and Fusion of Sperm and Oocyte. *Hum Reprod.* 1993, 8: 91-96.
15. Chang MC. Fertilizing Capacity of Spermatozoa Deposited into the Fallopian Tubes. *Nature.* 1951, 168: 697-698.
16. Delilbaşı L. İn Vitro Fertilizasyon(IVF) Laboratuvar Yöntemleri, Ankara, Güneş Tıp Kitapevleri,2008.
17. David K.G, Weissman A, Howles C.M, Shoham Z. Yardımla Üreme Teknikleri Temel Kitabı (Laboratuvar ve Klinik Görüşler). Nobel Tıp Kitabevi, 2010.
18. Rhemrev JP, Menkveld R, Roseboom TJ, Van Overveld FW, Teerlink T, Lombard C, Vermeiden JP. The Acrosome Index, Radical Buffer Capacity and Number of Isolated Progressively Motile Spermatozoa Predict IVF Results. *Hum Reprod.* 2001, 16: 1885-1892.
19. Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic Variability of Sperm DNA Denaturation in Infertile Men. *Urology.* 2001, 58: 258-261.
20. Sergerie M, Laforest G, Bujan L, Bissonette F, Bleau G. Sperm DNA Fragmantasyonu: Erkek İnfertilitesinde Eşik Değer. *Hum Reprod.* 2005, 20: 3446-3451.
21. Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. Nitric oxide Regulates Human Sperm Capacitation and Protein-Tyrosine Phosphorylation In Vitro. *Biol Reprod.* 1999, 61: 575-581
22. Dam AH, Feenstra I, Westphal JR, Ramos L, van Golde RJ, Kremer JA. Globozoospermia Revisited. *Hum Reprod Update.* 2007, 13: 63-75.

23. Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, Caballero Peregrín P, Freitas A, Paiva A, Almeida-Santos T, Ramalho-Santos J. Not all Sperm are Equal: Functional Mitochondria Characterize a Subpopulation of Human Sperm with Better Fertilization Potential. *PlosOne*. 2011, 6: 18112-18113
24. Turunç T. Tüm yönleriyle TESE.Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi, Üroloji Kliniği, Adana,42-44.
25. Tunç L, Erkek infertilitesi ve nitrik oksitler, Gazi Üniversitesi Üroloji AD., Türk Androloji Derneği, Androloji Bülteni, 128-130.
26. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *PhysiolRev*. 2002, 82: 47-95.
27. Rosselli M, Keller PJ, Dubey RK. Role of Nitric Oxide in the Biology, Physiology and Pathophysiology of Reproduction. *Hum Reprod Update*. 1998, 4: 3-24.
28. Sezer C., Köksal T., Usta MF, Gülkesen KH, Erdoğan T, Çiftcioğlu A, Baykara M. Relationship Between Mast Cell and iNOS Expression in Testicular Tissue Associated within Fertility. *ArchAndrol*. 2005, 51: 149-158-163.
29. Nagai T, Takaba H. Testicular Mast Cell Heterogeneity in Idiopathic Male Infertility. *Fertil Steril* 1992, 57: 1331-1336.
30. O'Bryan MK, Zini A, Schlegel PN. Human Endothelial Nitric Oxide Synthases Expression: Correlation with Sperm Motility. *Fertil Steril* 1998, 70: 114-118.
31. Özbek E, Turkoz Y, Gokdeniz R, Davarci M. Increased Nitric Oxide Production in the Spermatic Vein of Patients with Varicocele. *EurUrol* 2000, 37: 172-176.
32. Romeo C, Lentile R, Impellizeri P, Turiaco N, Telletta M, Basile M. Preliminary Report on Nitric Oxide Mediated Oxidative Damage in Adolescent Varicocele. *Hum Reprod* 2003, 18: 26-30.
33. Aksoy Y, Özbey İ, Aksoy H, Polat Ö, Akçay F. Seminal Plasma Nitric Oxide Concentration in Oligo and – or Asthenozoospermic Studies with or without Varicocele. *Arch Androl* 2002, 48: 181-185.
34. Kılınç K, Kılınç A. Nitrik Oksit: Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Palme Yayıncılık, Ankara, 2004
35. Knowles RG, Moncada S. Nitric Oxide Synthases in Mammals. *Biochem. J*. 1994, 298: 249-258.

- 36.** Khadijeh Foghi, Marefat Ghaffari Novin. Zahra Madjd Jabbari, Tohid Najafi Mohammad Hasan Heidari Abouzar Rostampour Yasoori. Immuno-histochemical Localization of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Testicular Cells of Men with Non-obstructive Azospermia. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 2011, 9: 277-280.
- 37.** You-Min, K, Jian, Z., Jian, L., Xiang-lin, D., Expression of eNOS in Rat Testis Froming Fancy to Maturity. *Current Zoology*. 2003, 49: 339-345.
- 38.** Rafikov R, Fonseca FV, Kumar S, Pardo D, Darragh C, Elms S, Fulton D, Black SM. eNOS Activation and NO Function: Structural Motifs Responsible for the Posttranslational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. *J Endocrinol*. 2011, 210: 271-284.
- 39.** Oktem, G, Altay, B, Turna, B, Aktug, H, Yavasoglu, A, Yilmaz, O, Semerci, B. Determination of Nitric Oxide Synthase Activity and Apoptosis of Germ Cells in Different Obstruction Models. *ActaHistochem*. 2009, 111(2): 119-26.
- 40.** Tomlinson MJ, East SJ, Barratt CL, Bolton AE, Cooke ID. Possible Role of Reactive Nitrogen Intermediates in Leukocyte-Mediated Sperm Dysfunction. *Am J Reprod Immunol*. 1992, 27:89-92.
- 41.** R. Middendorff, D. Muller, S. Wichers, A. F. Holstein, and M. S. Davidoff. Evidence for Production and Functional Activity of Nitric Oxide in Seminiferous Tubules and Blood Vessels of the Human Testis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997, 82(12):4154-61.
- 42.** Nikki P. Y. Lee and C. Yan Cheng. Nitric Oxide and Cyclic Nucleotides: Their Roles in Junction Dynamics and Spermatogenesis. *Adv Exp Med Biol*. 2008, 636:172-85.
- 43.** Ramya T., Misro M.M., Sinha D., Nandan D., Mithal S. Altered Levels of Seminal Nitric Oxide, Nitric Oxide Synthase, and Enzymatic Antioxidants and their Association with Sperm Function in Infertile Subjects. *Fertil Steril*. 2011. 95(1):135-40.
- 44.** Herrero MB, Gagnon C. Nitric Oxide: a Novel Mediator of Sperm Function. *J Androl*. 2001,22(3):349-56.
- 45.** Zhang H, Zhou Q, Li X, Zhao W, Wang Y, Liu H, Li N. Ginsenoside Re Promotes Human Sperm Capacitation through Nitric Oxide-Dependent Pathway. *Mol Reprod Dev*. 2007,74(4):497-501.
- 46.** Apa DD, Cayan S. Mast Cells and Fibrosis on Testicular Biopsies in Male Infertility. *Arch Androl*. 2002, 48:337-344.

- 47.** Gruber BL, Kew RR, et al. Human Mast Cells Activate Fibroblasts: Tryptase is a Fibrogenic Factor Stimulating Collagen Messenger Ribonucleic Acid Synthesis and Fibroblast Chemotaxis. *J Immunol.* 1997, 158:2310–2317.
- 48.** Meineke V, Frungieri MB. Human Testicular Mast Cells Contain Tryptase: Increased Mast Cell Number and Altered Distribution in the Testes of Infertile Men. *Fertil Steril* 2000, 74:239–244.
- 49.** Davidoff MS, Middendorff R, Mayer B, Holstein AF. Nitric Oxide Synthase (NOS-I) in Leydig Cells of the Human Testis. *Arch Histol Cytol.* 1995, 58(1):17-30.
- 50.** Davidoff, M.S., Middendorff, R, Mayer, B. Nitric Oxide /cGMP Pathway Components in the Leydig Cells of the Human Testis. *Cell Tissue Res.* 1997. 287, 161–170.
- 51.** Tatsumi, N., Fujisawa, M., Kanzaki, M. Nitric Oxide Production by Cultured Rat Leydig Cells. *Endocrinology*, 1997. 138, 994–998.
- 52.** Stephan, J.P., Guillemois, C., Jegou, B. and Bauche, F. Nitric Oxide Production by Sertoli Cells in Response to Cytokines and Lipopolysaccharide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. 312, 218–224.
- 53.** Adams, M.L., Meyer, E.R., Sewing, B.N. and Cicero, T.J. Effect of Nitric Oxide-Related Agents on Rat Testicular Function. *J. Pharmacol. Exp.* 1994. 269, 230–270.
- 54.** Chaki SP, Misro MM, Ghosh D, Gautam DK, Srinivas M. Apoptosis and Cell Removal in the Cryptorchid Rat Testis. *Apoptosis.* 2005, 10:395–405.
- 55.** Romeo, A.A., Capobianco, J.A., and English, A.M. (2003). Superoxide Dismutase Targets NO from GSNO to Cysbeta93 of Oxyhemoglobin in Concentrated but not Dilute Solutions of the Protein. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 14370–14378.
- 56.** Ishikawa T, Kondo Y, Goda K, Fujisawa M. Over Expression of Endothelial NOS in Transgenic Mice Accelerates Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Experimental Cryptorchidism. *J Androl.* 2005, 26:281–288.
- 57.** Wang Y, Newton DC, Miller TL, Teichert AM, Phillips MJ, Davidoff MS, Marsden PA. An Alternative Promoter of the Human Neuronal Nitric Oxide Synthase Gene is Expressed Specifically in Leydig Cells. *J Pathol.* 2002, 160(1):369-80.
- 58.** Li J, Guo W, Li F, He J, Yu Q, Wu X, Li J, Mao X .HnRNPL as a Keyfactor in Spermatogenesis: Lesson From Functional Proteomic Studies of Azospermia Patients with Sertoli Cell Only Syndrome. *J Proteomics.* 2012, 75(10):2879-91.

59. Coştur P, Filiz S, Gonca S, Çulha M, Güleçen T, Solakoğlu S, Canberk Y, Çalışkan E. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in the Azoospermic human testis. *Andrologia*. 2011, 1:654-60.

60. Lee NPY, Cheng CY. Regulation of Sertoli Cell Tight Junction in the Rat Testis via the Nitric Oxide Synthase/Soluble Guanylate Cyclase/cGMP/Protein Kinase G Signaling Pathway: an in Vitro Study. *Endocrinology*. 2003, 144:3114-3129.

