

Deneyel Vazektominin Farklı Dönemlerde Erişkin Sıçan Testisinde Oluşturduğu Değişikliklerin Histomorfometrik İncelemesi*

Histomorphometric Investigation of Changes in Adult Rat Testes at Different Periods after Experimental Vasectomy

Öz

Amaç: Bu çalışmada erişkin sıçanlarda vazektomi sonrası seminifer tübül epitelindeki yapısal değişiklikleri mikroskopik olarak incelemek ve nitel ve nicel olarak değerlendirmek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Toplam 48 adet 8 haftalık erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Çalışma deney grupları ve kontrol grupları içerdi (her grup için, n=8). Deney gruplarında tek taraflı vazektomi uygulanırken, kontrol gruplarında yalnızca abdominal kesi yapıldı. Deney ve kontrol gruplarındaki sıçanların sol testisleri vazektomiden 1, 12 ve 24 hafta sonra perfüzyonla alınarak Bouin fiksatifine kondu. Rutin histolojik takip işleminden sonra her gruptan ikiye testis Masson'un trikrom boyası ve orseinle boyanarak ışık mikroskopunda nitel olarak değerlendirildi. Altışar testis histomorfometrik inceleme için 1/8 oranında seri kesilerek PAS+hematoksilinle boyandı. Stereolojik inceleme için Cavalieri ve optik parçalama+optik disektör sondaları kullanıldı.

Bulgular: Kontrol gruplarına kıyasla 1 ve 12 haftalık vazektomi gruplarında ortalama spermatogonyum, Sertoli ve myoid hücre yoğunluğunun arttığı, spermatid sayısının ise azaldığı saptandı. Yirmi dört haftalık vazektomi grubunda ise seminifer tübül oluşuran hücrelerin azaldığı görüldü. Nitel değerlendirmede vazektomi sonrası süreye paralel olarak ara maddedeki kolajen lif miktarında artış ve 1 haftalık deney grubunda seminifer tübül lümeninde dev hücre oluşumu gözlemlendi.

Tartışma ve Sonuç: Vazektomi sonrasında 12. haftaya kadar seminifer tübül adlüminal ve bazal kompartmanlarında iki farklı mekanizmanın çalıştığı görülmüştür. İlk, bazal kompartmanda gerek parakrin gerekse hücrelerarası bağlantılara bağlı bir telafi mekanizması çalışmaktadır. İkincisi, epididimiste gelişen seminal granülomu seminifer tübül iç basıncını artırarak adlüminal kompartmanda spermatid-Sertoli hücresi ilişkisini bozup spermatidlerin olgunlaşmadan hızla dejenere olmasına neden olabilir.

Anahtar Sözcükler: histomorfometri; sıçan; testis; vazektomi

Abstract

Aim: In this study, we aimed to microscopically examine and qualitatively and quantitatively evaluate the structural changes in the seminiferous tubule epithelium in rats after vasectomy.

Materials and Methods: A total of 48 8-week-old male Wistar albino rats were used. Study and control groups were formed (n=8, for each group). While the study groups underwent unilateral vasectomy, the control groups underwent only abdominal incision. The left testes of all rats in the study and control groups were removed by perfusion 1, 12, and 24 weeks after vasectomy and immersed in Bouin's fixative. Following the routine histological procedures, 2 testes from each group were stained with Masson's trichrome stain and orcein for qualitative evaluation using light microscopy, and 6 testes from each group were sectioned (at a 1/8 ratio) and stained with PAS+hematoxylin. For stereological examination, the Cavalieri and optical disector methods were used.

Results: Compared to the control groups, the 1- and 12-week vasectomy groups were found to have a higher mean density of spermatogonia and Sertoli and myoid cells and a lower number of spermatids. It was observed that cells forming the seminiferous tubules were decreased in the 24-week vasectomy group. During the qualitative evaluation, we observed an increase in the amount of collagen fibers in the extracellular matrix, which was positively correlated with the time from vasectomy, and giant cell formation in the seminiferous tubule lumen in the 1-week vasectomy group.

Discussion and Conclusion: It was seen that two different mechanisms were effective in the seminiferous tubule adlüminal and basal compartments until the 12th week after vasectomy. First, a compensation mechanism is involved in the basal compartment, due to the paracrine and intercellular interactions. Second, the seminal granuloma development in the epididymis may increase the internal pressure of the seminiferous tubules, disrupting the relationship between spermatids and Sertoli cells and leading to the sloughing of spermatids in the adlüminal compartment.

Keywords: histomorphometry; rat; testis; vasectomy

Alev Cumbul¹, Varol Şahintürk², Ünal Uslu³

¹ Yeditepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

² Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

³ İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Geliş/Received : 29.12.2019

Kabul/Accepted: 05.01.2019

DOI: 10.21673/anadoluklin.666778

Yazışma yazarı/Corresponding author

Ünal Uslu

İstanbul Medeniyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Kuzey Kampüsü, Ünal Mah. Üsküdar, İstanbul, Türkiye
E-posta: unal.uslu@medeniyet.edu.tr

ORCID

Alev Cumbul: 0000-0002-9491-8220

Varol Şahintürk: 0000-0003-2317-3644

Ünal Uslu: 0000-0003-3953-7131

* Bu çalışma 17-20 Mayıs 2010'da Çeşme'de düzenlenen olan 10. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

İnsanda üreme işlevinin eksiksiz ve sorunsuz olarak gerçekleşmesi, erkek ve kadındaki anatomik, fizyolojik, hormonal ve immünolojik sistemlerin tam bir bütünlük ve uyum içinde çalışmasına bağlıdır. Ters bir durumda infertilite meydana gelmektedir. İnfertilite kadar önemli bir sorun da bütün dünyada yaşanan ve nüfus artışına sebep olan istenmeyen gebeliklerdir. Gerek anne gerekse çocuk sağlığı açısından, ailelerin bakabilecekleri kadar çocuk yapması hedeflenmektedir. Bunun aile ve ülke ekonomisine de önemli katkıları olabileceği düşünülmektedir. Gebelik doğal bir olay olsa da, gebelik kanaması, gebelik zehirlenmesi, doğum sonu kanama ve iltihaplanma gibi birçok zorluğu da bulunmaktadır. Bunlara karşı geliştirilen birçok gebelikten korunma yöntemi mevcuttur. En etkili, kalıcı ve ucuz olan yöntem vazektomidir (1,2).

Vazektomi, erkeklerde bütün dünyada giderek daha sık uygulanan, diğer yöntemlere göre daha etkili, güvenilir ve kalıcı olan bir kontrasepsiyon yöntemidir. Her yıl Çin'de yaklaşık 8 milyon, ABD'de ise 500 bin erkeğe bu işlem uygulanmaktadır. Türkiye'de ise bu sayı çok düşüktür. Erkeklerle uygulanan vazektomi, kadınlara uygulanan tüp ligasyonuna kıyasla daha nadirdir. Vazektomi tüp ligasyonundan daha ucuz, daha kolay ve daha az komplikasyonlu olsa da erkeklerin erkekliklerini kaybetme korkusu nedeniyle pek tercih edilmemektedir (3-5).

Bölgesel anestezi altında gerçekleştirilen vazektomide testislerde üretilen spermlerin üretraya kadar taşınmasını sağlayan vas deferens cerrahi yolla ayrılıp bağlanır. Erkeğin cinsel yaşamında bir değişiklik olmaz. Geriye dönüş operasyonları yapılsa da başarı şansı düşüktür. Dolayısıyla deneysel vazektomiler, testisteki yapısal değişikliklerin anlaşılması açısından önemlidir. Vazektomi istatistikleri yaş, etnik köken, sosyoekonomik konum, medeni hal ve eğitim düzeyine göre değişiklik gösterebilir. Vazektomi yaygın olarak Amerika, İngiltere ve Yeni Zelanda'da uygulanmaktadır (6). Diğer önemli bir nokta da vazektominin epididimit, kalp-damar hastalıkları ve prostat kanseri gibi komplikasyonlara yol açmasıdır (6-8).

Vazektomi, infertilite nedenlerinin ortaya konması ve infertilite tedavilerinin geliştirilebilmesi için uzun yıllardır araştırmalarda deneysel bir model olarak kullanılmaktadır (9). Son yıllarda stereolojik yöntemlerle sayısal verilere kavuşan histolojide, incelenecek mikroskobik yapılarla ilgili sadece görsel öğeler değil aynı zamanda sayısal veriler de değerlendirilmeye başlamıştır.

Vazektomi içerikli infertilite araştırmalarında daha çok testis seminifer epitelinde spermatogenetik hücrelere odaklanılmıştır. Bu bölgedeki Sertoli hücre ve spermatogenetik seri arasındaki ilişki sayısal olarak ortaya konmamıştır. Testis seminifer epitelini destekleyen miyoid hücreleri gözlemlenmemiştir.

Bu çalışmada, vazektominin testis morfolojisi üzerindeki etkilerini histomorfometrik yöntemlerle nesnel olarak ortaya koymak, elde edilen verilerle testisteki hücresel etkileşimlerin daha iyi anlaşılmasına ve erkek infertilitesinin teşhis ve tedavisine katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

GEREK VE YÖNTEMLER

Deney hayvanlarının bakımı ve deney grupları

Çalışma Helsinki Bildirgesi ilkelerine uygun olarak, hayvan hakları ve hayvan refahı gözetilerek gerçekleştirildi. Sekiz haftalık, 200-300 g ağırlığında, erişkin erkek Wistar albino sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar tabanı ve duvarları tek parça, kapağı ve yan duvarları tel örgülü, 50x30x30 cm ebadında kafeslerde barındırıldı. Ancak, hayvanlara vazektomi uygulandığından, cerrahi işlem sonrası bakımın en iyi şekilde yapılabilmesi için her kafese bir hayvan yerleştirildi. Hayvanların bulunduğu odanın sıcaklığı 20-22°C'ye, nem oranı %55-60'a ayarlandı. Oda düzenli olarak havalandırıldı ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde aydınlatıldı. Sıçanlar standart yem (MBD Yem, Kocaeli) ile beslendi. Hayvanların bakım, besleme ve cerrahi işlemleri gerçekleştirilirken ilgili kaynaklardan yararlanıldı.

Çalışmadaki deney grupları gözlem sürelerine göre (1 hafta, 12 hafta ve 24 hafta) düzenlendi. Her bir gözlem süresinde kontrol ve vazektomi deney grupları oluşturuldu. Çalışmamızda her bir gözlem

Tablo 1. Sol testis adlüminal kompartıman, bazal kompartıman ve seminifer tübül lümeni hacimlerinin tüm sol testis hacmine oranları (ortalama±standart sapma)

		Kontrol (n=6)	Vazektomi (n=6)	p
Adlüminal kompartıman hacim oranı	1. hafta	22,00±1,86	24,57±1,45	0,994
	12. hafta	31,90±7,00	17,80±7,60	0,000
	24. hafta	37,50±3,30	12,33±5,20	0,000
Bazal kompartıman hacim oranı	1. hafta	19,71±1,03	14,49±1,50	0,030
	12. hafta	20,80±2,90	14,40±0,20	0,005
	24. hafta	23,00±2,37	19,13±4,60	0,028
Seminifer tübül lümeni hacim oranı	1. hafta	21,30±3,50	15,00±1,56	0,998
	12. hafta	17,20±1,70	15,70±4,80	0,777
	24. hafta	17,00±2,30	25,40±6,30	0,004

Tablo 2. Sol testiste birim hacim başına düşen ortalama hücre sayılarının karşılaştırılması (ortalama±standart sapma)

		Kontrol (n=6)	Vazektomi (n=6)	p
Miyoid hücre (hücre/mm ³)	1. hafta	34,938±3,384	56,167±9,497	0,000
	12. hafta	29,361±2,797	52,260±8,383	0,000
	24. hafta	28,421±3,895	11,348±3,796	0,000
Spermatogonyum (hücre/mm ³)	1. hafta	107,994±9,839	147,617±10,410	0,000
	12. hafta	94,828±8,366	163,099±22,865	0,000
	24. hafta	90,318±11,520	15,777±15,444	0,000
Sertoli hücresi (hücre/mm ³)	1. hafta	56,631±5,678	78,624±5,607	0,001
	12. hafta	44,165±4,844	76,572±14,653	0,000
	24. hafta	42,965±6,148	13,320±9,491	0,000
Spermatid (hücre/mm ³)	1. hafta	659,158±117,695	220,008±57,885	0,000
	12. hafta	690,183±79,026	360,840±76,774	0,000
	24. hafta	646,164±92,882	58,777±69,372	0,000

süresi deney grubunda 8'er hayvan olmak üzere toplam 48 hayvan kullanıldı. Opere edilecek her sıçan intraperitoneal yolla 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun %2, Bayer Türk Kimya, İstanbul) ve 60 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketasol %10, Richter Pharma AG, Avusturya) verilerek anestezide edildi. Kontrol grubundaki hayvanlarda karın duvarına 2/0 katgüt (Medeks A.Ş., İstanbul), deriye 3/0

ipek (Medeks A.Ş., İstanbul) ile dikiş atıldı ve bölge povidon iyot ile temizlendikten sonra cerrahi işlem tamamlandı. Vazektomi grubundaki hayvanlar yatırıldı; penisin 1,5 cm üzerinden, 0,5 cm uzunluğunda transvers yapılan deri ve karın duvarı kesisi ile karın boşluğu açıldı. Karın boşluğunda kasık bölgesinde yağ dokusu pensle tutulup çekildi. Testis, vas deferens ve epididimis bu yağ dokusuyla beraber geldi. Vas deferensin altına pens yerleştirildi. Pensin uçları arasında kalan kanalın her iki başı 2/0 ipek (Medeks A.Ş., İstanbul) ile bağlandı. Bağlanan kısımlar, arasında kalan bölümden kesildi ve bir parça çıkarıldı (3). Organlar karın içine geri yerleştirildi ve karın duvarı ile deriye dikiş atıldı. Bölge povidon iyot ile temizlendikten sonra cerrahi işlem tamamlandı (3).

Histolojik inceleme

Deney gözlem süresini tamamlayan hayvanların testis dokuları perfüzyon-fiksasyon tekniğine göre alınmıştır. Testis dokuları Bouin fiksatifinde bekletilerek fiksasyona daldırma tekniği ile devam edildi. Sonrasında rutin histolojik doku takibi uygulanan dokular parafin bloklara gömüldü (10-12).

Histopatolojik inceleme

Parafin bloklarından daha önce pilot çalışma ile belirlenen 1/8 sistematik örnekleme ile 40 µm kalınlığında kesitler alınarak poli-L-lizin kaplı lamlara aktarıldı. Lamlara alınan kesitler PAS+hematoksilen ile boyandı.

İşık mikroskopik olarak 1, 12 ve 24 haftalık vazektomi ve kontrol grubu sıçan testislerinin genel mikroskopik görünümünü saptamak amacıyla stereoloji ölçümlerinin yapıldığı 40 µm'lik kalın kesitlerin yanında PAS+hematoksilen ve Masson'un trikrom boyası ile boyanan 5 µm'lik kesitler üzerinde de inceleme yapıldı.

Histomorfometrik değerlendirme

Pilot çalışma sonucu hücre sayımları için belirlenen adım aralıkları ve disektör yükseklikleri kullanılarak spermatid, spermatogonyum, Sertoli hücresi ve miyoid hücre sayımı yapılmıştır.

Kullanılan donanım: Boyanan kesitler, stereoloji çalışma düzeneği ile incelendi. Bu sistem, analizlerin ve

görüntülerin incelendiği CCD dijital kamera (Optonics Microfire 1600x1200P, Goleta, CA/ABD), görüntü kartı (ATI FireGL Advance Micro Device, Camberly, Birleşik Krallık), bilgisayar kontrollü motorize stage (Bioprecision, Howtrone, NY/ABD), mikrokatör (Heidenhein, Traunreut, Almanya) ve ışık mikroskobu (Leica DM 4000B, Wetzlar, Almanya) içermektedir. Ölçümler yukarıda belirtilen düzenekte *Stereo Investigator 7.0.5* (Microbrightfield, Williston, VT/ABD) programı kullanılarak yapıldı. Hücreler sayılırken Leica HC plan APO, x63 objektif (NA=0,60–1) ve x2379'lük büyültme kullanıldı.

Cavalieri yöntemi: Çalışmamızda her deneğin testis doku hacmi daha önce tanımlanan stereolojik çalışma istasyonu yardımıyla Cavalieri yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. Histolojik takip işlemi sonrasında elde edilen parafin kesitlerden oluşan ilgili yapıya noktalı alan ölçüm cetveli uygulanmıştır. Noktalı alan cetvelinin nokta aralıkları maksimum etkinlik dikkate alınarak saptanmıştır ve iki nokta arası mesafe 500 μm 'dir. Noktalı alan ölçüm cetveli ile değerlendirilen alan 250000 μm^2 'ye karşılık gelmektedir. Noktalı alan ölçüm cetveli ilgilenilen yapıya rastgele atılmış, interstisyum, adlüminal kompartıman, bazal kompartıman ve seminifer tübül lümeni dokulara denk gelen noktalar sayılmıştır. Stereolojik iş istasyonu aracılığı ile Cavalieri yöntemi kullanılarak adlüminal kompartıman, bazal kompartıman ve seminifer tübül lümen hacimleri elde edilmiştir (16,17).

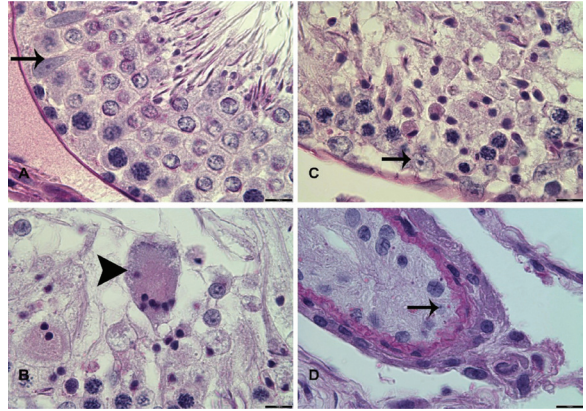
İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz SPSS (v. 15) programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tek yönlü varyans analizi ve *post hoc* test olarak Tukey testi kullanılarak gruplar arasında karşılaştırmalar yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

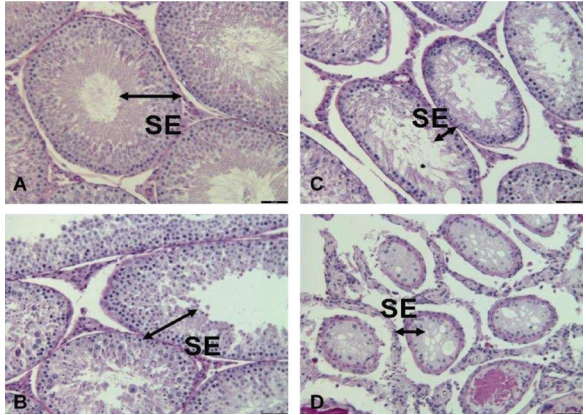
BULGULAR

Histopatolojik bulgular

Bir, 12 ve 24 haftalık kontrol gruplarına ait testis dokularında seminifer tübüller ve tübül epitelindeki spermatogonyum, Sertoli ve spermatid hücreleri, bazal laminaya komşu miyoid hücreler ile interstisyum



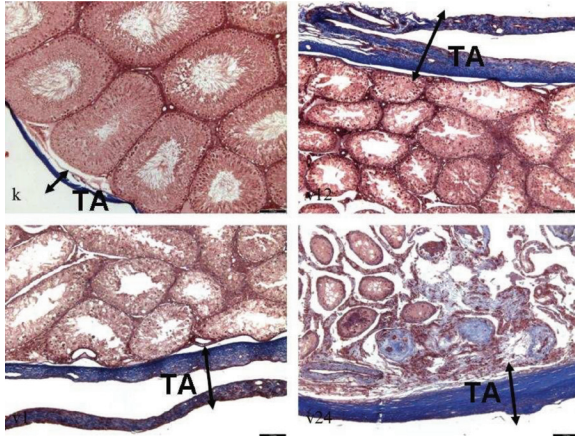
Görsel 1. Bir haftalık vazektomi grubuna ait testis kesitleri. (A) Seminifer epitelde düzensiz dizilmiş hücreler ve lümeninde dev hücreli cisim, bar=55 μm . (B) Dev hücreli cismin büyültülmüş görüntüsü, bar=11 μm . İki kesit de PAS+H ile boyanmıştır. (ok başı: dev hücreli cisim, oklar: Sertoli hücreleri)



Görsel 2. (A) Kontrol grubuna ve (B) 1 haftalık, (C) 12 haftalık ve (D) 24 haftalık vazektomi gruplarına ait testis kesitlerinin karşılaştırılması. Kontrol grubuna göre 1, 12 ve 24 haftalık deney gruplarında deney süresinin uzamasına bağlı olarak seminifer tübüllerin giderek küçülerek duvarlarındaki hücrelerin kaybolduğu, interstisyumun genişleyerek bağ doku ve hücre miktarının arttığı dikkat çekmektedir. Tüm kesitlerde bar=55 μm olup kesitler PAS+H yöntemi ile boyanmıştır. (SE: seminifer epitel)

ve bu alandaki Leydig hücrelerinin normal yapıda olduğu gözlemlendi. Spermatozoonların kuyrukları lümenine, baş kısımları ise Sertoli hücrelerinin tepesindeki oyuklara girmiş durumdaydı. Ayrıca seminifer tübülün bazal laminasına yakın yerleşen miyoid hücrelerin düzgün duruşları ve mekik tarzındaki çekirdekleri oldukça tipik görünümdeydi (Görsel 1).

Bir haftalık vazektomi grubunun testis dokularında seminifer tübül bazal membranlarının kalınlaştığı gözlemlendi. Seminifer tübüllerde düzensizlik ve spermatogenez hücrelerinde dejenerasyon olduğu saptandı. Spermatogonyumlar normale yakın gö-



Görsel 3. (A) Kontrol grubuna ve (B) 1 haftalık, (C) 12 haftalık ve (D) 24 haftalık vazektomi gruplarına ait testis kesitlerinin karşılaştırılması. Kontrol grubuna göre 1, 12 ve 24 haftalık deney gruplarında deney süresinin uzamasına bağlı olarak seminifer tübüllerin giderek küçüldüğü, interstisyumun genişlediği ve bağ doku içeriğinin arttığı ve tunika albugineanın giderek kalınlaştığı dikkat çekmektedir. Tüm kesitlerde bar=110 µm olup kesitler Masson'un trikrom boyası ile boyanmıştır. (TA: tunika albuginea)

zükseler de spermatosit ve spermatid hücrelerinde heterokromatik yapı baskındı. Bazal membranın ve miyoid hücrelerin normal yapıları bozulmuştu. Sertoli hücreleri ise hafif dejenerasyon göstermekteydi. Tübül yapısındaki spermatidlerin kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. İnterstisyumda ise tübüllerin nekroz ve atrofisine bağlı olarak genişleme saptandı. Seminifer tübül lümeninde dev hücreler görüldü. (Görsel 1).

On iki haftalık vazektomi grubunun testis dokuları incelendiğinde, 1 haftalık deney grubuna göre yapısı daha da bozulmuş seminifer tübüller ve interstisyel alanlar görüldü. Seminifer tübüllerin, spermatogenez hücre serilerini oluşturan duvarının 1 haftalık vazektomi grubuna göre incelendiği gözlemlendi. Spermatogonyum, Sertoli ve spermatosit hücreleri sayıca daha azalmıştı. Spermatidler ise daha fazla dejenere olmuştu ve bu hücrelere daha az rastlanıyordu.

Yirmi dört haftalık vazektomi grubunun testis dokuları incelendiğinde, diğer vazektomi gruplarına göre en belirgin değişiklik seminifer tübüllerin spermatogenez hücrelerini içeren duvarının çok daha incelmış olmasıydı. Spermatid hücrelerine neredeyse hiç rastlanmıyordu. Diğer bir belirgin değişiklik de bazal membranın oldukça kalınlaşmış olmasıydı (Görsel 2).

Bir, 12 ve 24 haftalık vazektomi grupları karşılaştırıldığında deney süresinin artmasına bağlı olarak seminifer tübül bazal membranlarının kalınlaşmış yapılarına rastlandı. Seminifer epitel çapının deney süresiyle birlikte incelendiği görüldü. Ayrıca tunika albugineanın kontrol grubundaki normal fibröz yapısının deney gruplarında kalınlaşması dikkat çekiciydi (Görsel 3).

Histomorfometrik bulgular

Sol testisin birim hacimdeki hacim oranları

Sol testislerden elde edilen interstisyum, adlüminal kompartıman, bazal kompartıman ve seminifer tübül lümeni hacimlerinin sol testis hacmine oranlanması sonucu elde edilen hacim oranları ve bu değerlerin istatistiksel karşılaştırmaları Tablo 1'de sunulmuştur.

Adlüminal ve bazal kompartıman hacimlerinin tüm testis hacmine oranlanmadan ve oranlanarak yapılan karşılaştırmaları birbiriyle uyumlu bulunmuştur.

Seminifer tübül lümeni hacminin tüm testis hacmine oranlanmadan yapılan gruplararası karşılaştırmalarında tüm haftalarda gruplar arasında önemli farklar saptanmasına karşın (hepsi için $p < 0,05$), tüm testis hacmine oranlanarak yapılan karşılaştırmada yalnızca 24. haftalık vazektomili grupta daha yüksek olduğu saptandı ($p = 0,004$).

Sol testisin birim hacim başına düşen hücre sayıları

Sol testislerden elde edilen hücre sayıları ve testis dokusundaki hacimler dikkate alınarak hesaplanan birim hacim başına düşen hücre sayıları ve gruplara göre istatistiksel karşılaştırma sonuçları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Toplam hücre sayısı ve birim testis hacmindeki (mm) hücre sayısı karşılaştırmalarında gruplar arasında dikkat çekici farklar olduğu görüldü. Birinci ve 12. haftalarda gruplar arasında toplam miyoid hücre sayısı, toplam spermatogonyum sayısı, ve toplam Sertoli hücresi sayısı bakımından anlamlı fark bulunamamışken (hepsi için $p > 0,05$), birim hacme göre yapılan karşılaştırmalarda artış yönünde anlamlı farklar saptandı (hepsi için $p = 0,000$).

Toplam spermatid hücre sayıları gruplar arasında karşılaştırıldığında tüm haftalarda gruplar arasında önemli farklar saptanmışken (hepsi için $p=0,000$), birim hacme göre yapılan karşılaştırmalarda da gruplar arasında toplam spermatid sayısına paralel olarak anlamlı farklar saptandı (hepsi için $p=0,000$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda toplam hücre sayılarının karşılaştırılmasının yanında testisin birim hacmindeki hücre yoğunlukları belirlenerek elde edilen sonuçlar tekrar karşılaştırılmıştır. Çünkü testis hacmindeki, zamana ve vazektomi uygulamasına bağlı değişikliklerin toplam hücre sayılarını etkileyebileceği düşünülmüştür. Nitekim benzer çalışmalarda hücre yoğunluğunun daha doğru sonuçlar verdiği üzerinde durulmaktadır (18).

Sertoli hücresi yoğunluğunun 1. ve 12. hafta sonunda önemli derecede artmasına karşın 24. haftada tam tersine kontrol grubuna göre oldukça azalması, bu hücrelerin spermatogenez ve testisteki ortamı korumaya çalışarak direndiklerini ve vazektominin etkilerini önlemeye çalıştıklarını göstermektedir. Ancak, zamanla Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların bozulduğu düşünülebilir. Bu durum Sertoli hücrelerinin dejenerasyona uğramasını açıklayabilir.

Spermatogonyum ve miyoid hücreler de genelde Sertoli ve Leydig hücrelerindeki benzer bir yoğunluk seyri izlemiştir. Bu durum ise telafi mekanizmalarının çalıştığı bir göstergesi olarak değerlendirilebilir.

Spermatidlerin yoğunluğu diğer hücrelerden farklı olarak deneydeki tüm zaman aralıklarında sürekli olarak azalmıştır. Bu durum, telafi mekanizmalarının olgunlaşmakta olan hücrelerden çok, köken hücre (spermatogonyum) ve destekleyici diğer hücrelerin (Leydig ve Sertoli hücreleri) üzerinde etki göstermeye çalıştığına işaret etmektedir (18).

Çalışmamızda kontrol gruplarına ait testis dokularının ışık mikroskobu ile incelemesinde herhangi bir histopatoloji saptanmadığından, aşağıda çalışmamızın deney gruplarını oluşturan vazektomi gruplarına ait histopatoloji bulgularımız üzerinde durulmuştur.

Vazektomi gruplarımızın tümünde görülen bazal membran kalınlaşması 24 haftalık grupta daha belirgindi. Dobson ve ark. kalınlığı artan bazal membranın ondülasyonlar yaptığını göstermiştir (19). Aydos ve ark. miyoid hücrelerin kolajen üretiminde önemli olduğunu ve bazal membrandaki kolajen artışından sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür (20). Çalışmamızda bazal membrana komşu miyoid hücrelerin çekirdeklerinin iğ şeklinden üçgenimsi hale dönüştüğünün gözlenmiş olması bu hücrelerin şekil değiştirdiğine işaret etmektedir (21).

Çalışmamızda spermatogenezin başlangıç hücresi olan spermatogonyumların seminifer tübülün kalınlaşan bazal membranından ayrıldığı gözlenmiştir. Bazal membrandan ayrılan bu hücreler interstisyumla olan ilişkinin kesilmesi sonucunda dejenerer olurlar ve sperm yapımı azalır (22).

Testis dokusunu çevreleyen fibröz kapsül olan tunika albugineanın kalınlaşması, West ve ark.'ın çalışmasında saptandığı gibi bizim çalışmamızda da gözlenmiştir (23). Tunika albuginea testis stromasının bir parçasıdır ve bu durum vazektominin etkisiyle azalan parankim dokusunun yerini stromanın alabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda seminifer tübül lümeninde görülen dev hücreler önceki çalışmalarda da görülmüştür (24). Seminifer epitelden lümeneye dökülen germ hücrelerinin çekirdekleri bir araya gelerek dev hücre cisimlere dönüşmektedir. Bizim çalışmamızda bu dev cisimler en çok 1. haftada ve en az da 24. haftada görülmüştür. Kong ve ark.'ın çalışmasında da benzer bulgulara rastlanmıştır (25).

Sertoli hücreleri, gelişmekte olan spermatogenez hücrelerinin bağışıklık yanıtına karşı kan-testis bariyeri ile korunmasında ve beslenmesinde oldukça önemlidir. Bu hücreler bazal laminadan lümeneye doğru yerleşerek yan ve tepe bölgelerindeki oyuklarda spermatogenez hücrelerini barındırırlar. Sertoli hücreleri, üzerine yerleştiği bazal membranın kolajen birikmesi sonucunda kalınlaşmasına bağlı olarak, birbirleriyle ve spermatogenez serisi hücreler ile aralarındaki bağların kesintiye uğramasıyla hasar görebilir (26,27). Bu hasar spermatogenez hücrelerinin gelişimini sekteye uğratmaktadır. Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında kaybolan orga-

neller ve meydana gelen vakuolleşmeye bağlı olarak, heterokromatin çekirdek periferine yayılır (28).

Çalışmamızda deneysel vazektomi sonrasında seminifer tübüldeki germ, miyoid ve Sertoli hücreleri arasındaki etkileşimler morfometrik verilerle ortaya konmuştur. Bu veriler sonucunda, akut dönemde oluşan seminifer tübül içi basınç artışı sonucu lümeneye en yakın hücre olan spermatidlerin dejenere olduğu ve döküldüğü görülmüştür. Vazektominin ikincil etkisi olan yangının testis interstisyumunu etkileyerek burada mononükleer hücre ve kolajen artışına sebep olduğu saptanmıştır. Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlarda telafi mekanizmasının 12. haftadan sonra iflas ettiği öne sürülebilir. Testis doku hücreleri arasındaki etkileşim mekanizmalarının hücresel ve moleküler düzeyde anlaşılabilmesi için kan-hormon düzeylerinin değerlendirilebileceğini, çalışmamızın immünohistokimyasal ve moleküler biyoloji yöntemleriyle bu mekanizmaları açıklayacak daha ileri çalışmalara yön verilebileceğini düşünmekteyiz.

Çıkar Çatışması ve Finansman Bildirimi

Yazarlar bildirecek bir çıkar çatışmaları olmadığını beyan eder. Yazarlar bu çalışma için hiçbir finansal destek almadıklarını da beyan eder.

KAYNAKLAR

- Amory JK. Male contraception. *Fertil Steril*. 2016;106(6):1303–9.
- Tulsiani DRP, Abou-Haila A. Importance of male fertility control in family planning. *Endocr Metab Immune*. 2014;14(2):134–44.
- Weiske WH. Vasectomy. *Andrologia*. 2001;33(3):125–34.
- Cook LA, Van Vliet HAAM, Lopez LM, Pun A, Gallo MF. Vasectomy occlusion techniques for male sterilization. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;3:CD003991.
- Makhlouf AA, Niederberger CS. Ensuring vasectomy success: what is the standard? *J Androl*. 2006;27(5):637–40.
- Jacobs EJ, Anderson RL, Stevens VL, Newton CC, Gansler T, Gapstur SM. Vasectomy and prostate cancer incidence and mortality in a large US cohort. *Int J Clin*. 2016;34(32):3880–5.
- Clarkson TB, Alexander NJ. Long-term vasectomy: effects on the occurrence and extent of atherosclerosis in rhesus monkeys. *J Clin Invest*. 1980;65(1):15–25.
- Bridges FS, Westerfield RC. Effects of vasectomy and exercise upon aortic extensibility, cholesterol deposition, and stainable tissue lipids. *Biol Reprod*. 1984;31(2):296–302.
- Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. The best infertility treatment for vasectomized men: assisted reproduction or vasectomy reversal? *Rev Hosp Clin*. 2004;59(5):312–5.
- Moss MB, Rosene DL. A perfusion-fixation procedure for the concurrent demonstration of Timm's, horseradish peroxidase (HRP), and acetylcholinesterase (AChE) histochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1984;32(10):1113–6.
- McFadden WC, Walsh H, Richter F, Soudant C, Bryce CH, Hof PR, ve ark. Perfusion fixation in brain banking: a systematic review. *Acta Neuropathol Commun*. 2019;7(1):146.
- Beach TG, Tago H, Nagai HT, Kimura H, McGeer PL, McGeer EG. Perfusion-fixation of the human brain for immunohistochemistry: comparison with immersion-fixation. *J Neurosci Methods*. 1987;19(3):183–92.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, ve ark. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96(10):857–81.
- Kohen MC, Tatlipinar S, Cumbul A, Uslu U. The effects of bevacizumab treatment in a rat model of retinal ischemia and perfusion injury. *Mol Vis*. 2018;24:239–50.
- Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*. 1987;147(3):229–63.
- Güleç A, Bakkalbaşı BÇ, Cumbul A, Uslu Ü, Alev B, Yarat A. Effects of local platelet-rich plasma injection on the rate of orthodontic tooth movement in a rat model: a histomorphometric study. *Am J Orthod Dentofac*. 2017;151(1):92–104.
- Yalcin-Ulker GM, Cumbul A, Duygu-Capar AG, Uslu U, Sencift K. Preventive effect of phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline against medication-related osteonecrosis of the jaw: an animal study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2017;75(11):2354–68.
- Yang ZW, Guo Y, Lin L, Wang XH, Tong JS, Zhang GY. Quantitative (stereological) study of incomplete spermatogenic suppression induced by testosterone undecanoate injection in rats. *Asian J Androl*. 2004;6(4):291–7.
- Dobson CC, Reid O, Bennett NK, McDonald SW. Effect of vasectomy on the seminiferous tubule boundary zone

- in the albino Swiss rat. *Clin Anat.* 2000;13(4):277–86.
20. Aydos K, Soygür T, Küpeli B, Unsal A, Tolunay O, Erdem E, ve ark. Testicular effects of vasectomy in rats: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Urology.* 1998;51(6):1051–6.
 21. Aitken H, Kumarakuru S, Reid O, Milne EW, Bennett NK, McDonald SW. Degenerated tubules in the guinea pig testis after long-term vasectomy or sham operation. *Clin Anat.* 2000;13(1):6–10.
 22. Peng B, Zhang RD, Dai XS, Deng XZ, Wan Y, Yang ZW. Quantitative (stereological) study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Reproduction.* 2002;124(6):847–56.
 23. West DA, Chehval MJ, Winkelmann T, Martin SA. Effect of vasovasostomy on contralateral testicular damage associated with unilateral vasectomy in mature and immature Lewis rats. *Fertil Steril.* 2000;73(2):238–41.
 24. Anton E. Arrested apoptosis without nuclear fragmentation produced by efferent duct ligation in round spermatids and multinucleated giant cells of rat testis. *Reproduction.* 2003;125(6):879–87.
 25. Kong LS, Huang AP, Deng XZ, Yang ZW. Quantitative (stereological) study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rabbits. *J Anat.* 2004;205(2):147–56.
 26. McDonald SW, Lockhart A, Gormal D, Bennett NK. Changes in the testes following vasectomy in the rat. *Clin Anat.* 1996;9(5):296–301.
 27. Ma L, Guo Y, Yuan Y, Li YG, Deng XZ, Yang ZW. Morphometric study of the testis and reproductive tract (including sperm granuloma) after vasectomy in mature rats. *Asian J Androl.* 2016;18(1):66–73.
 28. Lui WY, Mruk D, Lee WM, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. *Biol Reprod.* 2003;68(4):1087–97.