



T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

+

VAZEKTOMİ SONRASI RAT TESTİS DOKUSUNDA OLUŞAN  
PATOLOJİLERDE İNOS MOLEKÜLÜNÜN POTANSİYEL ROLÜNÜN  
ANALİZİ

1520

Dr. Hüseyin SOYAN

UZMANLIK TEZİ

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

Antalya-2003

**T.C.**  
**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**VAZEKTOMİ SONRASI RAT TESTİS DOKUSUNDA**  
**OLUŞAN PATOLOJİLERDE İNOS MOLEKÜLÜNÜN**  
**POTANSİYEL ROLÜNÜN ANALİZİ**

**Dr. Hüseyin SOYAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**Tez Danışmanı**  
**Yrd. Doç. Dr. M Fuat USTA**

**“Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir”**

**Antalya, 2003**

Uzmanlık eğitimim süresince her an yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, tez çalışmalarına katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı Öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma ve birlikteliğimiz boyunca beni devamlı destekleyen sevgili eşime içtenlikle teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

|                                                                     | Sayfa No |
|---------------------------------------------------------------------|----------|
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>                               | V        |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                                              | Vi       |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>                                            | Vii      |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                     | 1        |
| <b>2. GENEL BİLGİLER</b>                                            | 4        |
| 2.1. TESTİS ANATOMİSİ                                               | 4        |
| 2.2. TESTİS FİZYOLOJİSİ                                             | 7        |
| 2.2.1. Seminifer Tubuller                                           | 7        |
| 2.2.2. Sertoli Hücreleri                                            | 12       |
| 2.2.3. Spermatogenezin Parokrin/Endokrin Gereksinim<br>ve Koşulları | 13       |
| 2.2.4. İntertisyel Doku                                             | 14       |
| 2.2.5. Kan Testis Bariyeri                                          | 15       |
| 2.3. EPİDİDİM                                                       | 15       |
| 2.4. DUKTUS DEFERENS                                                | 16       |
| 2.5. ERKEK KONTRASEPSİYON YÖNTEMLERİ                                | 17       |
| 2.5.1. Koitus İnterruptus                                           | 17       |
| 2.5.2. Kondom                                                       | 17       |
| 2.5.3. Hormonal Kontrasepsiyon                                      | 18       |
| 2.5.4. Vazektomi                                                    | 19       |
| 2.6. VAZEKTOMİNİN GENİTAL SİSTEMDEKİ LOKAL ve<br>SİSTEMİK ETKİLERİ  | 22       |
| 2.6.1. Sperm Granulom Oluşumu                                       | 22       |
| 2.6.2. Antisperm Antikorların Etkisi                                | 23       |
| 2.7. Vazektomi ve Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)                 | 24       |
| 2.7.1. SOR'un Sperm ve Sperm Fonksiyonları Üzerine Etkisi           | 27       |

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.7.2. Oksidatif Korunma                                                         | 29 |
| 2.7.3. Antioksidant İlaçlar                                                      | 29 |
| 2.7.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Ölçümü                                     | 30 |
| 2.8. NİTRİK OKSİT (NO) ve NİTRİK OKSİT SENTETAZ (NOS)                            | 31 |
| 2.8.1. NOS İnhibikörleri                                                         | 34 |
| 2.8.2. NO İnhibitörleri                                                          | 35 |
| <b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>                                                        | 36 |
| 3.1. CERRAHİ YÖNTEM                                                              | 36 |
| 3.2. TESTİS DOKU PATOLOJİK İNCELEMESİ                                            | 36 |
| 3.3. MALONDİALDEHİT ÖLÇÜMÜ                                                       | 37 |
| 3.4. RATLAR İÇİN JOHNSEN SKORLAMASI                                              | 38 |
| 3.5. SERUM FSH, LH, ve TESTOSTERON HORMONLARININ ÖLÇÜMÜ                          | 39 |
| <b>4. BULGULAR</b>                                                               | 41 |
| 4.1. İNOS EKSPRESYONU YÖNÜNDEN VAZEKTOMİ ve SHAM GRUPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI   | 41 |
| 4.2. DOKU MDA DÜZEYLERİ YÖNÜNDEN VAZEKTOMİ ve SHAM GRUPLARININ KARŞILAŞTIRILMASI | 44 |
| 4.3. SEMİNİFER TUBUL ÇAPLARI ve JHONSEN SKORLARININ KARŞILAŞTIRILMASI            | 45 |
| 4.4. TESTİS AĞIRLIKLARININ KARŞILAŞTIRILMASI                                     | 47 |
| 4.5. SERUM TOTAL TESTOSTERON, FSH ve LH DÜZEYLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI           | 48 |
| <b>5. TARTIŞMA</b>                                                               | 50 |
| <b>6. SONUÇLAR</b>                                                               | 57 |
| <b>7. ÖZET</b>                                                                   | 59 |
| <b>8. KAYNAKLAR</b>                                                              | 60 |

## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

|       |                                   |
|-------|-----------------------------------|
| ICSI  | Intracyotoplasmic sperm Injection |
| iNOS  | Inducible Nitrik Oksit Sentetaz   |
| AGE   | Advenced Glycation End Products   |
| SOR   | Serbest Oksijen Radikalleri       |
| NO    | Nitrik Oksit                      |
| MDA   | Malondialdehit                    |
| TBA   | Tiyobarbitürik asit               |
| NOS   | Nitrik Oksit Sentetaz             |
| TBARS | TBA-Reaktif Maddeler              |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil                                             | Sayfa |
|---------------------------------------------------|-------|
| 1. Testisin arteriyel ve venöz anatomisi          | 6     |
| 2. Testis ve epididim                             | 7     |
| 3. Seminifer tubuller ve testis intertisyumu      | 8     |
| 4. Mayoz bölünme                                  | 10    |
| 5. Matür insan spermi                             | 12    |
| 6. Normal testis dokusu                           | 43    |
| 7. Vazektomi-sol testiste artmış iNOS ekspresyonu | 43    |
| 8. Sham-Sol testiste negatif iNOS ekspresyonu     | 44    |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

| Tablo |                                                                                                                                                   | Sayfa |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1     | Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan gruplarda sol/sağ testis seminifer tubul çapı,Johnsen skorlaması,ve toplam iNOS skorlar ortalama değerleri | 41    |
| 2     | Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan ratlarda sol/sağ testis iNOS yoğunluk,boyanma oranları, toplam boyanma skorları ve MDA düzeyleri           | 42    |
| 3     | Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan grupların sol/sağ testis ortalama MDA düzeyleri                                                            | 45    |
| 4     | Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan ratlarda sol/sağ testis seminifer tubul çapı ve Johnsen skorları                                           | 46    |
| 5     | Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan gruplarda sol/sağ testis ağırlıkları                                                                       | 47    |
| 6     | Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan gruplarda sol/sağ testis ağırlık ortalama değerleri                                                        | 48    |
| 7     | Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan grupların kan FSH, LH ve testosteron seviyeleri ng/dL                                                      | 48    |
| 8     | Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan grupların kan testosteron düzeylerinin karşılaştırılması                                                   | 49    |

## 1. GİRİŞ

Günümüzde vazektomi, erkek kontrasepsiyonunda altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (1, 2). Vazektomi, 19. yüzyılın sonlarından günümüze değin kalıcı erkek sterilizasyonunun sağlanması amacıyla tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık olarak 500 bin erkek vazektomi operasyonu geçirmektedir (3). Özellikle son yıllarda uygulanılmaya başlanan "Bisturisiz Vazektomi" gibi son derece basit tekniklerin geliştirilmesi; erkek kontrasepsiyonunda en kesin ve etkili tedavi yöntemi olarak bilinen vazektominin popülaritesini daha da arttırmıştır (3). Vazektomi prosedürünün en önemli avantajı: Ofis şartlarında, genel anesteziye gerek olmaksızın kolaylıkla uygulanabilir olmasıdır. Buna karşılık literatür bilgilerine göre tedavinin başarısızlık oranı %1'den daha azdır (4, 5). Tedavinin bu yüksek başarı oranı; hiç kuşkusuz hasta ve hekimin yönetime olan güvenini arttırmakta ve yaygın olarak tercih edilmesine neden olmaktadır.

Vazektomi modalitesinin, erkek kontrasepsiyonunda sağladığı önemli katkıya karşılık; günümüzde vazektomi operasyonu geçiren erkeklerin %6'ya varan bölümü çeşitli nedenlerden dolayı "Vasectomy Reversal" olarak bilinen vaz deferensin uçlarının yeniden anastomozu isteminde bulunmaktadır (6). Bu istemin en önemli nedenleri: Eşlerin fikir değiştirerek yeniden çocuk sahibi olmak istemesi ve operasyondan sonra erkeklerin yaklaşık olarak %15-20'sinde karşılaşılan kronik ağrı sendromu' dur (7).

Özellikle yeniden çocuk sahibi olmak isteyen eşlerde; Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) yöntemi ile karşılaştırıldığında; vazovazostomi sonrası elde edilecek doğal

gebeliğin; hem maliyet hem de ilerlemiş kadın faktörünün varlığında önemli kazanımlar sağlayacağı açıktır (8). Çok merkezli çalışmalar gözden geçirildiğinde; vazovazostomi sonrası ejakülatta sperm bulunması oranının %72-86, gebelik oranının da %40-52 arasında değiştiği bildirilmektedir (9). Bununla birlikte özellikle obstrüksiyon süresi postoperatif başarı oranını etkileyen en önemli etken olarak görünmektedir.

Vazektomize edilmiş testisin fizyopatolojisi; özellikle de oluşan geri dönüşümsüz hasar tam olarak ortaya konulamamış ve günümüzde de halen araştırılmaktadır. Günümüze kadar yayınlanmış olan çalışmalar; vazektomi sonrası testiküler dokuda tubuler dilatasyon, tubuler duvarda kalınlaşma, germ hücre yada spermatid sayısında azalma, Sertoli hücre hasarı ve interstisyel fibrozis insidansında artış gibi gelişen histolojik değişikliklerin geliştiği bildirilmiştir. Bununla birlikte vazektomi sonrası oluşan histolojik değişikliklere paralel olarak serbest oksijen radikalleri (SOR) gibi patolojik ortamlarda artan moleküllerin rolü üzerinde de durulmuştur (2, 10, 11, 12).

Inducible Nitric Oxide synthases (iNOS) transkripsiyonel olarak regüle olan ve özellikle hücresel strese yanıt olarak arttığı düşünülen bir moleküldür. Yine immun ve inflamatuvar yanıt gibi patofizyolojik durumlarda, iNOS doku ekspresyonunun belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (13). iNOS molekülünün değişik dokularda ve patolojik ortamlarda oynadığı rol konusunda özellikle son yıllarda önemli bilgiler elde edilmiştir (14). Bununla birlikte, iNOS molekülünün serbest oksijen radikalleri ve doku hasarında rol oynayan bir diğer önemli ürün olan AGE (Advanced Glycation End Products) ile ilişkileri üzerinde de durulmaktadır (14, 15). Dahası iNOS'a bağlı geliştiği düşünülen patolojilerin tedavisinde, spesifik iNOS

blokörlerinin yakın zamanda kullanımı konusunda umut verici sonuçlar da elde edilmiştir (16). Buna karşılık, günümüze kadar İngilizce yazılmış literatür gözden geçirildiğinde; vazektomi sonrası testis dokusunda oluşan iNOS ekspresyonu ile ilgili herhangi bir çalışmanın olmadığı görülmektedir. Çalışmamızda; vazektomi oluşturulan rat modelinde testiküler doku iNOS ekspresyonunda oluşan değişikliklerin araştırılmasını hedefledik. Bununla birlikte daha önceden bildirilen serbest oksijen radikal (SOR) düzey artışının olası iNOS ekspresyonu ile olan korelasyonu ve vazektomi sonrası testiküler histolojide oluşan değişikliklerin değerlendirilerek, literatür eşliğinde irdelendi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TESTİS ANATOMİSİ

Testisler her biri ortalama 40x40x25 mm boyutlarında, 32 gram ağırlığında ve intraskrotal yerleşimli, endokrin ve üreme fonksiyonu olan iki adet organdır (17). Testis ve çevresindeki skrotumun tabakaları;

- 1- Deri
- 2- Dartos fasiası
- 3- Eksternal spermatik fascia
- 4- Kramaster kası
- 5- İnternal spermatik fascia
- 6- Tunica vajinalis şeklinde dıştan içe doğru sıralanır (18).

Tunika vajinalis, gestasyonun üçüncü ayında ingüinal kanaldan invajine olan ve abdominal peritonun devamı olan prosessus vajinalisin kalıntısıdır. Testis, doğuma kadar intraabdominal bölgeden skrotuma olan inişini tamamlar. Testis çevresindeki tunika vajinalisin visseral ve pariyetal yaprakları arasında minimal sıvı mevcuttur. Nadir vakalarda tunika vajinalis kalıntısının abdominal periton ile açıklığı devam eder ve bu durum indirekt ingüinal herni ve/veya hidrosel ile sonuçlanabilir (18, 19).

Testisin arteriyel kanlanması primer olarak testiküler arter tarafından sağlanmakla birlikte, kremasterik ve deferensiyel arterler de testisin beslenmesine katkıda bulunurlar (18, 20). Testiküler arterler abdominal aortanın her iki yanından, renal arter çıkış yerinin inferiorundan ayrılır. Testiküler arterler retroperitonda ilerleyerek, iliak çapraz seviyesinde üreterin üzerinden geçerek pelvise lateralden girer ve internal ring seviyesinde spermatik kordona katılır. Arterler

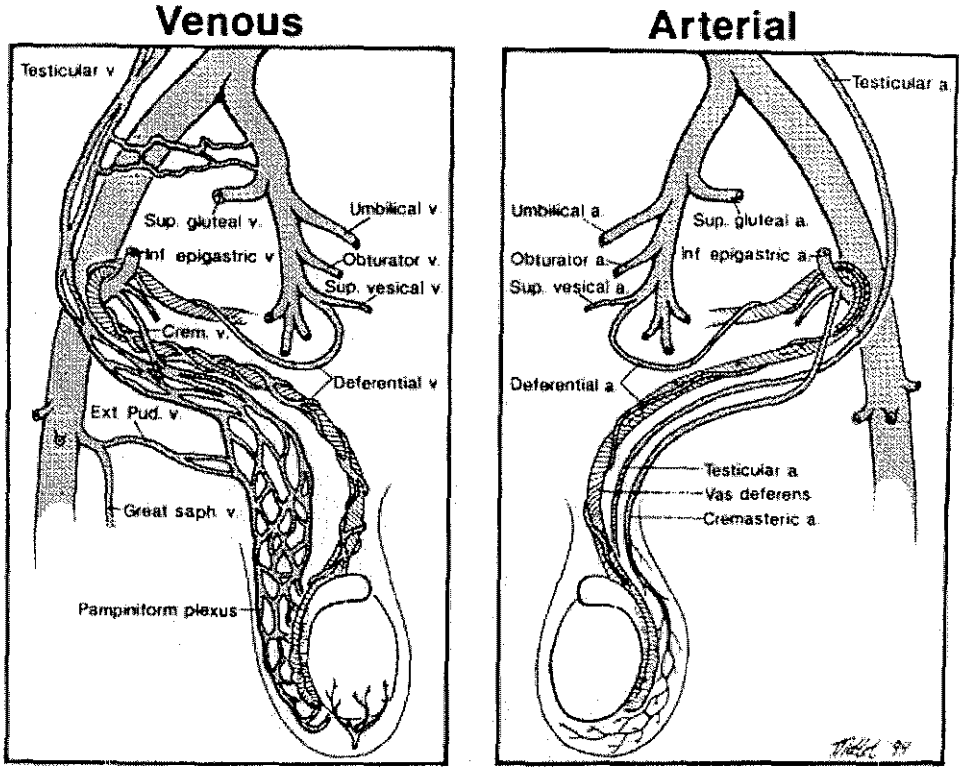
ingüinal kanalı spermatik kordonun bir elamanı olarak geçer ve testise ulaşır (18, 20). Kremasterik arterler, eksternal spermatik arterler olarak da adlandırılır ve eksternal iliak arterden çıkan inferior epigastrik arterin dalıdır. Deferensiyel arterler ise internal iliak arterin dalıdır. Kremasterik ve deferensiyel arterler, spermatik kordan geçerek testise ulaşır (18, 20). Testisin primer arteri testiküler arter olduğu halde, sözü edilen üç arter arasında testisin yeterli derecede kanlanmasını sağlayacak şekilde anastomozlar mevcuttur. Bu anatomik özellik, arterlerden herhangi birisinin oblitere olması durumunda, testisin yeterli derecede beslenmesine olanak sağlar (18).

Testiküler arter tunika albugineaya üst pol posteriordan girerek inferior pole doğru ilerler ve ön yüzden tekrar üst pole çıkar. Testiküler arter, testis parankimine birçok dallar vererek tunika albugineanın altından ilerler. Yüzeyel arterlerin en yoğun olduğu yer; inferior polün ön, lateral ve medial bölümleridir. Arteriyel beslenmenin en az olduğu bölüm ise üst polün medial ve lateral bölümleridir. Testis biopsisi ve orşiopeksi operasyonu sırasında iatrojenik yaralanmaların önlenmesinde, sözü edilen yüzeyel arteriyel dağılımları büyük önem taşır (18).

Erkek reproduktif traktında testis venöz anatomisinin önemi büyüktür. Testisten çıkan venler birbirleriyle birçok anastomoz yaparak pampiniform pleksusu oluşturur ve bu pleksus da skrotumda spermatik kord ile uzanır (18).

Testisi besleyen arterler, pleksus pampiniformis üzerinden testise doğru ilerler ve 33°C sıcaklıktaki venöz kan, 37°C abdominal sıcaklıktaki arteriyel kanı “countercurrent” olarak adlandırılan ısı değişim mekanizması ile soğutur. Venöz pleksus ingüinal kanalı geçtikten sonra arteriyel dallanma ile uyumlu olarak dallara ayrılır.

Sağ testiküler ven inferior vena kavaya açılırken, sol testiküler ven renal vene açılır (18, 20), (Resim 1).

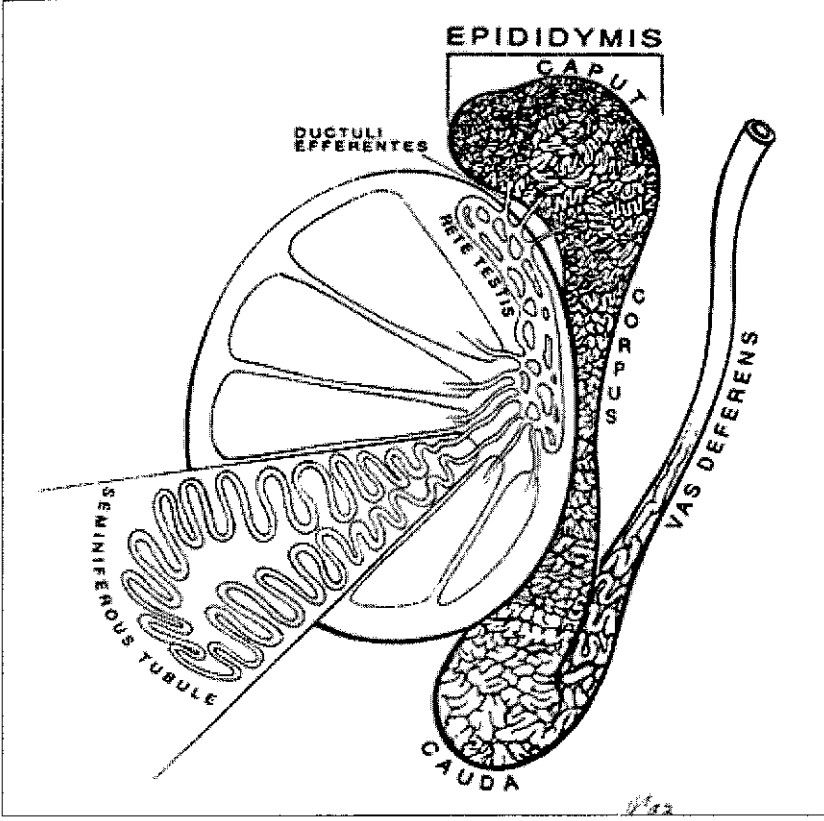


**Resim 1: Testisin arteriyel ve venöz anatomisi (Wayne J.G. Hellstrom: Male Infertility and Sexual Dysfunction)**

Testisin otonomik sinirleri T10-L1 arasında çıkan sinir liflerinin uzantısı olan spermatik pleksustan kaynaklanır. Süperior spermatik sinir lifleri spermatik damarlar üzerinden testise kadar ulaşır (18).

Testis, germ hücre gelişiminin bir parçası olan seminifer tubullerden oluşmaktadır (18, 21). Tunika albuginea, testis içine yolladığı septalarla yaklaşık 250-400 lobül oluşturur ve her bir lobülün içinde en az iki adet tubuli seminiferi kontorti yer alır. Septalar üst pole yakın bölümde birbirine yaklaşıp mediastinum testisi oluştururlar. Tubuli seminiferler mediastene yaklaştığında kıvrımlarını kaybedip düzleşirler ve duktuli rekti olarak mediastende

rete testisi oluşturur. Mediastenden yine düz olarak çıkan duktuli efferentesler epididim başına girerler (18,21), (Resim 2).



**Resim 2: Testis ve epididim (Wayne J.G. Hellstrom: Male Infertility and Sexual Dysfunction)**

## 2.2. TESTİS FİZYOLOJİSİ

Testisin 2 temel fonksiyonu vardır.

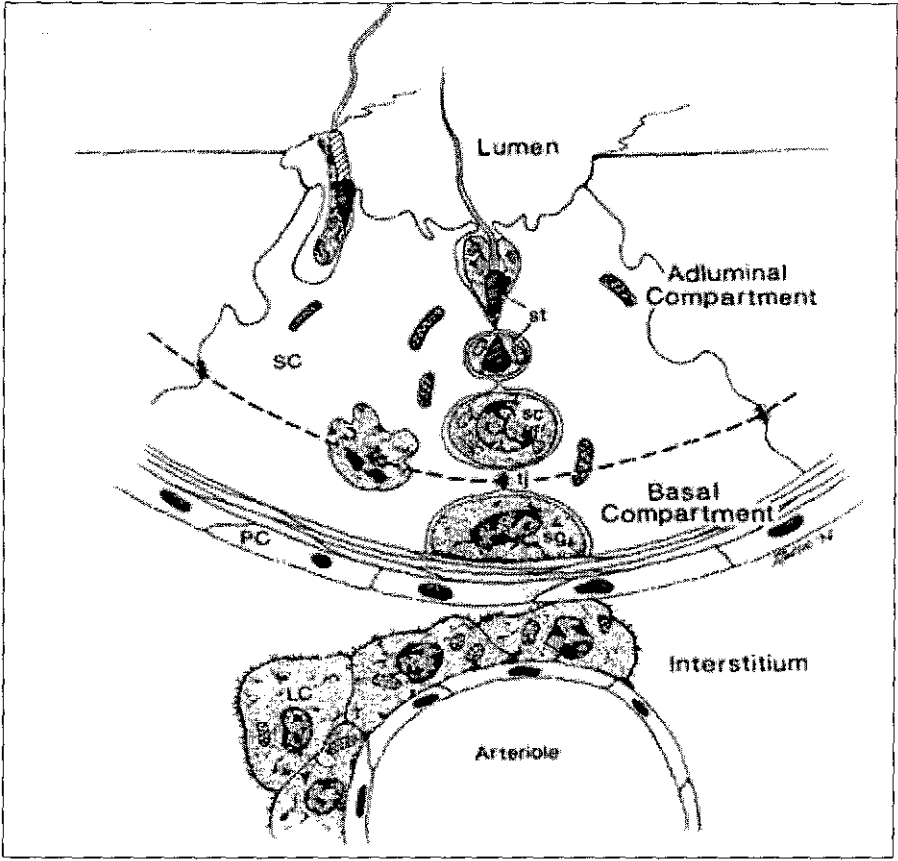
1-Seminifer tubul içerisinde matur spermatazoa oluşturmak

2- ntertisyumda bulunan Leydig hücreleri aracılığıyla testosteron üretmek (18, 21).

### 2.2.1. Seminifer Tubuller:

Seminifer tubuller primer olarak sertoli hücreleri, germ hücreleri ve peritubuler myoid hücrelerden oluşmaktadır.

Sertoli hücreleri epitelial orjinli bölünmeyen somatik hücreler olup tubulus duvarını oluştururlar. Sertoli hücreleri tubulun bazal membranından lümeneye doğru uzanım gösterir. Bu hücreler arasındaki ince bağlantılar, interstisyel alandaki lenfden kaynaklanan makromoleküller ile tubulusun lümeni arasında etkin bir bariyer oluşturur. Bu bağlantılar seminifer tubulleri adluminal komponent ve bazal komponent olmak üzere iki kompartmana ayırır (18, 20), (Resim 3).



**Resim 3: Seminifer tubul ve testis intertisyumu. Leydig cell (LC), Sertoli cell (SC), Spermatagonia (sg,) spermatit (st) (Wayne J.G. Hellstrom: Male Infertility and Sexual Dysfunction)**

Germ hücrelerinin prolifer ve spermatozoaya differensiye olmaları seminifer tubul duvarında olmaktadır (18, 21). Seminifer tubul, çepeçevre peritubuler myoid hücre tabakasıyla çevrilidir. Bu

tabaka, matur germ hücrelerinin tubul peristaltizmiyle epididime doğru trasportundan sorumludur. Myoid hücreler parakrin faktör salgılayarak Sertoli hücre fonksiyonlarını regüle eder ve Sertoli hücrelerinde protein sentezini artırır (18, 22).

Spermatogenik hücreler, bazal lamina ve tubuli lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler belirli sayıda bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoayı oluşturur. Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenezis olarak adlandırılan bu fenomen 3 faza ayrılır (18, 22, 23).

1-Spermatositogenez; bölünmeler sonucunda spermatositler meydana gelir.

2-Mayoz; spermatositlerin ardı ardına 2 mayoz bölünme geçirerek sayılarının ve DNA miktarlarının eşit olarak her hücrede ikiye ayrılması ile spermatidlerin olduğu evredir.

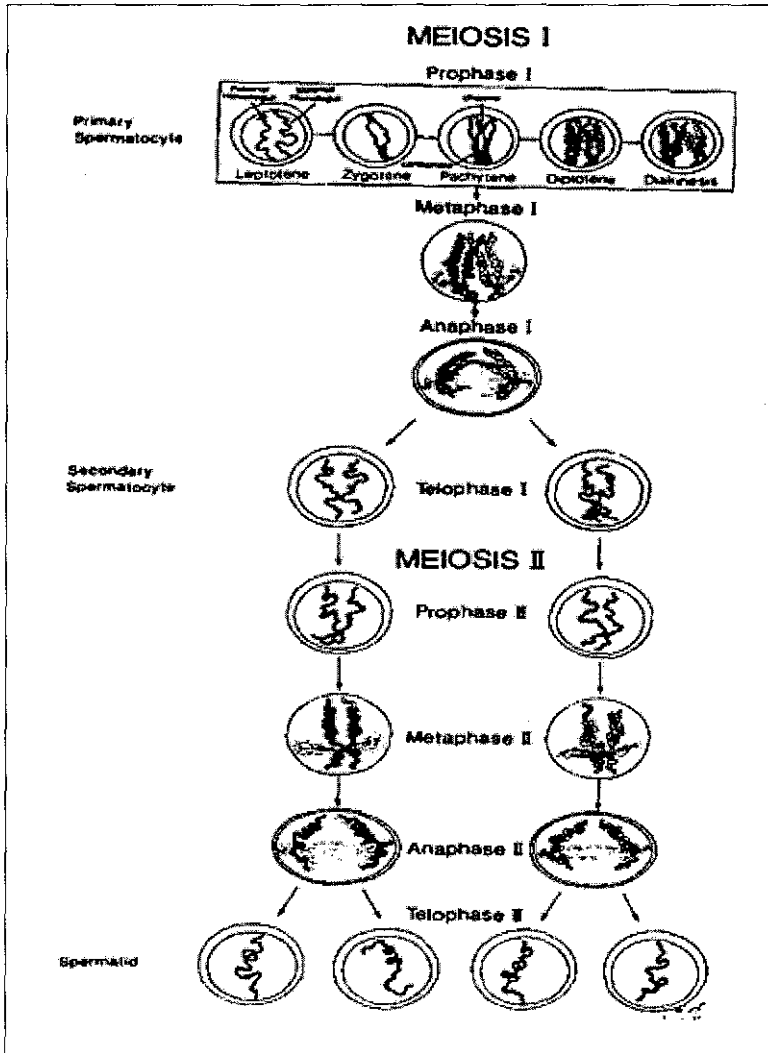
3- Spermiogenez; spermatidlerin düzenli bir hücre farklılaşması süreci geçirerek spermatozoaları oluşturduğu evredir (18, 22, 24).

Spermatagonia seminifer tubul bazal membranında bulunmaktadır. Bu hücreler birkaç mitotik bölünmeden sonra primer spermatositi oluşturur. İlk mayotik bölünme fetal testis içerisinde gerçekleşmekte ve doğumda; testis içerisinde spermatagonia ve primer spermatosit üretimi olmaktadır. Buna karşılık puberte dönemine kadar germ hücre gelişimi olmamaktadır. Puberte başlangıcından itibaren artan serum gonodotropin ve androjen hormon seviyeleriyle birlikte devamlı germ hücresi gelişimi başlamaktadır (18, 22, 23, 24).

Mayoz birbirinin takip eden iki bölünme sonrası haploid sayıda germ hücresi oluşumu ile tamamlanmaktadır. Mayoz bölünmenin profaz safhası: 1)Leptotene, 2)Zygotene, 3)Pakitene, 4)Diplojene, 5)Diakinese olmak üzere 5 basamaktan oluşmaktadır (18, 24).

Metafaz safhasında kromozom çiftleri hücre ekvatorunda toplanmaya başlarken, anafaz safhasında kromozom çiftleri hücre kutuplarına doğru hareket eder. Telofaz safhası ise; birinci mayotik bölünmenin final safhasıdır ve cytokinesis oluşarak iki diploid yavru hücre meydana gelir.

Birinci mayoz bölünmenin sonunda sekonder spermatosit oluşurken, ikinci mayoz bölünmenin sonunda sekonder spermatositler bölünerek spermatitleri oluşturur (18, 22, 23, 24), (Resim 4).



**Resim 4: Mayoz bölünme (Wayne J.G. Hellstrom: Male infertility and Sexual Dysfunction)**

Erken spermatitler yuvarlak hücrelerdir ve matür spermatitlere benzememektedir. Spermatitler spermiogenezis olarak adlandırılan değişim dönemine girerler ve bu dönem de;

1-Akrozom gelişimi

2-Nükleer kromatin kondansasyonu

3-Fazla stoplazmanın atılımı

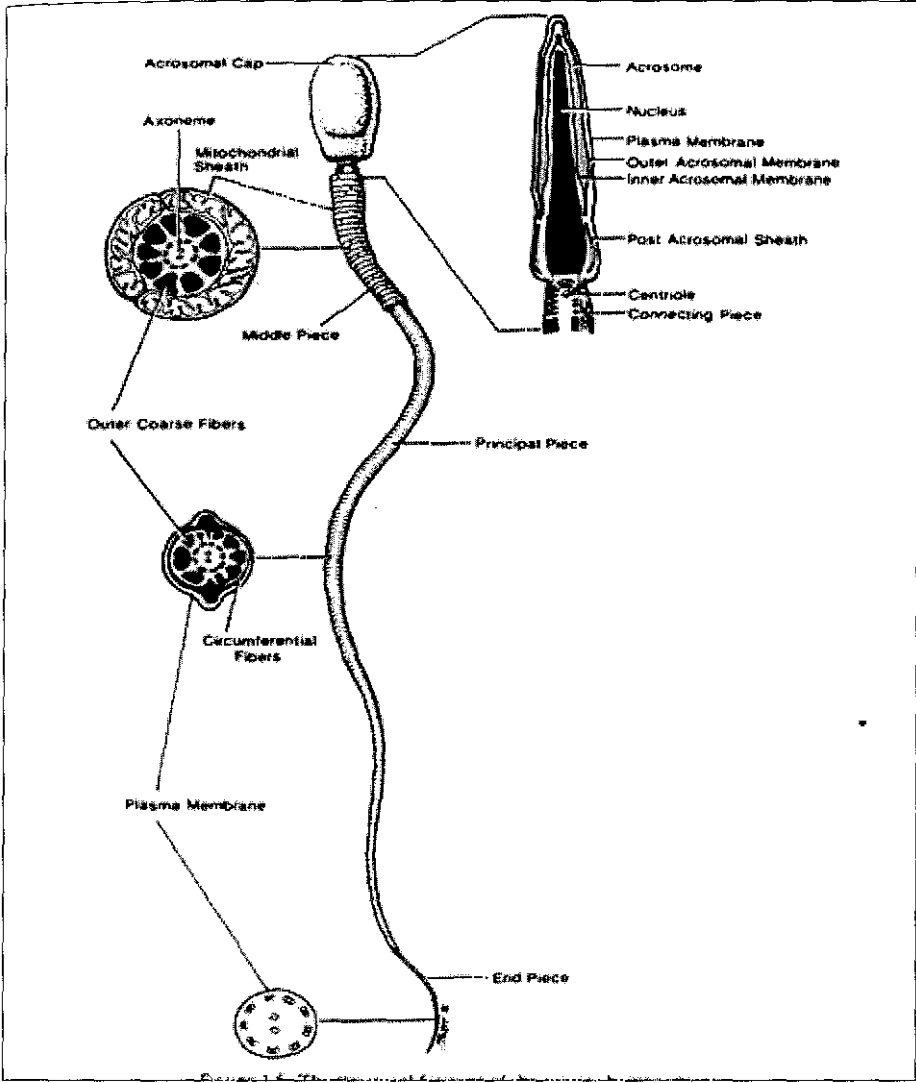
4-Flagellum oluşumunu kapsamaktadır (18, 22, 23, 24).

Akrozom geniş veziküllü golgi aparatından oluşmakta ve zona pellucida penetrasyonu için gerekli proteolitik enzimleri içermektedir (18, 22, 23, 24).

Spermatit nükleusunda DNA içeriği bağlantılarla paketlenerek minimal nükleer volüm oluşturacak hale gelmektedir (18, 22, 23, 24).

Flagellum akrozomun karşı tarafında, alt polün uzamasıyla oluşmaktadır. Flagellumun proksimal kısmında mitokondriler yoğunlaşarak mitokondriyal kılıfı oluşturmakta ve spermiogenezis tamamlandıktan sonra matür spermatazoa tubul lümenine salınmaktadır (18, 22, 23, 24), (Resim 5).

Matür spermatazoanın tubul lümenine salınması spermiyasyon olarak adlandırılmaktadır. İnsanda matür spermatazoanın oluşup tubul lümenine salınmasına kadar geçen süre yaklaşık olarak 72 gündür (18).



**Resim 5: Matür insan spermi (Wayne J.G. Hellstrom: Male Infertility and Sexual Dysfunction)**

### **2.2.2. Sertoli Hücreleri:**

Seminifer tubulde primer spermatositte spermatozoaya kadar olan sperm matürasyonu junktional kompleks üzerindeki adluminal kompartmanda gerçekleşmektedir (18), (Resim 3). Bu kompartmandaki sıvının kompozisyonu primer olarak Sertoli hücreleri tarafından sentezlenmektedir (18, 22, 25).

Sertoli hücrelerinin spermatogenezisin gerçekleşmesi için gerekli birkaç farklı işlevi bulunmaktadır; primer olarak Sertoli hücreleri, seminifer tubulde spermatogenezin devam etmesi için gerekli olan ultrastrüktürel yapının korunmasında fiziksel olarak rol oynar. Bununla birlikte Sertoli hücreleri, peritubular myoid hücrelerle kan-testis bariyerini oluşturarak mayotik ve postmayotik germ hücrelerinin interstisyel lenf ve savunma hücreleriyle karşılaşmasını engelleyerek immünolojik infertilite gelişimine engel olurlar. Germ hücrelerinin gelişmesi, matürasyonu ve metabolizması için gerekli ortamı sağlamak, fagositoz ile spermatit artıklarını temizlemek de Sertoli hücreleri tarafından yürütülen fonksiyonlar olarak bildirilmektedir. Germ hücrelerinin gelişimi, Sertoli hücrelerinin tam fonksiyon görmesine bağlıdır (18, 22, 25).

### **2.2.3. Spermatogenezin Parokrin/Endokrin Gereksinim ve Koşulları:**

Spermatogenezisin başlaması ve devam edebilmesi FSH ve testostereona bağımlılık göstermesine karşılık, germ hücreleri FSH ve testostereon reseptörleri içermemektedir. Bu özellikten dolayı germ hücreleri direkt olarak sözü edilen hormonlara yanıt verememektedir. Buna karşılık, Sertoli hücreleri FSH ve testostereon reseptörleri içermektedir. Bundan dolayı, Sertoli hücrelerinin mayotik ve postmayotik germ hücreleri ile bağlantı halinde olduğu ve buna bağlı olarak FSH ve testostereonun, germ hücrelerine olan aktivasyonlarının Sertoli hücrelerinin mediatörlüğünde gerçekleştiği bildirilmiştir (18).

Tüm bunlara karşılık, germ hücrelerinin endokrin regülasyonunun Sertoli hücreleri üzerinden düzenlenmesi tam olarak anlaşılamamıştır. Bu bilgiler ışığında Sertoli hücrelerinin;

salgıladıkları aktivin, inhibin, müllerian inhibiting substance ve diğer parokrin faktörler ile endokrin sinyallerin germ hücrelerine iletilmesinde mediatör olarak rol oynadığı akla gelmektedir (18). Tüm bunların dışında diğer parokrin faktörler de Sertoli hücrelerinin uyarılmasında rol oynar. Spermatitlerden salgılanan basic fibroblast growth faktör (bFGF), Sertoli hücrelerinde gerçekleşen protein sentezini sitümüle etmektedir. Ek olarak Leydig hücrelerinin androjen sitümülasyonu sonucu peritubuler myoid hücrelerden salınan PmodS maddesi de Sertoli hücre fonksiyonlarını uyarmaktadır (18).

Anormal spermatogenezis sıklıkla Sertoli hücre fonksiyonlarındaki azalmaya bağlıdır. Sertoli hücre disfonksiyonunda germ hücre oluşumu olumsuz olarak etkilenmekte ve sonuçta serum FSH düzeylerinde yükselme meydana gelmektedir (18).

#### **2.2.4. İnterstisyel Doku:**

Testisin seminifer tubulleri arasındaki boşluklar: bağ dokusu yoğunlaşmaları, sinir lifleri, kan ve lenfatik damarlar ile dolmuştur. Testiküler kapillerler pencereci yapıda olup, makromoleküllerin serbestçe geçmesine izin verecek şekilde düzenlenmiştir. Bağ dokusu: fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofaj gibi değişik hücre tiplerini içermektedir. Puberte sırasında ise; ek olarak bir başka hücre tipi belirgin hale gelir. Bu hücreler hem yuvarlak, hem de poligonal olabilen, merkezi bir nükleolusu bulunan, eozinofilik sitoplazmalı, küçük lipid taneciklerinden zengin ve steroid salgılayan hücrelerin özelliklerini gösteren Leydig hücreleridir. Bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu testosteronu üretirler. Leydig hücrelerin hem sayı, hem de aktiviteleri hormonal uyarılara bağlıdır. Hamilelik sırasında üretilen plasental

gonodotropik hormonlar, fetusta interstisyel hücrelerin androjenik hormonları üretmesini stimüle ederler. Androjenik hormonlar ise embriyonik farklılaşmada erkek genital organların gelişimi için gereklidir (18, 22, 24, 25).

#### **2.2.5. Kan Testis Bariyeri:**

Kan ve seminifer tubullerin iç bölgesi arasında, Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan fizyolojik bir bariyer mevcuttur. Kan testis bariyeri olarak adlandırılan bu yapı germ hücrelerini kandan gelen toksik ajanlara karşı korumak için gereklidir (18, 22, 25).

Spermatogonial hücrelerin farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immünkompetansın gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle, differansiye olan sperm hücreleri; yabancı olarak tanınabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immün cevabı teşvik edebilir. Kan testis bariyeri, seminifer tubüllere immünglobülünlerin geçmesini ve herhangi bir otoimmün reaksiyonun oluşmasını önlemektedir (18, 22, 24, 25).

### **2.2. EPİDİDİM**

Epididim baş, gövde ve kuyruk olmak üzere 3 bölümden oluşur. Baş, testisin üst polünde, gövde ve kuyruk ise posteriorunda yer alır. Epididim gövde ve kuyruğu kıvrımlı tek bir kanaldan oluşmuştur (17, 18). Rete testisten çıkan 8-20 duktuli efferentes epididim baş kısmına girerek epididim lobüllerini oluşturur. Her lobül 15-20 cm boyunda, kıvrımlı tek bir tubulustan oluşmuştur. Bu yapıların tümü birleşerek, kıvrımlı epididim kanalını oluştururlar. Toplam uzunluğu 6 metre

civarında olan bu kanalın çapı ve kalınlığı kuyruğa doğru ilerledikçe artarak duktus deferens meydana getirir (18, 21).

Epididim kanalında giderek artan yoğunlukta myoid hücreler bulunur. Rete testis kübik hücrelerle döşeliyken, epididim kanalı sekretuar ve silyalı hücrelerle döşelidir (22).

Epididimin 3 primer fonksiyonu vardır;

1-İnfertil testiküler spermin fertil sperme maturasyonunu sağlamak

2-Spermin testisten vaz deferense doğru peristaltik hareketlerle transportunu sağlamak

3-Matür sperm depolanmasını sağlamak (18, 21).

Sperm hücreleri testisten ayrıldıklarında hareketsiz ve ovum hücrelerini döleyecek kapasitede değildirler. Epididimde transport süresince sperm hücrelerinin kapasitasyonunda, motilite ve fertilizasyon yeteneğinde artma meydana gelir. Epididimde oluşan matürasyonu sırasında, sperm hücrelerinin yüzey proteinlerinde bazı değişikliklerin olduğu gösterilmiştir. Epididimde sperm hücrelerinin matürasyonu testosterona bağlıdır. Sperm hücrelerinin epididimdeki transport süresi ortalama 12 gün olup, bu süre bazı varyasyonlar gösterebilmektedir (18, 21).

## **2.4. DUKTUS DEFERENS**

Duktus deferens 30-35 cm uzunluğunda ve 2-3 mm çapında bir kanaldır (17, 18). Duktus deferens, epididimden ayrıldıktan sonra önce skrotum içinde seyrederek ve ingüinal kanala girerek funikulus spermatikus katılır. İnguinal kanaldan karın içine girdiğinde retroperitoneal olarak yukarı doğru seyrederek ve üreter alt bölümünü çaprazlayarak orta hatta ulaşır. Bu noktadan sonra ise mesanenin

posterioruna ve veziküla seminalisin lateraline gelir. Bu bölgede genişleyerek ampulla adını alır ve veziküla seminalis kanalıyla birleşerek ejakülatör kanalı oluşturur. Ejakulat r kanal 2 cm uzunluğunda olup, utrikulus prostatikusun iki tarafına açılır (18, 20).

Duktus deferens, dışta damar ve sinirleri içeren konnektif doku kılıfı, ortada iç-dış longitudinal ve orta sirküler liflerden oluşan kas tabakası ile i te sterosilia taşıyan mukoza hücrelerinden oluşur. Kas fonksiyonu sempatik innervasyona bağlıdır (18, 22). Duktus deferens spontan motilit ye sahiptir ve koit dışında da düzensiz kasılmalarla sürekli sperm taşır. Seksüel uyarılar ile birlikte bu taşınma hızlanır ve ejaklasyon anında fişkırır şekilde antegrad olarak gerçekleşir (18, 21).

## **2.5. ERKEK KONTRASEPSİYON YÖNTEMLERİ**

### **2.5.1. Koitus İnterruptus:**

Bu yöntemi kullanan çiftler, ejakülasyon oluncaya dek cinsel ilişkilerini s rd r rl r. Ejakülasyondan hemen önce erkek, penisini vajinadan geri  eker. Ejakülasyon vajinanın tamamen dışında ve kadın dış genital organlarından uzakta gerçekleşmelidir. Ejekülasyon zamanını kestiremeyen erkeklerde ve ardı ardına ikinci kez cinsel ilişkiye giren çiftlerde bu yöntem önerilmez.

Türkiye’de çiftlerin %30’u bu yöntemi kullanmaktadır. İlk uygulama yılında görülen %4-18 başarısızlık oranı bu yöntemin en önemli dezavantajıdır. Buna karşılık bütün dünyada, herkes tarafından, her durumda, hiçbir araç veya inceleme gerektirmeden ve komplikasyon ihtimali olmadan uygulanabilmesi, bu yöntemin en olumlu yanıdır (26, 27, 28).

### **2.5.2. Kondom:**

Erkeklerin kullandığı, kalıcı olmayan, etkili ve güvenilir bir bariyer kontraseptif yöntemidir. Kondom, cinsel ilişki esnasında vajinal penetrasyondan önce ereksiyon halindeki penis üzerine geçirilen bir kılıftır. Kondom spermlerin vajinaya girişini önler. Bir ucu açık silindir şeklindedir ve kapalı ucunda ise semenin toplanması için genellikle bir rezervuar vardır. Bazı kondomlar ayrıca spermisit ile kaplanmıştır. Bir yıllık kullanımda başarısızlık oranı %2-5 arasında değişir. Ucuz ve kolay bulunuyor olması, muayene ve reçete gerektirmemesi, cinsel yolla bulaşan hastalıklardan da koruması bu yöntemin olumlu yönleridir (26, 27, 28).

### **2.5.3. Hormonal kontrasepsiyon:**

Spermatogenezis hipofizer gonodotropinlerin (FSH, LH) normal sekresyonuna bağlıdır. Eksojen kökenli gonodotropin releasing hormon (GnRH) analogları, testosteron gibi seks steroidleri ve progestinler; gonodotropinleri ve aynı zamanda spermatogenezi baskılar.

Geniş multisentrik çalışmalar, haftalık yüksek doz testosteron uygulamasının gonodotropinleri ve spermatogenezisi baskılamada oldukça etkili bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ek olarak, bu yöntemin kontraseptif etkinliğinin kadınların oral kontraseptifleriyle karşılaştırılabilir olduğu bildirilmiştir. Düşük doz testosteronun, bir progestin veya bir GnRH analogu ile kombine edildiği rejimlerle yapılan çalışma sonuçları ise daha başarılı bulunmuştur. Kilo artışı ve serum HDL kolesterolün baskılanması tedavinin en önemli yan etkileri olarak bildirilmiştir. Erkekler için onaylanıp piyasaya sürülmüş bir hormonal kontraseptif henüz yoktur. Günümüzde erkek kontraseptifleri ile ilgili yapılan araştırmalarda, post-testiküler ve

epididimal bölgeler üzerinden etki edebilecek ajanlar üzerinde de durulmaktadır (28, 29).

#### **2.5.4. Vazektomi:**

Erkek kontrasepsiyonunda, tüm dünyada yaygınlaşarak uygulanan en etkili, güvenilir ve kalıcı yöntemidir (1, 2, 30). Tüm bunların dışında vazektomi; muayenehane koşullarında güvenli bir şekilde gerçekleştirilebilen basit bir yöntemdir.

**Cerrahi Yöntem:** Cerrahi ön hazırlık yapıldıktan sonra vazektomi yapılacak kişi supin pozisyonda yatırılır ve uygun genital alan temizliği yapılır. Hastanın skrotumu içindeki sağ vaz deferens cerrahın sol el işaret, orta ve baş parmakları arasında tespit edilerek, yüzeysel cilt tabakasında yaklaşık 2 cm'lik alana ince uçlu bir iğne ile lidokain enjekte edilir. Ek olarak, aynı enjeksiyon yerinden çıkılmadan iğne perivazal kılıf içinden eksternal ingüinal ringe doğru ilerletildikten sonra, vaz etrafına 2-5 ml lidokain enjekte edilir. Konvansiyonel vazektomi tekniğinde skrotal cilde anestezi yapılan yerlerden yaklaşık 1cm'lik insizyon sonrası vaz deferens ortaya çıkarılır. Çevre dokularda yer alan; deferensiyel arter, ven ve sinir serbestleştirildikten sonra, vaz kesilir ve küçük bir segmenti de eksize edilir. Vaz deferensin proksimal ve distal uçları koterize edilip bağlandıktan sonra kanama kontrolü yapılır. İnsizyon krome katküt ile sütüre edilerek kapatılır (4, 5, 30).

Vazektomi benzer anestezi tekniğini takiben skrotal insizyon kullanmaksızın da yapılabilir (30), (Li 1976). Vaz deferens, skrotum cildi üzerinden sol el baş ve işaret parmağı arasına alındıktan sonra halka uçlu fiksasyon klempsi ile tespit edilir. Klemp kısmen açılıp vaz deferens üzerindeki skrotal cilt klemp dışına doğru kaydırıldıktan

sonra, klemp tekrar kilitlenerek vaz deferensin üzerinde kalan skrotal tabaka iyice gergin ve olabildiğince ince hale getirilir. Keskin uçlu mosquito klempin açık olan ağızlarından biriyle cilt geçildikten sonra ciltteki giriş yeri aynı mosquito klemp ile genişletilerek vaz deferens görülür hale getirilir. Mosquito klempin sağ ucu 45 derecelik açı ile vaz deferens duvarından lümene doğru sokulduktan sonra, klemp 180 derece laterale döndürülerek vaz deferens ciltten dışarı çıkarılır ve fiksasyon klemp ile tespit edilir. Vaz deferensin etrafı temizlendikten sonra 1 cm'lik segment eksize edilir. Proksimal ve distal lümenleri koterize edildikten sonra her iki uç; orta boy hemoklip ile klempenir ya da sütüre edilir. Vazın her iki ucu skrotum içine itildikten sonra giriş delikleri sütüre etmeye gerek kalmaksızın kendiliğinden, kontrakte olarak kapanır. Hasta takibinde; vazektomi sonrası 3 ay süre ile cinsel ilişkiler esnasında başka bir yöntemle korunma önerilir (4, 5, 30).

**Vazektomi Endikasyonları:** Vazektomi uzun süreli antibiyotik tedavisine rağmen tekrarlayan epididimit ve epididimorşit vakalarında endikedir. Bu endikasyonun nedeni: vakaların çoğunda steril idrar ve epididimal aspirat mevcut olmasıdır. Bu bulgular, hastalarda ejakülatör kanal yoluyla idrar reflüsüne bağlı kimyasal epididimiti düşündürmektedir (31).

Vazektomi erkek kontrasepsiyon yöntemleri arasında altın standart olarak kabul edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda yaklaşık 500.000 kişi vazektomi operasyonu geçirmektedir (1, 2, 30, 31)

**Vazektomi Komplikasyonları:** Vazektomi sonrası hematoma gelişimi %1'den daha az oranda görülmekte ve bu oran cerrahın tecrübesiyle daha da azalmaktadır (29, 30, 31). Vazektomi sonrası yara enfeksiyonu ile nadir olarak karşılaşılmaktadır. Bu nedenle vazektomi öncesi profilaktik antibiyotik kullanımı gerekli değildir (29, 30, 31). Vazektomi sonrası epididimit gelişimi 500 vakada %1-3 oranında görülmekte ve bu klinik tablo gerçek epididimit şeklinde olabileceği gibi intraepididimal basınç artışına bağlı olarak da oluşabilmektedir. Epididimit tedavisinde günde 4 kez 500 mg tetrasiklin kullanılabilir. Bu tedavinin başarısız olduğu durumlarda metronidazol tercih edilmelidir. Bu tercihin en önemli nedeni; vazektomi reversal yapılan vakalarda epididimal sıvıda sıklıkla trikomonas vajinalis patojeninin saptanmasıdır. Buna karşılık tedavinin başarısız kaldığı çoğu vakada 6-12 haftalık süre içinde epididimit kendiliğinden düzelebilmektedir (31, 32, 33, 36).

**Vazektomi Sonrası Azospermi Zamanı:** Vazektomi sonrası ejakülatta spermin kaybolması, ejakülat sıklığıyla doğrudan ilişkilidir. Vakaların %80-90'ı, genellikle 12-15 ejakülat sonrası azospermik hale gelir. Vazektomi operasyonundan 3 hafta sonra, vaz deferensin abdominal tarafındaki ve seminal veziküllerdeki sperm hücrelerinde motilite özelliği kaybolmaktadır. 3. haftadan sonra motil spermelerin saptanması vaz deferenste rekanalizasyonu düşündürmelidir (31, 32).

**Vazektomi Yetmezliği:** Vazektomi yalnızca 1 klip kullanılarak yapılmışsa yetmezlik oranı %1 oranında görülürken, birden fazla klip

kullanıldığında yetmezlik oranı %0.2'den daha az olguda gerçekleşmektedir. Vazektomideki başarısızlığın en önemli nedeni

rekanalizasyon oluşmasıdır. Rekanalizasyon; vaz deferensin testis tarafında oluşan sperm granulomu formasyonundan gelişen sperm kaçağı sonucu ortaya çıkar (4, 5, 31, 32, 33). Sıklıkla rekanalizasyon post-operatif 6. haftadan sonra oluşmaktadır (31, 32). Vazektomi sonrası yetmezlik gelişirse 3 ay sonra vazektomi işlemi tekrarlanmalıdır (31).

## **2.6. VAZEKTOMİNİN GENİTAL SİSTEMDEKİ LOKAL ve SİSTEMİK ETKİLERİ**

### **2.6.1. Sperm Granulom Oluşumu:**

Sperm granuloması krem renginde ovoid yada irregüler şekilli, histolojik olarak tüberküloz granulomasına benzeyen kitlelerdir (37). Dejenere spermatazoalardan serbestleşen yağ asitlerinin kronik inflamatuvar reaksiyonu sitümüle etmesi sonucu oluşmaktadır (38). Lezyonda; dejenere spermatazoların çevresinde makrofaj, lenfosit ve plazma hücreleri izlenir (39). Sperm fagositozunu takiben spermatazoal otoantijenlerin immün sisteme sunulması, immün sistem tarafından antispermin antikorların oluşumunu stimüle eder. Vazektomi sonrası %60 oranında antispermin antikorlar oluşması bu fenomen ile açıklanabilir (30, 31, 32, 33, 34, 40). Spermatazoa antijenik özelliklerini puberte döneminde kazanmaktadır. Bu dönem vücut komponentlerine karşı immün toleransın gelişiminden çok sonraya rastlamaktadır. Normalde spermatazoa antijenleri immün sisteme karşı genital sistem epiteli boyunca izole durumdadır (18, 22, 25, 31, 32).

Buna karşılık, vazektomi sonrası bu koruyucu bariyer zarar görmektedir. Ekperimental çalışmalar immünolojik cevabın bölgesel lenfatikler ve lenf nodları tarafından düzenlediğini göstermiştir (31, 41). Spermatazoal antijenlere karşı hücresele mediatörlü oluşan immünite hakkında bilgiler az olmakla beraber, yapılan eksperimental çalışmalarda sperm granulomu duvarında T lenfositlerinin varlığı gösterilmiştir (41). Bunun dışında, vazektomi sonrası epididimal epitelyum ve intertisyumda yaygın olarak helper ve sitotoksik T lenfositleri izlenmektedir (31, 42).

### **2.6.2. Antisperm Antikorların Etkileri:**

Spermatazoa antisperm antikorları tarafından ürogenital trakta immobilize ve aglütine edilmektedir (31, 43). Vazektomi sonrası kardiovasküler hastalık riskinde artma olmaktadır. Bu durum spermatazoa antijenleri ve antisperm antikorların immün kompleks oluşturarak damar duvarında aterom plağı oluşturması yada bu alanlarda birikmesiyle açıklanmaktadır. Bunun dışında oluşan immün kompleksler böbrekte glomerüllerde birikerek renal hasar da oluşturabilmektedir (35). Vazektomi sonrası ratlarda ve insanlarda testiküler histolojik değişiklikler saptanmıştır. Buna karşılık vazovazostomi sonrası ejakülatta sperm bulunması oranının %72-86, gebelik oranının da %40-52 arasında değiştiğı bildirilmektedir (9, 44). Gerçekten de vazektomi sonrası oluşan interstisyel fibrozis ile fertilizasyon arasında zayıf korelasyon mevcuttur (31, 43, 44).

Köpeklerde vazektomi sonrası geçici spermatogenez depresyonu gösterilmiştir. Bu durum intraluminal basınç artışına bağılı oluşmakta ve birkaç hafta sonra normal spermatogenez tekrar başlamaktadır (31, 45). Vazektomi sonrası seminifer tubullerde dejenerasyon, epididim

başında granulom formasyonu oluşmaktadır. Intraluminal basınç artması seminifer tubul epitelinde dejenerasyon ve kollapsa yol açabilmektedir (46).

Vazektomi sonrası mekanik testiküler zarara ilave olarak otoimmün orşit oluşmaktadır. Bu durum hücrel mediatörlü immün cevap sonucu ortaya çıkmaktadır. Spermatozoal antijenlere karşı oluşan antikolar ve T lenfositleri seminifer tubul epitelinde destrüksiyona sebep olmaktadır. Seminifer tubul bazal membranında immün kompleksler birikmekte ve lenfosit infiltrasyonu oluşmaktadır (31, 47).

Vazektomi sonrası malignite gelişim olasılığı incelendiğinde; testis kanseri gelişme riskinde herhangi bir artış saptanmazken, prostat kanser gelişimi açısından hafif artmış bir risk olabileceği bildirilmiştir (52, 53). Buna karşılık, vazektomi sonrası serum testosteron seviyeleri ise genellikle normal sınırları arasında kalmaktadır (31, 48).

Vazektominin epididimal kanal üzerinde yaptığı değişikliklere bakıldığında; epididimde dilatasyon ve granulasyon formasyonu olduğu bildirilmiştir. Buna karşılık, artan intralüminal basınç sonucu oluşan epididimal destrüksiyon, vazektomi reversal ile normale dönebilmektedir (31, 49). Ultrasonografik inceleme ile de vazektomi sonrası epididimal genişleme ve kist oluşumu izlenebilmektedir (50). Vazektomi sonrası, %6 oranında epididimit ile karşılaşmaktadır. Bu tablonun sıklıkla konjestif yada immünolojik nedenlere bağlı olarak geliştiği bildirilmekte ve enfeksiyon ajanı sıklıkla tespit edilememektedir. Olguların %15-20'sinde skrotumda sıkıntı veren ağrı oluşmakta ve bu durum seksüel aktivite ve ejakulasyon sırasında artmaktadır (51). Epididimal dilatasyon ve intraluminal basınç artışı

sonucu oluşun ağrı vazektomiye takip eden ilk birkaç ay içerisinde meydana çıkmaktadır (7, 31, 34).

## **2.7. VAZEKTOMİ ve SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ (SOR)**

Erkek genital traktında serbest oksijen radikalleri (SOR) spermatazoa ve lökositler tarafından oluşturulmaktadır. SOR karmaşık sperm fonksiyonlarının regülasyonunda, kapasitasyon ve akrozomal reaksiyonda rol oynar (67). Ürogenital sistemde oluşan enfeksiyonlar sırasında aşırı düzeyde SOR oluşur. Oksidatif patlama olarak tanımlanan fenomen; makrofajlar ve lökositlerin enfeksiyona karşı birinci savunma mekanizmasını oluşturur. Bu durum bakteri ve virüsün pro-oksidant mekanizması ve birkaç sitokin tarafından modüle edilir. Enfeksiyonun etkisiyle lökositlerden aktivasyon derecesine göre SOR salgılanır. Antioksidatif sistem oluşacak spermatazoa zararının derecesini belirler. Enfeksiyon sırasında, pro-oksidant ve antioksidant mekanizmalardaki yetersizlik sonucu olarak; oksidatif stres sperm fonksiyonlarında bozulma, motilite ve fertilizasyon yeteneğinde azalmaya yol açabilir. Enfeksiyon sırasında artan SOR ve antioksidant mekanizmalardaki yetersizliğin bir sonucu olarak; testis, epididim ve özellikle spermatazoanın uzun süre SOR ile karşı karşıya kalması, geri dönüşümsüz zararlı etkiler oluşturabilir. Bunun dışında enfeksiyon orijinli SOR'un prostat glandı, seminal vezikül ve testiste yaratmış olduğu bozulmanın indirekt bir sonucu olarak da sperm fonksiyonlarında bozulma meydana gelebilir (68).

Oksijen insan yaşamı için vazgeçilmez bir elementtir. İnsan vücudunun enerji ihtiyacı; mitokondride oluşan enzimatik kontrollü

oksijen ve hidrojenin oksidatif fosforilasyonu ile sağlanmaktadır. Bu reaksiyonun basamaklarında açığa çıkan NADH'nin indirgenmesiyle oluşan enerji, ATP sentezi için kullanılmaktadır. Bu basamaklar esnasında serbest oksijen radikalleri olan; süperoksit anyon  $O_2^-$ , hidroksil radikal ve hidrojen peroksit de oluşmaktadır (68, 69).

SOR, kısa yaşam süresi olan biyokimyasal ara ürünlerdir. Bu ürünlerin katıldığı reaksiyonlar; hidrojen absorpsiyonu, çapraz bağ oluşturma ve yok etme reaksiyonlarıdır. Bundan dolayı SOR, hücre membranında lipid, aminoasit, karbonhidrat oksidasyonu, nükleik asit zedelenmesi ile hyaluronik asit depolimerizasyonuna ve sonuç olarak da oksidatif zedelenmeye yol açar (70). Bu moleküllerin oluşmasında anahtar komponent inflamasyon, iskemi-reperfüzyon zedelenmesi, enfeksiyon ve karsinogenezdendir (70, 71).

Düşük konsantrasyondaki SOR düzeyleri selektif ve biopozitif etki oluşturmaktadır. SOR'lar prostanooid metabolizmasında metabolik ara ürünlerdir. Vasküler tonusun regülasyonunda, nükleer transkripsiyon faktör beta (NF- $\kappa$ B) aktivasyonunda, sellüler büyüme regülasyonunda, intra ve ekstrasellüler sinyal transdüksiyonunda rol oynarlar. Tüm bunların dışında antimikrobiyal defansta, immünolojik gözetimde ve makrofaj sitotoksitesinde önemli görevleri bulunmaktadır (72). Yüksek konsantrasyondaki SOR düzeyleri nonspesifik ve biyonegatif reaksiyonlara girerek biyolojik zarara yol açarlar (73).

Eksperimental çalışmalar SOR ile sperm fonksiyonları arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Sperm kapasitasyonunun başlaması, SOR'ların artmasını takip eden tirozin fosforilasyonu ardından gerçekleşir. Bu durum; SOR'un artması ile spermatazoada transdüksiyon sürecinin başlaması arasındaki bağlantıyı

göstermektedir. SOR'lar yanında diğer bazı faktörler de (kalsiyum, adenil siklaz/cAMP, glikoz, ekstrasellüler sıvıdaki bikarbonat) sperm kapasitasyonu üzerinde etkilidir (89). Güncel bilgiler, akrozomal reaksiyonun spermatözoda yapılan ekstrasellüler süperanyon ile de bağlantılı olduğunu göstermektedir. Tüm bunların dışında düşük konsantrasyonda NO'in de sperm kapasitasyonunun gelişmesine katkıda bulunduğu bildirilmektedir (89, 90).

Aydos ve arkadaşlarının vazal obstrüksiyon oluşturarak gerçekleştirdikleri eksperimental çalışmalarda, vazektominin germinal epitele zarar verdiği ve testiküler ultrastrüktürel yapıda değişikliklere neden olduğu bildirmiştir (95). Bu çalışmalarda testiküler histoloji elektron mikroskopi ile ayrıntılı olarak incelenmiştir. Çalışmaların sonucunda: seminifer tubul çapında artma, germ hücre sayısında azalma, bazal membran kalınlığında artma, immün deposit birikimi, instersitisiyel fibrozis ve testiküler doku kapasitesinde azalma oluştuğunu gösterilmiştir (95). Yine vazal obstrüksiyon sonrası; morfolojik olarak normal ya da anormal hücrelerin, SOR'ların fazla miktarda oluşmasına ve birikmesine neden olduğu belirtilmiştir. Vazal obstrüksiyon sonrası artan SOR'un, testiküler histolojik yapıda görülen değişikliklerle neden olduğu bildirilmiştir. Özet olarak: vazektomi sonrası oluşan SOR seviye yükselmeleri ile testiküler doku hasarı arasında korelasyon olduğunu gösterilmiştir (94, 95).

### **2.7.1. SOR'un Sperm ve Sperm Fonksiyonları Üzerine Etkisi:**

SOR'ların artması veya koruyucu antioksidan mekanizmaların azalması sperm patofizyolojisinde bozulma ile infertilite nedeni olabilmektedir (76).

Tüm hücrel komponentler, lipidler, proteinler, nükleik asit ve karbonhidratlar SOR'ların potansiyel hedefidir. SOR'ların neden olduğu değişikliklerin tipi ve derecesi sadece SOR'ların cinsi ve miktarına bağlı değildir. Bunların dışında, SOR'lara maruziyet süresi, ekstrasellüler faktörler, ısı, oksijen basıncı ve çevre kompozisyonundaki protein ve iyon yoğunluğu ile de ilişkilidir (79). SOR'lar sperm hücreleri üzerine olan etkilerini; membran lipid peroksidasyonu, hücre içi ATP miktarında azalma ve DNA içeriğinde bozulmaya yol açarak gösterirler

**Lipid Peroksidasyonu:** Spermatazoa, yapısındaki yüksek oranda doymamış yağ asidi bulunması nedeniyle oksidatif ataktan kolayca etkilenebilir. Lipid peroksidasyonunun artması spermatazoa için toksik etki oluşturur. Yüksek miktardaki doymamış yağ asitleri, membran akışkanlığı ve membran bütünlüğünün sağlanmasında rol oynar. Bu özellik fertilizasyon ile yakından ilişkilidir. Lipid peroksidasyonu sonucu plazma membranında fosfolipid, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilkolin kaybı meydana gelmektedir (80). Membran akışkanlığında ve membran bütünlüğünde rol oynayan bu moleküllerin azalması, spermatazoa fonksiyonlarında bozulmaya neden olur. Bunun dışında membran akışkanlığının bozulması da sperm-oosit birleşme düzeyinde azalmaya neden olmaktadır (81). SOR'ların etkisiyle lipid peroksidasyonunun artması; sperm motilitesinde ve canlılığında azalmaya sebep olur. Yapılan çalışmalar sonucunda önemli bir SOR olan  $H_2O_2$ 'nin sperm motilitesinde azalmaya yol açtığını gösterilmiştir (82).

SOR'ların yükselmesi hücre içi ATP düzeyinin azalmasına ve cAMP seviyesinin artmasına bağlı olarak aksonemal protein

fosforilasyonuna ve sperm immobilizasyonuna neden olmaktadır (83). Bununla birlikte, SOR düzeyinin artması sonucu; DNA iplikçiklerinde kırılma ve kromatin çapraz bağlarında kopma meydana gelmektedir. İnfertil erkek hastaların spermatazoalarında yaygın DNA fragmantasyonları gösterilmiştir (84). Bu bulgu SOR'ların oluşturduğu zararı açıklayan güçlü bir kanıttır. Spermatazoa DNA'sında zararın oranı ile fertilizasyon oranı arasında negatif korelasyon mevcuttur. Sperm DNA'sındaki zedelenme; fertilizasyon yeteneğinde azalma ve erken embriyo ölümüne neden olmaktadır (85).

Sonuç olarak; birçok çalışmada değişik tekniklerle infertil erkeklerin ejakülatında artmış SOR gösterilmiştir. Bu durum daha önceden belirtildiği gibi spermatazolarda aşırı miktarda SOR'ların üretimine bağlıdır (86).

### **2.7.2. Antioksidatif Korunma:**

Antioksidantlar; askorbat, glutatyon, membrana bağlı antioksidantlar, tokoferol ve ubiquinol, ekstrasellüler süperoksit dismütaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalazları içermektedir (74). Antioksidantlar etkilerini; SOR'ların oluşumunu engelleyerek ve sekonder reaksiyonla SOR'ların reaksiyon yollarına karışarak gösterirler. SOR düzeyinin antioksidant eşik değerini aştığı durumlarda oksidatif sellüler yaralanma oluşur. Antioksidant mekanizmanın üçüncü etkisi hücre yenilenmesi olup, bu etki spermatazoalar için geçerli değildir (75). Özet olarak: antioksidantlar biyolojik dokuları SOR'ların olumsuz etkilerine karşı korurlar (76).

### **2.7.3. Antioksidan İlaçlar:**

Antioksidant droglar, endojenik defans mekanizmasını stimüle ederek ve SOR oluşumunu ve/veya etki mekanizmasını inhibe ederek etki gösterirler. Bu droglar yerine koyma tedavisi (süperoksit dismütaz, tiol, vitamin C ve vitamin E), şelatizan ajanlar (desferoksamin), süperoksit anyon inhibitörleri (allopurinol), süperoksit anyon temizleyicileri (flavonoidler), hidrojen peroksit eliminatörü (glutatyon) olarak sayılabilir (91).

SOR'un zararlı etkileri antioksidatif suplemantasyon ile giderilebilir. Bu amaçla vitamin C ve E kullanılabilir. Bu droglar, SOR'un yapımını azaltarak sperm motilite kaybını önlerler ve kapasitasyonunu artırır (92). Bunun dışında, terapötik konsantrasyonlarda bazı antibiyotikler de (tetrasiklin, eritromisin) SOR'un yapımını azaltır. Sözü edilen antibiyotiklerin tedavisi seminal enfeksiyonlu erkeklerde sperm parametrelerinde düzelmeye, antioksidant aktivitede artışa, IL4 aktivitesinde artışa ve IL2 ile IL 8 aktivite azalmasına yol açmaktadır (93).

#### **2.7.4. Serbest Oksijen Radikallerinin Ölçümü:**

SOR'lar kısa yaşam süreleri olan biyolojik ara ürünler olduğundan, direkt olarak ölçümleri zordur. Bu moleküllerin direkt ölçümleri elektron paramanyetik rezonans spektroskopisi ile yapılabilir. Bunun dışındaki metodlar ile SOR'un düzeyi indirekt olarak gösterilmektedir (77, 78).

Malondialdehit (MDA), çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu, deoksiribozun bir hidroksil radikaliyle yıkımı ve prostoglandin sentezinin bir yan ürünü olarak meydana gelir. MDA'nın; yaşlanmada, mutagenizde ve karsinogeneizde rol oynadığı gösterilmiştir. MDA ölçümü: yaşlanma veya dejeneratif hastalıklar

gibi in vivo durumlarda meydana gelen lipid peroksidasyonunun şiddetinin ve besinlerde meydana gelen oksidatif bozulma miktarının bir göstergesi olarak uzun süre kullanılmıştır. Biyolojik örneklerdeki MDA'yı tespit etmek amacıyla; TBA (tiyobarbitürikasit) testi, HPLC (yüksek performanslı likit kromatografisi) ile direkt saptama, MDA/TBA-HPLC metodları, MDA/fenilhidrazin-HPLC metodları ve gaz kromatografisi gibi metodlar geliştirilmiştir (77, 78).

Lipid peroksidin ürünü olan MDA; hücre ve dokulardaki oksidatif hasarın göstergesidir. Biyolojik örneklerde lipid peroksidasyonu sonucu üretilen MDA'nın, bağlı formlara çevrildiği; bu formların da yapısal olarak biyomoleküllerin primer amino grupları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (77, 78).

MDA için geçerli analitik tetkikler, TBA ile reaksiyon üzerine kuruludur. TBA, MDA dışında birçok madde ile de reaksiyona girebilir. Diğer lipid oksidasyon ürünleri, safra pigmentleri, aminoasitler ve şekerler bu maddelere örnek gösterilebilir. Tüm bu reaksiyonların sonucunda interferans veren kromojenler meydana gelir (78)

## **2.8. NİTRİK OKSİT (NO) ve NİTRİK OKSİT SENTETAZ (NOS)**

Nitrik oksit (NO) yüksek yapılı canlılarda çok önemli biyolojik fonksiyonları yerine getirmek üzere üretilen nitrojen merkezli bir radikaldir (54). Paylaşılan elektron gerçekte nitrojen atomuna ait olmasına karşılık, bu elektronun hem nitrojen hem de oksijen atomu üzerinde lokalize olması nedeniyle tam bir radikal özelliği taşımaz. Bunun sonucu olarak bilinen diğer radikallere göre reaktivitesi

baskılandığından oldukça uzun ömürlüdür (55). NO birçok hücrede, bir aminoasit olan L-arginin'in nitrik oksit sentetaz enzimi (NOS) tarafından terminal guanidin gurubunda oluşturulan değişim sonucu üretilir. Bu tepkime, moleküler oksijen ve kofaktör olarak NADPH gerektirir (55, 56).

NO, birçok biyolojik cevabın regülasyonu ile ilgili bir moleküldür (57). Genitoüriner sistemde NO, nonadrenerjik nonkolinerjik nörotransmisyon yapan bir nörotransmitter ve endotelial hücrelerden salınabilen bir vazodilatatördür. Ayrıca epitelial kökenli faktör olduğuna dair kanıtlar da mevcuttur. NO'nun genitoüriner dokularda bölgesel kan akımı, düz kas fonksiyonu ve sekretuar cevaplarda rol oynadığı bilinmektedir (13, 14, 15, 16, 57).

Çok sayıda temel hücre fonksiyonu, NO'nun değişik hücre konsantrasyonları ile düzenlenmektedir. Bu hücre fonksiyonları arasında; inflamatuvar aktivite, nöromediatörlerin aktivitesi ve metabolizması, kas iskelet hücrelerinin relaksasyonu, hücre aktivasyonu, differansiyasyonu ve proliferasyonu için gerekli genlerin ekspresyonu yer alır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda NO'nun tümör progresyonunda ve normal dokuların bazı belirli hiperplazi tiplerinde anjiogenezi stimüle ettiği bildirilmiştir (58, 59, 60, 61).

Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi sırasında ortaya çıkan NO dışında, endojen NO oluşturan tek kaynak; nitrik oksit sentetaz (NOS) enzimleridir. Bu enzimin nöronal (nNOS), endotelial (eNOS), ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere 3 formu bulunmaktadır (54, 56, 57, 58, 63).

nNOS ve eNOS konstitütif izoformlar olup, nNOS ve eNOS enzimleri tarafından üretilen çok düşük derişimdeki NO, sinir sistemi ve düz kaslarda hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olarak

görev yapar (54, 56, 62). Haberci molekül olarak sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek, hücrelerde siklik guanilat mono fosfat (cGMP) düzeyini arttırır. cGMP ise çeşitli enzimler aracılığı ile hücre içi kalsiyum konsantrasyonunun düzenlenmesini sağlar. cGMP kofaktör olarak kalsiyum ve kalmoduline bağımlıdır ve hücre içi kalsiyum düzeyini arttıran agonistlere yanıt verir. Hücre içi kalsiyum düzeyinin yükselmesi, kalmodulinin NOS'a bağlanmasını uyarır ve anında pikomol düzeylerinde NO sentezlenir. Kalsiyum bağlayan maddeler ve kalmodulin inhibitörleri bu yolla sağlanan NO sentezini önleyebilir. nNOS, ürogenital dokularda yaygın olarak bulunup, ereksiyon ve prostatın vazomotilitesinde spesifik bir rol oynadığı düşünülmektedir (56, 58, 60, 62, 63, 64). Kalsiyuma bağımlı konstitütif NOS ve sitokin ile indüklenebilir NOS etkisiyle oluşan NO miktarının artmasının, sperm motilitesinde azalmaya yol açtığı bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Süperoksit anyon ile NO'nin reaksiyonu sonucu oluşan reaktif peroksinitrit de bu tablonun ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır (87, 88).

iNOS; başka hücreler aracılığıyla tarafından daha zaman alıcı bir biçimde (transkripsiyon düzeylerinde) ve daha uzun süre uyarılıp (diğerlerinden en az 1000 kat daha fazla) NO üreten, kalsiyumdan bağımsız bir sistemdir (13, 14, 56). Endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, makrofaj, nötrofil, kalp kası ve endokard hücrelerinde değişen düzeylerde iNOS ekspresyonu gösterilmiştir. NO'nin yoğun olarak bulunduğu prototip hücreler makrofajlardır. Bu hücrelerde sitokin uyarısı sonucunda, birkaç saat içinde başlayan ve günler süresince nanomol düzeylerinde süren NO sentezi söz konusu olmaktadır. Sitokinler tarafından aktive edilmiş makrofajlar, L-argininin 1/3'ünü NO üretmek üzere kullanmaktadır. Sentez uyarısı

esas olarak endotoksin, IL-1, TNF ve interferon- $\gamma$  tarafından yapılır. Buna karşılık bazı hücrelerden salınan IL-8, IL-10 ve TGF-B gibi sitokinler, NO sentezini yavaşlatabilir. Ek olarak glukokortikoidler de iNOS enziminin uyarılmasını engelleyebilir (54, 56).

Sentezlenen NO miktarı ve sentez süresinin uzunluğu, NO etkisinin fizyolojik yada patolojik olmasını belirleyebilir (56). Normal fizyolojik ortamda sürekli, düşük miktarlarda NO'nun guanilat siklazi uyarması sonucu: Hücre içindeki cGMP seviyesinin artması, kan damarlarının gevşemesi, trombositlerin endotele yapışmasının engellenmesi, iyon kanallarının açılması ve kapanması gibi etkiler ortaya çıkar (56, 58). Buna karşılık, patolojik olarak yüksek miktarlarda sürekli NO üretimi; hücre solunumu, enerji üretimi ve hücre çoğalmasıyla ilişkili demire bağımlı enzimlerin inaktifleşmesine yol açar (63).

NO aktivitesi, NO'nun esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır (62). Oksijen radikallerindeki durumun aksine NO'ı ortamdaki temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. Aerobik ortamda NO stabil olmayıp; derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır (54, 62). Bu nedenle, NO'nin ortamdaki derişimi ile kendi ömrü arasında ters bir orantı bulunmaktadır. Özellikle iNOS enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler; NO'in dolaylı etkilerinden sorumlu olup; hücresel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna ve nitrozasyonuna yol açarak proteinlerin/enzimlerin inaktivasyonuna neden olabilir (54, 56, 62).

### **2.8.1. NOS İnhibitörleri:**

NO üretiminin inhibisyonu için çok farklı maddeler kullanılabilir. Bunların bir kısmı NOS'u inhibe ederken bir kısmı da doğrudan NO'ı inhibe edebilir.

**1-Arginin Analogları:** Günümüzde en yaygın kullanılan NOS inhibitörleridir. N-monometil L-arginin (L-NMMA) kompetitif ve irreversibl inhibisyona yol açar. Bir diğer yaygın kullanılan inhibitör ise N-nitro L-arginin (L-NNA) ve bu maddenin metil derivesi olan L-NAME'dir. Bu ajanların özellikle nNOS için seçicilik gösterdikleri bildirilmiştir (65, 66).

**2-Nitrojen içeren bileşikler:** Bu ajanlar nNOS ve iNOS'u inhibe eder. Bu ajanlar içinde en çok üzerinde durulan 7-nitroindazol olup, nNOS için yarışmalı inhibisyona girer. Bu ajan özellikle makrofajların aşırı NO üretiminden kaynaklanan patolojik durumlarda kullanılabilir (65, 66).

**3-) NADPH bağımlı FAD ve FMN inhibitörleri :** nNOS ve iNOS etkilerini FAD ve FMN kofaktörleri aracılığıyla gösterirler. Bu özellikten dolayı; Difeniliodinium klorid gibi flavoprotein inhibitörleri nNOS ve iNOS inhibisyonunda kullanılabilir (65, 66).

### **2.8.2. NO inhibitörleri:**

Bir kez sentezi yapılan NO çok hızlı bir şekilde hedef hücrelere diffüze olur. Serbest NO, etkisizleştirici bazı moleküller ile işlev görmeden bloke edilebilir. Bu grupta en çok kullanılan maddeler; metilen mavisi, hemoglobin, fusidik asit ve karboksi-2-fenil-4,4,5,5-tetrametilimidazolin-1-oksil (karboksi-PTIO) olarak sıralanabilir (65, 66).

### **3. GEREÇ ve YÖNTEM**

Çalışmada ağırlıkları 240 ile 320 gram arasında değişen Wistar-albino cinsi adult erkek 22 adet rat kullanıldı. Ratların 14'üne tek taraflı (sol) vazektomi uygulandı. Buna karşılık "sham" operasyonu uygulanan 8 rat kontrol gurubu olarak değerlendirildi.

#### **3.1. CERRAHİ TEKNİK**

Operasyon öncesi bütün ratlara anestezi amaçlı, 15 mg/kg Rampun (xsilariid hidroklorid) ve 40 mg/kg dozunda Ketamine intraperitoneal enjeksiyon uygulandı. Betadine ile cerrahi saha temizliği yapıldıktan sonra 1.5 cm'lik orta hat insizyonu uygulanarak sol vaz deferens bulunup 4/0 ipek ile bağlandı ve 1 cm'lik vaz eksizyonu uygulandı. Deferensiyel ve testiküler arter disseksiyon sırasında özenle korundu. Daha sonra cilt altı yağ dokusu ve cilt 4/0 kromik katkı ile ayrı ayrı olarak sütüre edilerek kapatıldı. Sham grubuna aynı cerrahi prosedür vaz ligasyonu ve eksizyonu yapılmadan uygulandı. Tüm ratlara post-operatif 1. ayda bilateral orşiektomi uygulanarak, bilateral testis ağırlıkları ölçüldü. Serum FSH, LH ve testosteron ölçümü için abdominal aortadan 10cc kan alındıktan sonra bütün ratlar "yüksek doz eter" ortamında sakrifiye edildi.

#### **3.2. TESTİS DOKUSU PATOLOJİK İNCELEMESİ**

Operasyon sonrası orşiektomi materyali patolojik inceleme amacıyla %10'luk formalin solüsyonunda fikse edildi. Fiksasyon işleminden sonra tüm materyaller makroskobik ve mikroskobik olarak incelemeye alındı. Her iki gruptaki hayvanların orşiektomi materyallerinden en az iki doku örneği alınarak doku takibi işlemlerinden geçirilip parafin ile kaplandı. Bu işlemlerin ardından, parafin bloklardan 4 mikron kalınlığındaki hazırlanan testis doku preparatları peroksit ve ardından 10 dakika süre ile asetonla muamele edildi. Daha sonra, preparata rat serumu damlatılarak 5 dakika süre ile bekletildi. Takibinde preparat 30 dakika boyunca oda ısısında iNOS antiserum ile enkube edildi (1/100 Santa Cruz Biotenology, Santa Cruz California). Antikor, inkübasyondan sonra biotin horseradish peroksidase complex universal LSAB kit kullanılarak vizualize edildi. Takibinde hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Preparat etanol ile yıkanarak dehidrate edildikten sonra xylene ile temizlendi ve lamel kapatılarak hazırlandı. Kontrol grubunun preparatları aynı zamanda ve yöntemle hazırlandı. Negatif kontrol testi nonspesifik IgG1 antikor içeren serum kullanılarak yapıldı.

iNOS boyanma yüzdesi, yoğunluğu ve iNOS ekskresyon skorlaması ayrı olarak yapıldı. iNOS yoğunluğu; negatif, hafif düzeyde ekspresyon, orta düzeyde ekspresyon ve kuvvetli düzeyde ekspresyon olmak üzere sınıflandırıldı. %0-10 arasında iNOS boyanması negatif ekspresyon, % 10-30 arasında iNOS boyanması hafif düzeyde ekspresyon, %30-50 arasında olan iNOS boyanması orta düzeyde ekspresyon ve %50 den fazla iNOS boyanması kuvvetli düzeyde ekspresyon olarak sınıflandırıldı.

### **3.3. MALONDİALDEHİT ÖLÇÜMÜ**

Biyokimyasal olarak molandialdehit ölçümü yapılana kadar, vazektomi ve kontrol gurubu bilateral testis dokusu sıvı azot ile “snap frozen” uygulandıktan sonra  $-70^{\circ}\text{C}$  içerisinde muhafaza edildi. Çalışma günü dokular derin dondurucudan alınarak, Tri-R Stir-R marka mekanik homojenizatör ile dakikada 10000 devir olacak şekilde ve  $\text{pH}=7,4$  olan 50 mM potasyum fosfat tamponu içinde 5 dakika boyunca homojenize edildi. Sonrasında, elde edilen homojenat  $+4^{\circ}\text{C}$  40000 rpm devirde 30 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantda protein quantifikasyonu yapıldı. Proteinlere alkali ortamda  $\text{Cu}^{+2}$  ile reaksiyona girerek kompleks oluşturuldu. Bakır-protein kompleksi bir elektron vericisi olarak hareket ettiğinden, ortama eklenen Folin Ciocalteu reaktifinin yoğun renkli molibdenyum ve tungsten mavisine indirgemesi sağlandı. Oluşan rengin absorbansı 750 nm’de ölçüldü.

Doku TBARS tayini Wasovicz ve arkadaşlarının fluorometrik metoduna göre yapıldı (78). Primer olarak MDA’dan oluşan TBA-reaktif maddeler (TBARS) iki molekül TBA ile kırmızı renkli bir ürün (MDA-TBA<sub>2</sub>) oluşturur. Oluşan MDA-TBA ürününün, düşük pH’da n-bütanol ile ekstraksiyonundan sonra 525 nm (eksitasyon) ve 547nm (emisyon) dalga boylarında fluoresansı ölçüldü.

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopisinde incelenerek semifer tubul çapı ölçüldü ve Johnsen skorlaması yapıldı. Bu skorlama insan seminifer tubul matürasyonunu değerlendirmek amacıyla 1970’de Johnsen tarafından tanımlanmış, histolojik bulguların değerlendirildiği bir sistemdir (101). Rat testisinin değerlendirilmesinde kullanılan Johnsen skorlaması, Lewis-Johnes ve Kerringan tarafından tanımlanmıştır (102). Bu skorlama sistemi EK-1’de gösterilmiştir.

### **3.4. EK 1 RATLAR İÇİN JOHNSEN SKORLAMASI**

Skor-1: Seminifer tubulde hiç hücre bulunmamaktadır.

Skor-2: Seminifer tubulde germ hücresi bulunmaz, sadece Sertoli hücreleri vardır.

Skor-3: Seminifer tubulda sadece spermatagonia bulunmaktadır

Skor-4: Seminifer tubulde birkaç spermatosit vardır. Spermatid veya spermatazoa izlenmez.

Skor-5: Seminifer tubulde rasgele dizilişli, nukleusları soluk kromatinli immatür spermatidler bulunmaktadır. Piknotik yapı izlenmez.

Skor-6: Seminifer tubulde soluk kromatinli dar oval başlı mid-faz spermatidler radial olarak dizilmiş izlenir. Piknotik yapı izlenmez.

Skor-7: Seminifer tubulde 10 dan az spermatazoa izlenmektedir. Tubuldeki hücrelerin çoğunluğunu matür spermatidler oluşturur. Hücrelerin nukleusları periferik yerleşimli ve soluk kromatin zincirlidir. Piknotik yapı içermezler.

Skor-8: Seminifer tubulde koyu nuklear zincirli spermatazoa izlenmektedir. Spermatozoalar tubul içerisinde periferik yerleşimlidir ve piknotik yapı içerirler.

Skor-9: Bazı kriterler 10'a benzer, fakat germinal epitelde kötleşme lümende obliterasyon olabilir.

Skor-10: Seminifer tubulde tamamen matur spermatazoa izlenmektedir. Piknotik yapılar mevcuttur.

### **3.5. SERUM FSH, LH ve TESTOSTERON HORMONLARININ ÖLÇÜMÜ**

Testis fizyolojisinin önemli göstergeleri olan FSH, LH ve testosteron hormonlarının serum düzeyi, İmmulite 2000 Analyzer cihazında immunometrik assay prensibine göre ölçüldü (96).

Sonuçlar Mann-Whitney ve Wilcoxon Signed Ranks testleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi.  $P<0.05$  anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. iNOS ekspresyonları yönünden vazektomi ve sham gruplarının karşılaştırılması:

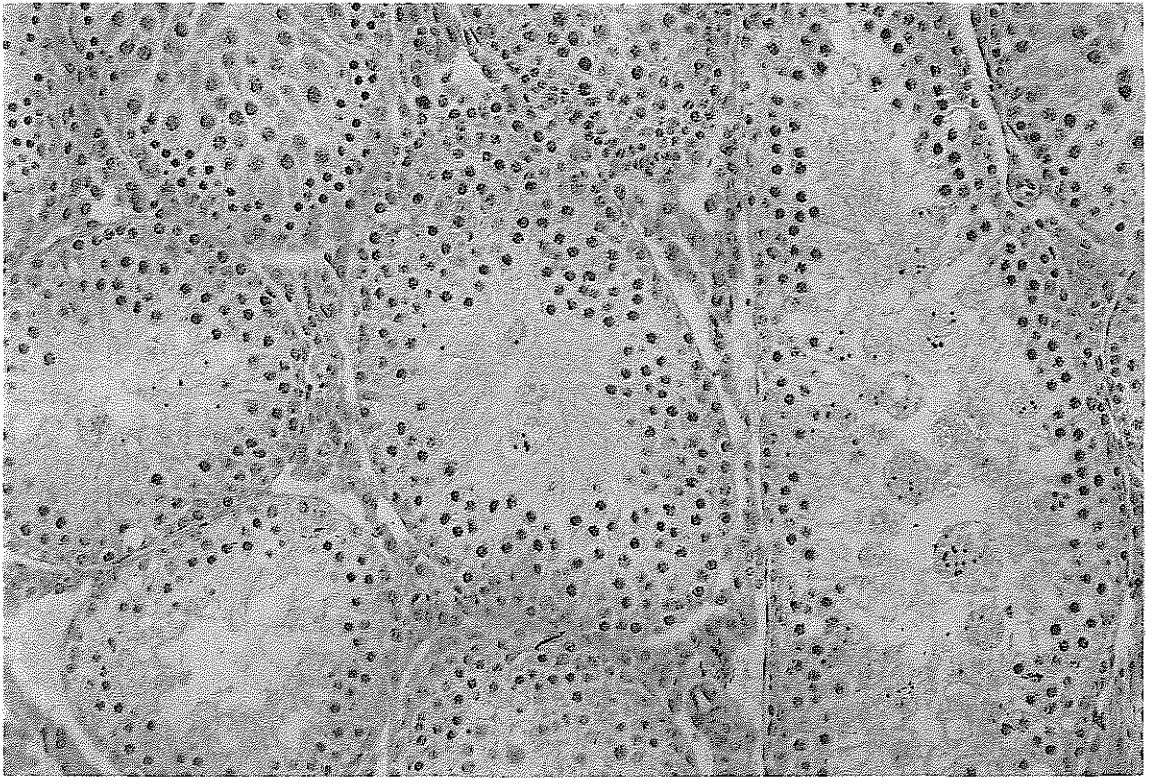
Vazektomi uygulanan ratlarda sağ ve sol testisler arasında iNOS ekspresyon yoğunluğu, boyanma yüzdesi ve toplam skorlarının karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0.70$ ). Benzer şekilde sham grubunda da sağ ve sol testis arasında iNOS ekspresyon yoğunluğu, boyanma yüzdesi ve toplam skorlar karşılaştırıldığında yine istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı tespit edildi ( $p=0.57$ ), (Resim 6, 7). Buna karşılık, vazektomi ve sham grubunda iNOS ekspresyon yoğunluğu, boyanma yüzdesi ve toplam skorlarının karşılaştırılmasında sağ ve sol testisler arasında, istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü (sağ  $P=0.02$ , sol  $P=0.03$ ), (Resim 8). Tablo 1 ve 2’de her iki testis iNOS yoğunluk, boyanma yüzdesi, toplam skorları ve ortalama değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 1: Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan gruplarda sol/sağ testis seminifer tubul çapı, Johnsen skorlaması ve toplam iNOS skorlar ortalamala değerleri**

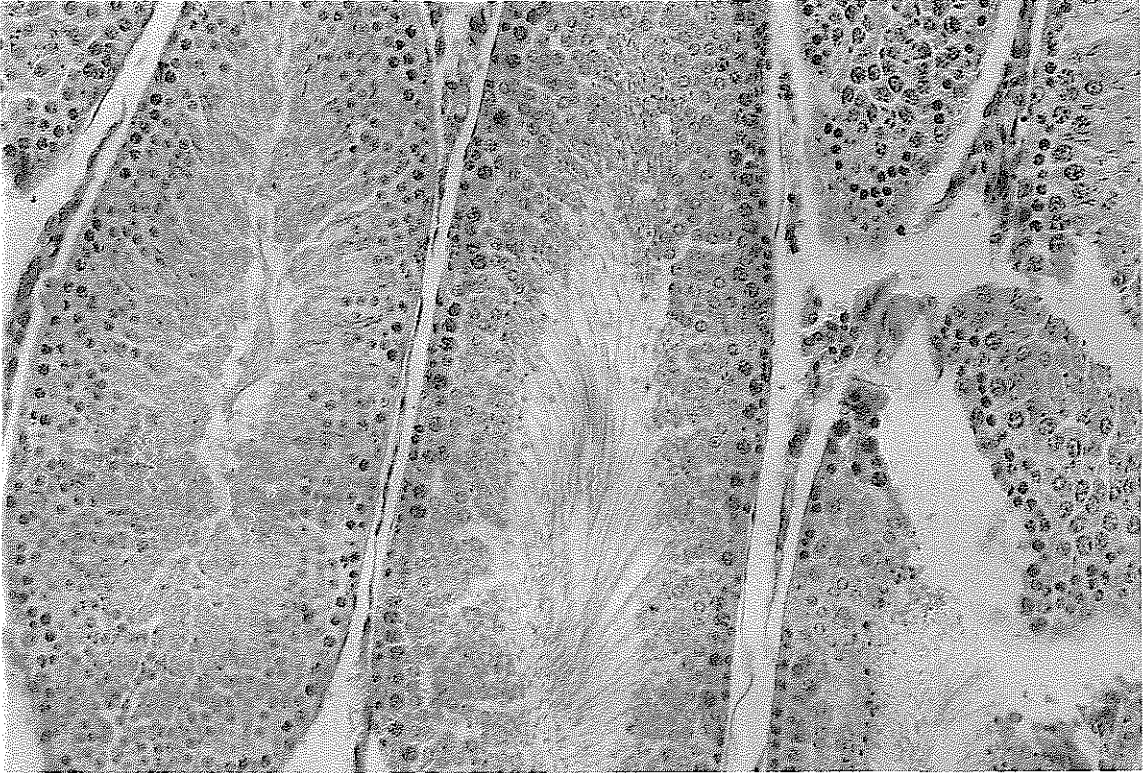
| Grup      | Testis | Seminifer Tubul Çapı | Johnsen Skoru | Toplam İNOS Skoru |
|-----------|--------|----------------------|---------------|-------------------|
| Vazektomi | Sağ    | 35.35 mik. +/- 0.92  | 7.74 +/- 0.49 | 4.00 +/- 0.33     |
| Vazektomi | Sol    | 34.86 mik. +/- 0.89  | 7.75 +/- 0.49 | 3.71 +/- 0.26     |
| Sham      | Sağ    | 37.35 mik. +/- 1.37  | 9.10 +/- 0.46 | 2.25 +/- 0.16     |
| Sham      | Sol    | 34.26 mik +/- 1.96   | 9.12 +/- 0.48 | 2.12 +/- 0.35     |

**Tablo 2: Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan ratlarda sol/sağ testis iNOS yoğunluk, boyanma oranları, toplam boyanma skorları ve MDA düzeyleri**

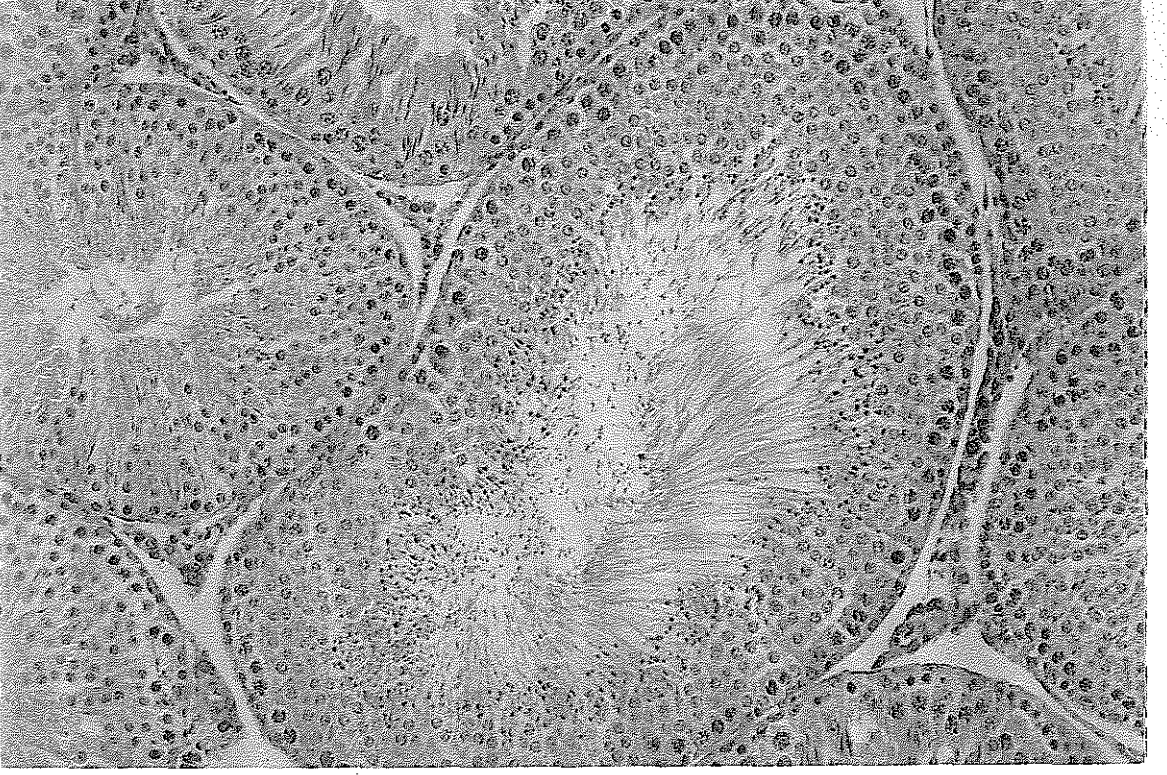
| Grup   | Sol testis |        |           |            | Sağ testis |        |           |            |
|--------|------------|--------|-----------|------------|------------|--------|-----------|------------|
|        | iNOS Yoğ.  | % Boy. | Top. skor | MDA düzeyi | iNOS Yoğ.  | % Boy. | Top. skor | MDA düzeyi |
| Vaz.1  | ++         | % 40   | 4         | 0,36       | +          | % 25   | 2         | 0,32       |
| Vaz.2  | ++         | % 35   | 4         | 0,41       | +++        | % 40   | 5         | 0,83       |
| Vaz.3  | +++        | % 45   | 5         | 0,47       | ++         | % 40   | 4         | 0,47       |
| Vaz.4  | ++         | % 40   | 4         | 0,36       | ++         | % 25   | 3         | 0,38       |
| Vaz.5  | +          | % 25   | 2         | 0,44       | +++        | % 35   | 5         | 0,41       |
| Vaz.6  | +          | % 35   | 3         | 0,48       | ++         | % 40   | 4         | 0,43       |
| Vaz.7  | ++         | % 20   | 3         | 0,35       | +++        | % 35   | 5         | 0,34       |
| Vaz.8  | +++        | % 40   | 5         | 0,27       | +          | % 15   | 2         | 0,29       |
| Vaz.9  | +          | % 35   | 3         | 0,27       | ++         | % 20   | 3         | 0,52       |
| Vaz.10 | ++         | % 50   | 5         | 0,41       | +          | % 35   | 3         | 0,37       |
| Vaz.11 | ++         | % 35   | 4         | 0,13       | ++         | % 40   | 4         | 0,27       |
| Vaz.12 | +          | % 20   | 2         | 0,39       | +++        | % 45   | 5         | 0,37       |
| Vaz.13 | ++         | % 40   | 4         | 0,14       | +++        | % 60   | 6         | 0,63       |
| Vaz.14 | ++         | % 35   | 4         | 0,51       | ++         | % 60   | 5         | 0,42       |
| Sham 1 | +          | % 25   | 2         | 0,07       | +          | % 15   | 2         | 0,38       |
| Sham 2 | ++         | % 30   | 3         | 0,17       | +          | % 20   | 2         | 0,05       |
| Sham 3 | +          | % 20   | 2         | 0,21       | ++         | % 25   | 3         | 0,22       |
| Sham 4 | -          | % 0    | 0         | 0,23       | +          | % 10   | 2         | 0,19       |
| Sham 5 | +          | % 15   | 2         | 0,11       | +          | % 20   | 2         | 0,22       |
| Sham 6 | +          | % 35   | 3         | 0,21       | +          | % 15   | 2         | 0,15       |
| Sham 7 | ++         | % 20   | 3         | 0,14       | ++         | % 20   | 3         | 0,16       |
| Sham 8 | +          | % 25   | 2         | 0,21       | +          | % 25   | 2         | 0,10       |



Resim 6: Normal testis dokusu



Resim 7 : Vazektomi- sol testiste artmış iNOS ekspresyonu



Resim 8 : Sham –sol testiste negatif iNOS boyanması

#### 4.2. Doku MDA düzeyleri yönünden vazektomi ve sham gruplarının karşılaştırılması:

MDA düzeyleri açısından vazektomi grubunda sağ ve sol testislerin karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı ( $p=0.346$ ). Benzer olarak sham grubunda sağ ve sol testislerdeki doku MDA düzeylerinin karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık olmadığı görüldü ( $p=0.916$ ). Tüm bunlara karşılık vazektomi ve sham grupları arasında sol ve sağ testiste doku MDA düzeylerinin karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık saptandı (Sol;  $p=0.02$ ), (sağ;  $p=0.01$ ). Tablo 2 ve 3’de her iki testis doku MDA düzeyleri ve ortalama değerleri gösterilmiştir

**Tablo 3 :Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan grupların sol/sağ testis doku ortalama MDA düzeyleri**

|           | Testis | Doku MDA Düzeyi           |
|-----------|--------|---------------------------|
| Vazektomi | Sağ    | 0.43 nmol/mgprdt +/- 0.03 |
| Vazektomi | Sol    | 0.35 nmol/mgprot +/- 0.03 |
| Sham      | Sağ    | 0.18 nmol/mgprot +/- 0.03 |
| Sham      | Sol    | 0.16 nmol/mgprot +/- 0.02 |

#### **4.3. Seminifer tubul çapları ve Johnsen skorlarının karşılaştırılması:**

Sham operasyonu uygulanan grubun sağ ve sol testis seminifer tubul çaplarının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ( $p=0.48$ ). Benzer şekilde, vazektomi uygulanan ratların seminifer tubul çapları yönünden sağ ve sol testislerinin karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ( $P=0.94$ ). Tüm bunların dışında, vazektomi ve sham operasyonu geçiren gruplar arasında sağ ve sol testis seminifer tubul çapları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (sağ,  $P=0.80$ ), (sol,  $P=0.74$ ).

Ek olarak Sham operasyonu uygulanan grupta sağ ve sol testis arasında Johnsen skorlarının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ( $P=0.45$ ). Benzer şekilde sol vazektomi uygulanan grupta sağ ve sol testis arasında Johnsen skorlarının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü ( $P=0.72$ ). Tüm bunlara karşılık, vazektomi ve sham grubunda Johnsen skorlarının karşılaştırılmasında hem sağ testisler arasında, hem de sol testisler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı (sağ  $P=0.01$ , sol  $P= 0.01$ ). Tablo 4 ve 1’de grupların

sağ/sol testis seminifer tubul çapları, Johnsen skorları ve ortalama değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 4 : Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan ratlarda sol/sağ testis tubul çapı ve Johnsen skorları**

| Grup   | Sol testis |               | Sağ testis |               |
|--------|------------|---------------|------------|---------------|
|        | Tubul çapı | Johnsen skoru | Tubul çapı | Johnsen skoru |
| Vaz1   | 35 mik.    | 8.3           | 40.7 mik   | 8.4           |
| Vaz2   | 35 mik.    | 7.7           | 37 mik     | 7.6           |
| Vaz 3  | 42 mik.    | 7.8           | 36.6 mik   | 7.7           |
| Vaz 4  | 33 mik.    | 7.5           | 35.3 mik   | 7.6           |
| Vaz 5  | 40 mik.    | 7             | 32.3 mik   | 7             |
| Vaz 6  | 37 mik.    | 7.4           | 35 mik     | 7.3           |
| Vaz 7  | 40 mik.    | 7             | 41.7 mik   | 7             |
| Vaz 8  | 34 mik.    | 8             | 32 mik     | 8             |
| Vaz 9  | 40 mik.    | 8.6           | 35 mik     | 8.5           |
| Vaz 10 | 36 mik.    | 8             | 35.7 mik   | 8             |
| Vaz 11 | 33 mik.    | 8.5           | 30.3 mik   | 8.5           |
| Vaz 12 | 31 mik.    | 7.5           | 38 mik     | 7.6           |
| Vaz 13 | 35 mik.    | 7.6           | 35.3 mik   | 7.5           |
| Vaz 14 | 32 mik.    | 7.6           | 30 mik     | 7.7           |
| Sham 1 | 25 mik.    | 9.6           | 40 mik     | 9.6           |
| Sham 2 | 37.5 mik.  | 9.5           | 37.5 mik   | 9.5           |
| Sham 3 | 38.5 mik.  | 9.4           | 35 mik     | 9.3           |
| Sham 4 | 42.5 mik.  | 8.5           | 37 mik     | 8.6           |
| Sham 5 | 27.5 mik.  | 9             | 45 mik     | 9             |
| Sham 6 | 32.5 mik.  | 9.6           | 38 mik     | 9.5           |
| Sham 7 | 35 mik.    | 9             | 35 mik     | 9             |
| Sham 8 | 40 mik.    | 8.4           | 32 mik     | 8.3           |

Vazektomi grubunda sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanan Johnsen skorlaması, bilateral iNOS ekspresyonları ve doku MDA düzeyleri arasındaki korelasyonun incelenmesinde; sol testiste doku MDA düzeyi ile iNOS ekspresyonu arasında anlamlı korelasyon saptanmadı ( $P=0.11$ ). Benzer şekilde sol testis Johnsen skorlaması ile iNOS ekspresyonu arasında hafif derecede korelasyon saptanmasına karşılık, bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $P=0.25$ ). Bununla birlikte sol testis Johnsen skorlaması ile doku MDA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon varlığı saptandı ( $P=0.01$ ). Buna karşılık sağ testiküler doku

MDA düzeyi ile iNOS ekspresyonu arasında ( $p=0.02$ ), Johnsen skoru ile iNOS ekspresyonu arasında ( $p=0.01$ ) ve Johnsen skoru ile doku MDA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon ( $p=0.02$ ) olduğu tespit edildi.

#### 4.4. Testis ağırlıklarının karşılaştırılması:

Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan gruplardaki ratların sağ ve sol testis ağırlıkları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmadı (vazektomi grubu;  $p=0.94$ ), (sham grubu;  $p=0.48$ ). Sham ve vazektomi uygulanan ratların sol testis ağırlıkları karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü ( $p=0.17$ ). Tablo 5 ve 6'da her iki grup testis ağırlıkları, ortalamalarının karşılaştırmaları gösterilmiştir.

**Tablo 5: Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan gruplarda sol/sağ testis ağırlıkları**

| Grup   | Sağ testis ağırlığı | Sol testis ağırlığı | Grup   | Sağ testis ağırlığı | Sol testis ağırlığı |
|--------|---------------------|---------------------|--------|---------------------|---------------------|
| Vaz.1  | 1,45 gr             | 1,45 gr             | Sham 1 | 1,60 gr             | 0,95 gr             |
| Vaz.2  | 1,30 gr             | 1,45 gr             | Sham 2 | 1,50 gr             | 1,50 gr             |
| Vaz.3  | 1,45 gr             | 1,45 gr             | Sham 3 | 1,40 gr             | 1,40 gr             |
| Vaz.4  | 1,40gr              | 1,45 gr             | Sham 4 | 1,15 gr             | 1,15 gr             |
| Vaz.5  | 1,20 gr             | 1,15 gr             | Sham 5 | 1,60 gr             | 1,55 gr             |
| Vaz.6  | 1,20 gr             | 1,25 gr             | Sham 6 | 1,45 gr             | 1,50 gr             |
| Vaz.7  | 1,05 gr             | 2,45 gr             | Sham 7 | 1,30 gr             | 1,30 gr             |
| Vaz.8  | 1,30gr              | 1,30 gr             | Sham 8 | 1,50 gr             | 1,50 gr             |
| Vaz.9  | 1,30 gr             | 1,35 gr             |        |                     |                     |
| Vaz.10 | 1,25 gr             | 1,25 gr             |        |                     |                     |
| Vaz.11 | 1,25 gr             | 0,40 gr             |        |                     |                     |
| Vaz.12 | 1,25 gr             | 0,35 gr             |        |                     |                     |
| Vaz.13 | 1,40 gr             | 0,45 gr             |        |                     |                     |
| Vaz.14 | 1,25 gr             | 1,10 gr             |        |                     |                     |

**Tablo 6 Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan gruplarda sol/sağ testis ağırlık ortalama değerleri**

| Grup      | Sağ testis ağırlığı | Sol testis ağırlığı | P    |
|-----------|---------------------|---------------------|------|
| Vazektomi | 1.23 +/- 0.02       | 1.20 +/- 0.01       | 0.94 |
| Sham      | 1.43 +/- 0.05       | 1.35 +/- 0.07       | 0.48 |

#### 4.5. Serum Total Testosteron, FSH ve LH Düzeyleri :

Vazektomi ve sham gurupları arasında serum total testosteron, FSH ve LH düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı saptandı. (p= 0.400). Tablo 7 ve 8’de vazektomi ve sham operasyonu uygulanan gruplarda serum testosteron, FSH ve LH değerleri ve bu iki grup arasında hormon değerleri yönünden yapılan istatistiksel karşılaştırma özetlenmiştir.

**Tablo 7 : Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan grupların kan FSH, LH ve testosteron seviyeleri ng/dl**

| Grup    | FSH  | LH   | Testosteron | Grup  | FSH  | LH   | Testosteron |
|---------|------|------|-------------|-------|------|------|-------------|
| Vaz.1   | <0.1 | <0.1 | 135         | Sham1 | <0.1 | <0.1 | <20         |
| Vaz. 2  | <0.1 | <0.1 | 87.5        | Sham2 | <0.1 | <0.1 | <20         |
| Vaz. 3  | <0.1 | <0.1 | <20         | Sham3 | <0.1 | <0.1 | <20         |
| Vaz. 4  | <0.1 | <0.1 | 91.2        | Sham4 | <0.1 | <0.1 | <20         |
| Vaz. 5  | <0.1 | <0.1 | <20         | Sham5 | <0.1 | <0.1 | 190         |
| Vaz. 6  | <0.1 | <0.1 | <20         | Sham6 | <0.1 | <0.1 | <20         |
| Vaz. 7  | <0.1 | <0.1 | <20         | Sham7 | <0.1 | <0.1 | 73          |
| Vaz. 8  | <0.1 | <0.1 | <20         | Sham8 | <0.1 | <0.1 | <20         |
| Vaz. 9  | <0.1 | <0.1 | <20         |       |      |      |             |
| Vaz. 10 | <0.1 | <0.1 | 191         |       |      |      |             |
| Vaz. 11 | <0.1 | <0.1 | <20         |       |      |      |             |
| Vaz. 12 | <0.1 | <0.1 | 25.1        |       |      |      |             |
| Vaz. 13 | <0.1 | <0.1 | 28.2        |       |      |      |             |
| Vaz. 14 | <0.1 | <0.1 | 190         |       |      |      |             |

**Tablo 8 : Vazektomi ve sham operasyonu uygulanan grupların kan testosteron düzeylerinin karşılaştırılması**

| Grup      | Testosteron düzeyi<br>< 20 ng/dl | Testosteron düzeyi<br>> 20 ng/dl | Toplam      |
|-----------|----------------------------------|----------------------------------|-------------|
| Vazektomi | 7<br>% 50                        | 7<br>% 50                        | 14<br>% 100 |
| Sham      | 6<br>% 75                        | 2<br>% 25                        | 8<br>% 100  |
| Toplam    | 13<br>% 59                       | 9<br>% 41                        | 22<br>% 100 |

**P = 0.400 ( anlamsız P>0.01)**

## 5. TARTIŞMA

Günümüzde vazektomi, erkek kontrasepsiyonunda altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (1, 2). Son yıllarda uygulanmaya başlayan bistürisiz vazektomi yöntemlerinin gelişmesi vazektomi tercihinin daha da artmasına neden olmuştur (3). A.B.D. yılda yaklaşık 500000 erkek kontrasepsiyon amacıyla vazektomi operasyonu geçirmektedir (3). Vazektomi modalitesinin, erkek kontrasepsiyonuna sağladığı önemli katkıya karşılık günümüzde vazektomi operasyonu geçiren erkeklerin %6'ya kadar ulaşan bölümü; eşlerin yeniden çocuk sahibi olmak istemeleri ve vazektomi sonrası ortaya çıkan kronik ağrı sendromu nedeniyle vazektomi reversal isteminde bulunmaktadır (6).

Çalışmamızın amacı: vazektomi sonrası testiste oluşan patolojilerde iNOS molekülünün potansiyel rolü ve iNOS ile SOR arasındaki olası korelasyonu araştırmak idi.

Erkek genital traktında SOR spermatazoa ve lökositler tarafından oluşturulmaktadır (67). SOR'un artması veya koruyucu antioksidant mekanizmaların azalması sperm fizyolojisinde bozulma ve erkek infertilitesi ile sonuçlanabilmektedir. SOR'un neden olduğu değişikliklerin tipi ve derecesi; SOR cinsi, miktarı, SOR ile karşılaşma süresi, ekstrasellüler faktörler, ısı, oksijen basıncı, çevre kompozisyonundaki protein ve iyon yoğunluğuyla ilişkilidir (79). SOR sperm fonksiyonları üzerine olan etkilerini; membran lipid peroksidasyonu, hücre içi ATP miktarında azalma ve DNA içeriğinde bozulmaya yol açarak göstermektedir (81, 82, 83, 84, 85). Birçok çalışmada infertil erkeklerin ejakülatında artmış SOR düzeyleri

gösterilmiştir. Bu durum daha önceden belirtildiği gibi spermatozoalarda artmış SOR üretimine bağlıdır (86).

NO birçok biyolojik cevabın regülasyonu ile ilgili moleküldür. Benzer şekilde, genitoüriner sistemde nonadrenerjik-nonkolinerjik nörotransmisyonunun düzenlenmesinde NO önemli rol oynamaktadır. NO başlıca; bölgesel kan akımı, düz kas fonksiyonları ve sekretuar cevaplarda düzenleyici moleküldür (13, 14, 15, 16, 57). iNOS transkripsiyonel olarak regüle olan ve özellikle hücresel strese yanıt olarak artan bir proteindir. Yine immün ve inflamatuvar yanıt gibi fizyopatolojik durumlarda iNOS doku ekspresyonunun belirgin olarak arttığı gösterilmiştir (13). Endotel hücreleri, damar düz kas hücreleri, endokard, nötrofil ve makrofajlarda NO varlığı gösterilmiştir. Buna karşılık NO'nun yoğun olarak bulunduğu hücreler makrofajlardır (56). Sentezlenen NO miktarı ve süresinin uzunluğu, bu molekülün fizyolojik yada patolojik olarak etki göstermesini belirler (56, 58). Patolojik olarak yüksek miktarlarda ve sürekli NO üretimi; hücre solunumu, enerji üretimi ve hücre çoğalmasıyla ilişkili demire bağlı enzimlerin inaktifleşmesine yol açar (63).

Aydos ve arkadaşları, vazal obstrüksiyon oluşturarak yaptıkları eksperimental çalışmada, testiküler dokuda bulunan normal yada anormal yapıdaki spermatozoaların; vazektomi işlemi sonrası fazla miktarda SOR'un üretimine neden olduğunu göstermişlerdir (94). Vazal obstrüksiyon sonrası artan SOR düzeylerinin; seminifer tubul çapında artma, germ hücre sayısında azalma, immün deposit birikimi, interstisiyel fibrozis, testiküler doku kapasitesinde azalma ve testis ultrastrüktürel yapısında değişikliklere sebep olduğunu gösterilmiştir (94, 95). Robert ve arkadaşları, vazektomi reversal geçirmiş hastalarda, operasyon sonrası testiküler doku makrofaj ve SOR

seviyelerinin normal fertil erkeklere göre daha yüksek olduğunu saptamış ve yüksek SOR düzeylerinin sperm parametrelerinde ve motilitesinde bozulmaya yol açtığını göstermişlerdir (97). İnoba ve arkadaşları, bilateral vazal obstrüksiyon oluşturarak yaptıkları eksperimental çalışmada vazektomi sonrası germ hücre DNA'sında fragmentasyon, epididim ağırlığında artma, epididimde granulom formasyonu oluşumu ve germ hücre sayısında azalma oluştuğunu elektron mikroskopisi kullanarak göstermişlerdir. Bu çalışmada ek olarak; vazektominin germ hücre ölümü ve apoptozisini indüklediği bildirmiştir (98). Buna karşılık Tait ve arkadaşları, tek taraflı (sol) vazektomi oluşturarak yaptıkları eksperimental çalışmada; vazektomi sonrası oluşan sperm granulom duvarında kronik inflamasyon, makrofaj ve monosit hücrelerinin varlığını göstermişlerdir. Bununla birlikte, vazektomi sonrası sperm granulomunda ve bölgesel lenf nodlarında yüksek immünolojik aktivitenin oluştuğu da saptamıştır (99). McDonald ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmalarda: vazektomi sonrası immün deposit birikmesine bağlı kardiovasküler hastalık riskinde artma, prostat kanseri riskinde minimal artış, epididimde sperm granulm oluşumu, antisperm antikörlere bağlı testiküler dokuda değişiklikler, seminifer tubul bazal membranında immün deposit birikimi, otoimmün orşit ve kronik intraskrotal ağrı oluşabileceğini bildirmişlerdir (32). Kubata ve arkadaşları tek taraflı vazal obstrüksiyon oluşturarak yaptıkları eksperimental çalışmada Westernblot ve immunhistokimyasal yöntemle, vazektomi uygulanan testiste kuvvetli iNOS ekspresyonu ve germ hücre apoptozisinin varlığını bildirmişlerdir. Aynı zamanda vazektomi uygulanan tarafta, NF kappa B p65 proteinin germ hücre nükleusunda sham operasyonu uygulanan ratlara nazaran daha kuvvetli eksprese olduğunu

saptamışlardır. Çalışmanın sonucunda; vazektominin spermatogeneze zarar verdiği, oluşan zararın germ hücre apoptozisi nedeniyle olabileceği belirtilmiştir. Bununla birlikte, iNOS ve NF kappa-B moleküllerinin de vazektomi sonrası germ hücre apoptozunda rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır (100). Kubota ve arkadaşları tarafından yapılan bu önemli çalışmanın belkide en önemli eksiği çalışmanın sadece özetinin İngilizce literatüre girmiş olması ve elde edilen sonuçların tartışılmıyor olmasıdır.

Çalışmamızda vazal obstrüksiyon uygulanan grupta bilateral testis doku SOR seviyelerinin sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Bu bulgu Aydos ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyushmaktadır. Bununla birlikte vazektomi grubunda sağ ve sol testis dokuları arasında iNOS ekspresyonu yönünden anlamlı bir farklılık saptanamazken, vazektomi grubunda sham grubuna göre iNOS ekspresyonu istatistiksel olarak yüksek saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Ek olarak bilateral testislerde Johnsen skorlaması vazektomi grubunda, sham grubuna göre istatistiksel olarak düşük saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Bu bulgular Kubata ve arkadaşlarının sonuçları ile benzerlik göstermekte ve sonuçlarımızı desteklemektedir. Vazektomi sonrası oluşan iNOS ekspresyonundaki yükseklik: vazektomi sonrası testis dokusunda oluşan histolojik değişiklikler, germ hücre apoptozu ve doku hasarı ile yakından ilişkili olabilir.

Çalışmamızda, vazektomi sonrası sol testiste oluşan histolojik ve immunokimyasal değişikliklerin vazektomi uygulanmayan sağ testiste de benzer şekilde ortaya çıkması vazektomi operasyonunun olası sistemik etkisi ile açıklanabilir. Aydo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada vazektomi sonrası testis dokusunda artmış IgG

antispermantikorlarının varlığını göstermişlerdir(94,95)Vazektomi sonrası testiküler doku ile birlikte sistemik dolaşımda da artan IgG anti-sperm antikoru karşı taraf inflamatuvar yanıtının oluşumuna neden olmuş olabilir. Bu teorik bilgiler ışığında, testis dokusu ve kan IgG düzeylerini araştıran çalışmaların karşı taraf testisinde oluşan patolojik değişikliklerin nedenini açıklamada önemli bilgiler vereceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda elde ettiğimiz ilginç sonuçlardan biri de: sol testiste artmış MDA ve İNOS düzeylerine karşılık iki parametre arasında istatistiksel açıdan anlamlı korelasyonun saptanmamasıdır. Önceden bahsedildiği gibi; çalışmamızda sağ testiküler doku artmış MDA ve İNOS düzeyleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı korelasyonun olduğu tespit edilmiştir. Teorik bilgiler göz önüne alındığında elde ettiğimiz bu sonuç bir çelişki olarak değerlendirilebilir. Buna karşılık çalışmamızda İNOS protein ekspresyonu sadece immünohistolojik yöntemle araştırılmış ve protein düzeyleri kalifiye edilmiştir. İleri basamak bir çalışmada, İNOS protein düzeylerinin Western Blot yöntemi ile kantitatif olarak belirlenmesi kuşkusuz hipotezimizin desteklenmesine olanak sağlayacaktır. Bununla birlikte İNOS mRNA düzeylerinin RT-PCR yöntemi ile belirlenmesinin de bu konudaki çalışma sonuçlarına büyük katkı sağlayacağı açıktır. Çalışmamızda elde edilen bu beklenmedik sonucun değerlendirilmesinde, protein ekspresyon yöntemi ile ilgili uyguladığımız subjektif yaklaşımın göz önüne alınması gerektiği kanısındayız.

Tüm bunların dışında, İNOS protein düzeylerinin artmasında rol oynayan patolojik yolun önemli basamak moleküllerinden olan NF-kappa B düzeyinin kantitatif olarak ölçülmesi ve testis germ hücre

apoptosis analizleri büyük önem taşımaktadır. Tüm elde edilen sonuçlar arasındaki olası bir korelasyonun varlığı konu ile ilgili bilgilerimizi daha arttıracaktır. Vazektomi geçiren testiste oluşan biyokimyasal değişikliklerde, iNOS rolünün araştırılmasında önemli parametrelerden biri de özellikle son yıllarda güncel olarak tartışılan Advanced Glycation End Product (AGE)'lerdir (14, 15). AGE moleküllerinin özellikle diyabet, kronik böbrek yetmezliği gibi sistemik hastalıklarda düzeylerinin arttığı ve bu hastalıklara bağlı gelişen komplikasyonlardan sorumlu olduğu bildirilmiştir. Genel olarak AGE molekülleri, kollagen gibi uzun ömürlü protein yapıları ile ketoz ve aldoz gibi indirgenmiş şeker molekülleri arasında reaksiyon sonrası üretilirler (14, 15). Buna karşılık bu moleküllerin oksidatif stres ve SOR düzeylerinin artışı ile yakından ilişkili olduğu da bildirilmiştir. Oksidatif stres sonucu artan AGE düzeylerinin NF-kappa B üzerinden iNOS sentezine neden olduğu gösterilmiştir (14, 15). Bu bilgilere ek olarak artmış AGE ve iNOS düzeylerine bağlı olarak gelişen patolojik etkilerin, Aminoguanidin gibi spesifik AGE ve iNOS blokörleri ile engellenebildiği de gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında, artmış iNOS düzeylerine bağlı olarak vazektomi modellerinde testis doku AGE düzeylerinin araştırılmasının, konu ile ilgili ek bilgileri ortaya koyacağını düşünmekteyiz. iNOS ile birlikte artmış AGE düzeylerinin varlığı ve spesifik blokörlerin testiste oluşan biyokimyasal değişikliklerdeki koruyucu yada tedavi edici etkisinin araştırılması hipotezimizin desteklenmesinde yardımcı bilgiler verebilecektir.

Çalışmamızda vazektomi grubu ile sham grubu arasında bilateral testis volümleri, seminifer tubul çapları, kan FSH, LH ve testosteron seviyeleri yönünden yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmamıştır ( $p>0.05$ ). Yine Aydos ve

arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da; vazektomi uygulanan ratların kan testosteron seviyesinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik olmadığı gösterilmiştir (94). Elde ettiğimiz bu bulgular da literatür bilgileri ile benzerlik göstermektedir.

## 6. SONUÇLAR

Ratlarda, tek taraflı sol vazektomi oluşturarak yaptığımız eksperimental çalışmanın sonucunda, vazektomi grubunda sağ ve sol testis dokularındaki iNOS ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılmasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı saptanmıştır. Buna karşılık vazektomi grubunda bilateral testis iNOS ekspresyonu, sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Benzer olarak, doku MDA düzeyleri açısından yapılan karşılaştırmada her iki grupta sağ ve sol testis dokuları arasında anlamlı bir farklılık saptanamazken, vazektomi grubunda, MDA düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık saptanamazken, vazektomi grubunda sham grubuna göre bilateral testis doku MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Bununla birlikte vazektomi grubunda sağ ve sol testisler arasında Johnsen skorları istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermediği halde, vazektomi grubunda sham grubuna göre bilateral testislerde Johnsen skorları istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde düşük tespit edilmiştir ( $P<0.05$ ).

Vazektomi sonrası seminifer tubullerde zedelenme, tubul çaplarında artma, hücre sıralanmasında bozulma, germ hücre sayısında azalma, apoptozis, bazal membran kalınlığında artma, bazal membranda immun deposit birikimi, intersitisiyel fibrozis ve testiküler doku kapasitesinde azalma olmaktadır. Oluşan bu değişikliklerden; tubul lümeninde basınç artışı, antisperm antikorları ve SOR sorumlu tutulmuştur. Çalışmamızda vazektomi sonrası doku MDA düzeyleri ve iNOS ekspresyonlarının anlamlı düzeyde yükseldiği saptanmıştır. Bu yükseklik, testiküler doku histolojisindeki değişikliklerin oluşmasında

ve germ hücre apoptozisinde rol oynayabilir. Daha da önemlisi spesifik iNOS blokörleri ve antioksidant ilaçlar ile bu patolojilerin engellenebileceği düşünülebilir.

## 7. ÖZET

Çalışmamızda, tek taraflı vazal obstrüksiyon oluşturulan ratlarda, vazektomi sonrası testiküler dokuda meydana gelen histolojik değişikliklerin SOR ve iNOS proteini ile olan ilişkisini ortaya koymayı amaçladık.

Bu amaçla 24 adet Wistar-albino adult erkek rat kullanıldı. 14 rata tek taraflı sol vazektomi, 8 rata ise sham operasyonu uygulandı. Ratlara operasyondan 1 ay sonra bilateral orşiektomi uygulandı ve serum FSH, LH ve testosteron seviyelerinin ölçümü için kan örnekleri alındı. Sonrasında, bilateral testis dokularında iNOS ekspresyonu ve doku MDA düzey tespiti ile seminifer tubul çapları ölçülerek Johnsen skorlaması yapıldı. Ek olarak, serum testosteron, FSH, LH değerleri ölçüldü.

Vazektomi grubunda sağ ve sol testis doku iNOS ekspresyonu ve doku MDA düzeyleri sham grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. Bununla birlikte, vazektomi grubunda bilateral testis Johnsen skorlarının sham grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı derecede düşük olduğu saptandı. Her iki grup arasında testis doku ağırlıkları, seminifer tubul çapları, serum FSH, LH ve testosteron seviyeleri açısından yapılan karşılaştırmada vazektomi grubuyla sham grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

Sonuç olarak; vazektomi sonrası testis doku histolojinde oluşan değişikliklerde, artmış SOR düzeyi ve iNOS aktivitesinin önemli bir rol oynayabileceği düşünüldü. Bu etkinin azaltılmasında antioksidantlar ve iNOS blokörlerin yarar sağlayabileceği düşünülmekle beraber bu konuda ayrıntılı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

## 8. KAYNAKLAR

- 1) Bumpass LL, Thomson E, Godecker AL. Women, men, and contraceptive sterilization. *Fertil Steril* 2000; 73: 937-46.
- 2) Shiraishi K, Takihara H, Naito K. Influence of interstitial fibrosis on spermatogenesis after vasectomy and vasovasostomy. *Contraception* 2002; 65: 245-49.
- 3) Jones JS, Percutaneous vasectomy: a simple modification eliminates the steep learning curve of no-scalpel vasectomy. *J. Urol.* 2003; 169: 1434-36.
- 4) Nazerali H, Thapa S, Hays M, Pathak LR, Pandey KR, Sokal DC. Vasectomy effectiveness in Nepal: a retrospective study. *Contraception* 2003; 67: 397-401.
- 5) Vasectomy-safe and simple. Population reports, series D, No:4. Baltimore Johns Hopkins University, Population Information Program. November-December 1983.
- 6) Goldstein M. Vasectomy reversal. *Comp. Ther.* 1993; 19: 37.
- 7) Nangia AK, Myles JL, Thomas AJ. Vasectomy reversal for the post-vasectomy pain syndrome: a clinical and histological evaluation. *J. Urol.* 2000; 164: 1939-42.
- 8) Deck AI, Berger RE. Should vasectomy reversal be performed in men with older female partners? *J. Urol.* 2000; 163: 105-6.
- 9) Belker AM, Thomas AJ, Fuchs EF, Konnak JW, Sharlip ID. Results of 469 microsurgical vasectomy reversals by the vasovasostomy study group. *J. Urol.* 1991; 145: 505-11.
- 10) Jarow JP, Budin RE, Dym M, Zirkin B, Noren S, Marshall FF. Quantitative pathologic changes in the human testis after

- vasectomy. A controlled study. N. Eng. J. Med. 1985; 31: 1252-56.
- 11) Matsuda T, Hiura Y, Muguruma K, Okuno H, Horii Y, Yoshida O. Quantitative analysis of testicular histology in patients with vas deferens obstruction caused by childhood inguinal herniorrhaphy: comparison to vasectomized men. J. Urol. 1995; 155: 564-7.
  - 12) Silber SJ, Rodriguez-Rigau LJ. Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery for obstruction. Fertil Steril 1981; 36: 480-5.
  - 13) Forstermann U. Nitric oxide synthase isozymes. characterization, purification, molecular cloning and functions. Hypertension 1994; 23: 1121-31.
  - 14) Usta MF, Tuncer M, Baykal A, Çiftçioğlu A, Erdoğan T, Köksal IT, Ersoy FF, Baykara M. Impact of chronic renal failure and peritoneal dialysis fluids on advanced glycation end product and iNOS levels in penile tissue: an experimental study. Urology. 2002; 59: 953-7.
  - 15) Köksal IT, Usta MF, Akkoyunlu G. et al. The potential role of advanced glycation end product and iNOS in chronic renal failure-related testicular dysfunction: an Experimental Study. Am. J. Nephrol. 2003; 23(5): 361-8.
  - 16) Usta MF, Bivalacqua TJ, Yang DY. et al. The protective effect of aminoguanidine on erectile function in streptozotocin-diabetic rats. J. Urol. (Baskıda 2003).

- 17) Anafarta K. Ürogenital organların anatomik ve histolojik yapısı. İçinde: Yaman S Göğüs O. (ed) Üroloji. 1. baskı. Güneş Kitapevi Ankara. 1995: S. 7-15.
- 18) Kenneth P, Robert and Jhohn L Pryor. Anatomy and Physiology of the Male Reproductive system. In: Wayne JG Hellsrom (eds) Male Infertility and Sexual Dysfunction. New Orleans 1998: pp 1-12
- 19) Sadler TW. Urogenital system Logman's Medical Embriology. In: Williams and Wilkins. Six edition. Baltimore 1990; PP. 260-296.
- 20) Tanago EA. Anatomy of the Genital Uriner Tract. In: Smith's General Urology. Tanago EA, Anich JW (eds). 14<sup>th</sup> Edition. Med. Pub. California 1995; P. 7-14.
- 21) Tanago EA. Anatomy of the Genito Üriner Tract. In: Campells Urology. Wals, S. 6<sup>th</sup> Vol 1. Sounder Campany. Philedelphia 1992; P.40-54.
- 22) Tranier YD. Histology of the normal testis. J. Surp Pathol. 1987; 11: 797.
- 23) Afzevil BA. In immotilite human spermatazoa. J. Cell Biol. 1975 ; 66: 225.
- 24) Fawcelt DW. The mammalian spermatazoon. Biol. 1975; 44: 394-8.
- 25) Tindal DJ. Structure and biochmistry at the Sertoli cell Int. Rew. Cytol. 1985; 94: 127.
- 26) Hotcher RA. (EDS) Kontraseptif yöntemler: Uluslararası Basım. In: Dervişoğlu AA (ed), Dervişoğlu Matbaacılık Ankara. 1990

- 27) T.C. Sağlık Bakanlığı Ana-Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü. Kontraseptif yöntemler ulusal aile planlaması hizmet rehberi. Cilt 2. Anadolu Matbaası 1995.
- 28) Wang C, Swerdloff RF. Male contraception. Best practice and research in clinical obstetrics and gynecology 2002; 16: 193-203.
- 29) Anowalt BD, Amaj JK. Advances in male hormonal contraception. Annals of Medicine. 2001; 23: 587-5.
- 30) Goldstein MD. Surgical management of male infertility, and other scrotal disorders in Campbell's Urology. 2002 volume: 2, PP. 1541-47
- 31) Goldstein MD, Sarah K, Giardi MD. Vasectomy and vasectomy reversal. Üroloji. 2003; 12: 7-16.
- 32) Stuart Mc Donald. Is Vasectomy harmful to health? Br. J. Urol. June 1997; 47:381-38.
- 33) Ajay K, Jonathan L, Myles on Antony J. Vasectomy reversal for the post vasectomy pain syndrome: A clinical and histological evaluation. J.Urol. 2000; Vol.164: 1939-1942.
- 34) Weidner W. E.A.U. Guidelines on male infertility. E. Urol. 2001; 32: 234-45.
- 35) Clarkson TB, Alexander NJ. Effect of vasectomy on diet-induced arteriosclerosis. In: Lepow IH, Craizer R. Vasectomy: immunologic and pathophysiologic effect in animal and man. New York Academic Press. 1979; PP. 223-9.
- 36) Yacop Raifer MD, Carol J, Bennet MD. Vasectomy. Urol. Clin. North America. 1988;16: 631-4.
- 37) Mullaney J. Granulomatous lesion associated with spermatozoal invasion of the interstitial tissue of the epididymis. Br. J. Urol. 1962; 34: 351-5.

- 38) Berg JW. On acid-fast lipid from spermatazoa. *AMA Arc. Pathol.* 1954; 57: 115-20.
- 39) Cadwell JC, Mc Godey J, Kerr R. et al. Cell retriutment to the sperm granuloma wich fallows vasectomy in the rat. *Clin. Anat.* 1996; 9: 302-8.
- 40) Ansbacher R, Hodger P, Williams A. Vas ligation: humoral sperm antibadies. *Int. J. Fertil* 1976; 21: 258-60.
- 41) Mc Donald SW, Holliday J. Cell mediated immune respone after vasectomy in rate. *J. Report Fertil* 1992; 96: 529-36.
- 42) Hooper P, Symith E, Richards RC. et al. Total number immunocomponent cells in the normal rats. *J. Report Fertil* 1995; 104: 193-8.
- 43) Hendry WF, Hughes L, Scommal G. et al. Compresion of prednisolone and placebo in subfertilite men with antibodies to spermatazoa. *Lancet* 1990; 335: 85-8
- 44) Jarow JP, Globof ET, Chang TSK. et al. Relationship between antisperm antibadies and testicular histolojic changes in human after vasectomy. *Urology* 1994; 43: 521-4.
- 45) Mc Dougall MK, Mc Cawin K, Derrick FK. et al. The effects of Vasectomy on spermatogenesis in the dog. *Canis familiaris: a meiotic analysis.* *Fertil Steril* 1972; 26: 786-90.
- 46) Mc Donald SW, Lecskhorf A, Germal D. et al. Changes in the testis folloving vasectomy in the rat. *Clin Anat.* 1996; 9: 296-302.
- 47) Aitken H, Reid O, Bennet NK. et al. Celluler infiltration of the guinea pig testis following vasectomy. *Clin. Anat.* 1996; 9: 194-6.
- 48) Richard LS, Davis JE, Lubell I. Current satus endocrinologic effects of vasectomy. *Urology* 1981; 18: 1-6.

- 49) Mc Donald, S.W. Vasectomy: Sequelae in the human epididymis and ductus deferens: a review. Clin Anat. 1996; 9: 337-42.
- 50) MC Mahon AJ, Buckley J, Taylor A, et al. 1992 Chronic testicular pain following vasectomy. Br. J. Urol. 1992; 69: 188-91
- 51) Moss WM. A Comparison of open-end versus closed-end vasectomies: a report of 6220 cases. Contraception 1982; 46: 521-5.
- 52) Rosenberg L, Polmer JR, Zouber AG. et al. The relation of vasectomy of the risk of cancer. Am. J. Epidemiol 1994; 140: 431-8
- 53) Jhon EM, Wittmore AS, Wu AH. et. al. Vasectomy and prostate cancer: result from a Multiethnic case-control study. J. Nat Cancer Inst. 1995; 87: 662-9
- 54) Murph MP. Nitric oxide and cell death. Biochim Bioph. Acta 1999; 1411: 401-14.
- 55) Grisham MB. Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine, Austin Texas: R.G. Landes 1992
- 56) Koshland DE. Nitric oxide: the molecule of the year. Science 1992; 258: 1861
- 57) Annger E. Role of nitric oxide mediator, murderer and medicine. Lancet 1994; 343: 1199
- 58) Yılmaz N, Solmaz S, Kaya M. Nitrik oksitin insan organizmasındaki önemi. Arşiv 2001 10: 178-82
- 59) Syader SH. Nitric oxide as a neuronal messenger. TIPS. 1991; Vol 12: 125-8
- 60) Brack G. Nitric oxide synthase: a new diagnostic tool for neurogenic impotence. Urology 1993; Vol 42: 413-7

- 61) Olesen J, Jonsen Olesen I, Nitric oxide mechanism in migraine  
Pathol Biol. 2000; 48: 468
- 62) Kılıç K, Kılıç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak  
oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi 2002 33 (2): 110-8
- 63) White KA, Marletta MA. Nitric oxide Synthase is a cytochrome P-  
450 type hemoprotein. Biochemistry 1992; 31 : 627
- 64) Glausman H, Petrischor G, Bartsch G. Molecular mechanism of  
the effects of sildenafil. Exp. Gerontol 1999; 34: 305
- 65) Uzbay T. Nitrik oksit: alkol bağımlılığında rolü varmı? nitrik  
oksit sentetaz inhibitörleri gelecekte alkol bağımlılığının  
tedavisinde kullanılabilmirmi? İlaç-Alkol Bağımlılığı. 1999; 56:  
109-13
- 66) Mancodor S, higgs A, Furchgott R. XVI. International union of  
pharmacology nomenclature in nitric oxide research.  
Pharmacological Reviews 1997; 49 (2): 137-42
- 67) Ochendorf FR, Infections in the male genital tract and reactive  
oxygen species. Human Reproduction Update 1999; 5: 399-420
- 68) Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science 1978; 201:  
875-8.
- 69) Fridovich I. Cytochrome C reduction. In Greenwald RA. (ed), CRC  
Handbook of Methods For Oxygen Radicals Research. CRC  
Press Boca Raton. 1985 pp 121-2
- 70) Halliwell B. And Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and  
Medicine. Clarendon Press Oxford. 1989
- 71) Fuchs J, Thiele J, Ochsendrof FR. Oxidants, antioxidants and  
oxidative injury. In Ochsendroff FR.and Fuchs J. (eds), Oxidative  
Stress in Male Infertility. in Ochsendrof Gardez, St. Augustin  
1997; pp 21-9

- 72) Klebanof SJ. Oxygen metabolites from phagocytes. In Gollin JL, Goldstein IM. And Synderman R.(eds), *Inflammation: Basic Principles and Clinical Corraletes*, Raven press, Nex York 1992 pp. 541-55.
- 73) Pacifici RE, Davies KJA. Protein degradation as an index of oxidative stress methods. *Enzymal* 1990; 186: 485-501.
- 74) William K, Frayne L, McLaughlin EA. and Hall L. Expression of extracellular superoxide dismutaz in the human male reproductive tract, detected using antisera raised agonist a recombinent protein *Mol. Hum. Repord* 1998; 4 : 235-42.
- 75) Buetner GR. The Pecking Order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys* 1993; 300: 535-43.
- 76) Ochsendorf FR, Thiele JJ. and Fuchs J. (1997) Antioxidant in germinal epithelium, spermatazoa and seminal Plasma. In Ochsendrof FR. And Fuchs J. (eds), *Oxidative Stress in Male Infertility* Gardez, St. Augustin 1997; pp 57-84.
- 77) Gomez EJ, İrvine DS. and Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and hydroxyalkenals in human spermatazoa: relationship with semen quality and sperm functions. *int. J. Androl.* 1998; 23: 81-94
- 78) Toptaş B, Talesemi kriter olarak hücre içi kalsiyum, karnitin, MDA düzeylerinin değerlendirilmesi ve bu kriterlerin eritrosit deformabilitesi ve karnitin tedavisi ile ilişkisi. *Uzmanlık tezi* Antalya-2002; 24-38

- 79) Griveau JF. And Le Lonnou D. Reactive oxygen species and human spermatazoa: physiology pathology. *Int. J. Androl.* 1997; 20: 61-9.
- 80) Storey ST. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatazoa. *Mol. Hum. Reprod.* 1997; 3: 203-213.
- 81) Aitken RJ, Krausz C. and Buckingham, D. relationships between iron-catalysed lipid peroxidation and human sperm function. *J. Reprod Fertil.* 1993; 98: 257-265.
- 82) Alvarez TJG, Taucstone JG, Blasco L. and Story BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatazoa. Superoxide dismutase major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl.* 1987; 8: 336-48.
- 83) Lamirande E. And Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatazoa: effects on the motility of intact spermatazoa and on sperm axonemes. *J. Androl* 1992, 13: 368-78
- 84) Aitken JR. the amoroso lecture. The human spermatozoon a cell in crisis. *J. Reprod. Fertil* 1999; 115: 1-7.
- 85) Aitken RJ. Harkiss D. Knox, W. Peterson et al. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatazoa characterized by a redox-regulated, cAMP mediated induction of tyrosine phosphorylation. *J. Cell Sci.* 1998; 111: 645-56.
- 86) Zolata AA, Christophe AB, Depuydt CE. et al. White blood cells cause oxidative damage to the fatty acid composition of phospholipids of human spermatazoa. *Int. J. Androl* 1998; 21: 154-62.

- 87) Parera DMD, Katz M., Hcenbando SR. et al. Nitric oxide synthase inhibitor NG-monomethyl-L-arginine preserves sperm motility after sviw-up. *Fertil. Steril* 1996; 66: 830-833.
- 88) Zinni A, Abitbol J, Girardi SK. et al. Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression folloving ischemia-reperfusion injury of testis. *Arch. Androl.* 1998; 41: 57-65.
- 89) Leclerc P, Lamirande E. and Gannon. Interaction between Ca cyclic 3',5' adenosine monophosphate, the superoxide anion and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capasitation. *J. Androl.* 1998; 19: 434-43.
- 90) Yeoman RR, Jones WD. And Rizk BM. Evidence for nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. *J. Androl.* 1998; 19: 58-64
- 91) Robak J. and Marcinkiewicz E. Scavenging of reactive oxygen species as the mechanism of drug action. *Pol. J. Pharmacol.* 1995; 4: 89-97.
- 92) Hsu PC, Liu MY. Hsu cc. et al. Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. *Toxicology* 1998; 128: 169-79.
- 93) Omu EA, al Otman S, Mahamod AS. et al. Antibiotic therapy for seminal infection. Effects on antioxidant activity an T-hepler Cytokines. *J. Reprod. Med.* 1998; 43: 857-64.
- 94) Aydos K, Küpeli B, Soygur T, Unsal A, Tolunay O, Kupeli S. Analysis of the relationship between histologic alterations and the generation of reactive oxygen species in vasectomized Testes *Urology* 1998 3: 510-5.

- 95) Aydos K, Soygür T, Küpeli B. Ünsal A, Tolunay Ö, Erdem E, Güven C, Küpeli S. Testicular effects of vasectomy in rat: ultrastructural and immunohistochemical study. *Urology* 1998 6: 1051-6.
- 96) Midgley AR. Radioimmunoassay: a method for human chorionic gonadotropin and human luteinizing hormone. *Endocrinology* 1996; 79: 10-4.
- 97) Robeth H, Shanpira Charles H Muller, Gregory CH et al. Vasectomy reversal associated within increased reactive oxygen species production by seminal fluid leucocytes and sperm. *J. Urol.* 1998 Vol. 160: 1341-6
- 98) 98-Yoko İnaba, Masato Fujisawa, Hirashi Okoda et al. The Apoptotic changes of testicular germ cells in the obstructive azospermia models of prepubertal and adult rats. *J. Urol.* 1998 Vol 160: 540-4
- 99) Tait CM, Jo McGinn, Wilne EW. et al. macrophages of the sperm granuloma 3 month after vasectomy in the albino swiss rat. *Clinical Anatomy* 2000; 13: 267-76.
- 100) Kubota J, Sasaki S, Kubota H. et al. A study mechanism of the spermatogenic damage after vasectomy in rat. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 2001; 92(1): 13-22
- 101) Jhonsen SG. Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970; 1: 2-25
- 102) Lewis-Johnes DI, Kerrigan DD. A modified Jhonsen's count for evaluation of spermatogenesis in the rat. *IRCS Med. Sci* 1985; 13: 510-1.