



Aksaray Üniversitesi

TIP BİLİMLERİ

DERGİSİ



Aksaray University Journal of Medical Sciences

Journal homepage: www.asujms.com

Aksaray, Türkiye

Araştırma Makalesi/Research Article

TÜP BEBEK MERKEZİNE BAŞVURAN AZOSPERMİK OLGULARDAN ALINAN SEMİNİFER TÜBÜL ÖRNEKLERİNİN ULTRASTRÜKTÜREL VE HİSTOPATOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

Ultrastructural and Histopathological Investigation of Seminiferous Tubules Obtained From Azoospermia Cases in The IVF Center

TUGBA BAL TAŞTAN¹, NURHAN ERKAYA^{2*}, ÖZLEM ÖZGÜL ABUÇ¹, DENİZ ÜNAL³

1-1. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Erzurum, Türkiye; 2. Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Aksaray, Türkiye; 3. Gazi Nova Fertil Tüp Bebek Merkezi, Gaziantep, Türkiye

Geliş Tarihi: 03.02.2020; Kabul Tarihi: 24.05.2020; Yayın Tarihi: 30.05.2020

ÖZET

Bu çalışmada; TESE yöntemi ile alınan testis biyopsi örneklerinde seminifer tübül örneklerinin histopatolojik ve elektron mikroskopik metotlarla incelenmesini ve hastaların serum FSH, LH ve Testosteron hormon seviyelerinin elde edilen bulgularla ilişkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada yer alan azospermik hastalar ilk önce sperm elde edilen ve edilmeyen olmak üzere iki gruba ayrıldı. Biyopsi örneklerinden gelen testis dokuları ışık ve elektron mikroskopik olarak doku takibi işlemlerine tabi tutuldu. Hastaların serum hormon düzeyleri belirlenerek, gruplar arası karşılaştırmaları istatistiksel olarak analiz edildi. Çalışma sonunda elde edilen tüm bulgular değerlendirildi.

Hem elektron mikroskopik hem de ışık mikroskopik açıdan değerlendirildiğinde gruplar karşılaştırıldığında, sperm elde edilmeyen grubun seminifer tübüllerinde daha dikkat çeken hasarlar tespit edildi. Sperm elde edilen grubun örneklerinde yer yer dejenerer tübüller ve inflamasyon izlense de spermatogenezisin devam ettiği tübüller ve sperm hücrelerinin varlığı görüldü. Sperm elde edilmeyen grupta ise interstisyel dokuda izlenen makrofajlar ve mast hücreleri, seminifer tübüllerin vakuolizasyonu, lipid inklüzyonlarının, Sertoli cell only sendromu olan tübüller ışık ve ultratrüktürel analizlerde, önemli bulgular arasındaydı. Serum FSH, LH ve Testosteron hormonları gruplar arası analiz edildiğinde; FSH ve LH hormonları arasındaki fark anlamlı iken, Testosteron hormonu istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Azospermi olan bireylerin seminifer tübül örneklerinde belirlenen histopatolojik sonuçlarda, FSH ve LH hormonlarının önemli belirteç olduğu fakat testosteronun herhangi bir etkisinin olmadığı bu çalışmada gösterilmiştir. Hormonların yüksek seviyelerde olması ile spermatogenezisin devam edemeyip, testiküler yetmezliğin oluşacağı sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Azospermi; histopatoloji; testis

ABSTRACT

In this study we purposed to explore seminiferous tubules via histopathological and electron microscopic methods in testicular biopsy samples obtained TESE and the relationship between the findings and levels of serum FSH, LH, testosterone hormones.

Azoospermia patients were divided into two groups, a positive testicular sperm extraction (TESE(+)) and a negative testicular sperm extraction (TESE(-)). Testicular tissue from biopsy samples were subjected to the light and electron microscopic tissue preparations. Serum hormone levels of patients were determined and analyzed statistically between the groups.

Compared the groups, more remarkable damages were detected in the seminiferous tubules of no sperm group in the light and electron microscopic examinations. Although inflammation and partly tubule degeneration was observed, spermatogenesis and sperm cells were determined in the tubules of sperm positive group. In the light and ultrastructural analysis of negative sperm group, macrophages and mast cells in the interstitial tissue, vacuolization of seminiferous tubules, lipid inclusions and Sertoli cell only syndrome were the significant findings. When analyzed serum FSH, LH and testosterone hormones between the groups, FSH and LH hormones were statistically significant while Testosterone hormone was not significant.

As a result in the seminiferous tubules of individuals histopathological results revealed that FSH and LH are important

indicator of testicular function but Testosterone has not any effect. It was concluded that high levels of these hormones impairspermatogenesis and cause testicular failure.

Key Words: Azoospermia; histopathology; testis

*Sorumlu Yazar: NURHAN ERKAYA İletişim Adresi: Aksaray Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı e-mail: nurhanakaras@aksaray.com.tr ORCID: 0000-0002-8457-9448

Giriş

Dünya çapında yaklaşık 186 milyon insanın infertilite problemi yaşadığı tahmin edilmektedir. Bu bireylerin % 50 sinde, infertilite sebebinin erkek faktöründen kaynaklandığı bildirilmiştir. Tüm bu bilgiler ele alındığında, infertilite sorunu, her sekiz çiftten birinde izlenirken, % 60 oranında erkek kaynaklı faktör ya tek başına ya da dolaylı olarak etki eder (1, 2).

Sperm hücresinin oluşmasına ve kalitesine etki eden herhangi bir dış müdahale, erkek bireylerin üreme sağlığı üzerine potansiyel olarak zarar verebilir. Varikosel, genital sistem obstrüksiyonu, inmemiş testis, sebebi bilinmeyen idiopatik infertilite, gonadotoksik etmenler, genetik, immünolojik, hormonal ve sistemik hastalıklar erkek infertilitesinin başlıca nedenleri arasındadır (3). Erkek bireylerde ortaya çıkan infertilite problemlerinin etiolojisinde ise; düşük sperm üretimi (oligospermi), yetersiz sperm motilitesi (astenospermi), anormal sperm morfolojisi (teratozoospermi), bunların bir kombinasyonu olan oligoastenoteratozoospermi ve semen sıvısında sperm hücresinin bulunmaması (azospermi) gibi sebepler sıralanmaktadır (4).

Azospermik semen örnekleri, yetişkin erkek nüfusunda en fazla % 2, infertil problemi olan erkek bireylerde ise % 10-20 oranında bulunmakta olup, bu bireylerin 2/3'ünde erkek infertilitesinin en şiddetli problemi olarak tanımlanan, spermatojenik yetersizlik bulunmaktadır. (5). Bu durum, tedavi edilemeyen testiküler bozukluk ile ilişkilidir. Sperm üretimindeki sorunlar ve kanallardaki tıkanıklıklar nedeniyle, ejakülatta hiç sperm olmasa da, sperm elde etme tekniklerinden testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE) ile azospermik bireylerin çocuk sahibi olabileme problemleri çözülebilmektedir (6,7).

Yapılan bazı çalışmalarda spermatogenez ve serum hormon (FSH, LH) düzeylerinin veya kombinasyonlarının TESE sonucu öngörümü yapılabileceği ortaya konmuştur. Ancak karşıt görüş olarak hiçbir parametrenin kesin öngörü sağlayamayacağını gösteren çalışmalar da bildirilmiştir.(8)

Yürütülen bu çalışmada, TESE yöntemi kullanılarak azospermik hastalardan alınan testis biyopsi örneklerinin, histopatolojik ve elektron mikroskopik düzeyde retrospektif olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular kapsamında, hastaların folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinizan hormon (LH) ve testosteron hormon seviyeleri ile sperm elde edilmesi veya edilememesi arasındaki ilişkinin açıklanması planlanmıştır.

Materiyal ve Yöntem

Hasta Grupları ve Örneklerin Toplanması

İlaç dışı etik kurul onayı (17.09.2015 tarihli-6/01 sayılı) alınan bu çalışmada, Tüp Bebek Merkezi'ne başvuran ve 18-50 yaş aralığındaki azospermi tanısı konulan hastalardan alınan TESE biyopsi örnekleri kullanıldı. TESE ile alınan bu tübül örnekleri embriyolog tarafından iki iğne yardımı ile disekte edildi. Diseksiyon işleminin ardından dokuların invert mikroskop altında incelenmesi gerçekleştirilerek, sperm varlığına bakıldı. İnceleme sonucunda hastalar sperm içeren ve içermeyenler olarak 2 gruba ayrıldı.

Biyopsi Materyalinin Geçirimli Elektron Mikroskopu Preparasyonu

Elektron Mikroskopik Takip

Testislerden alınan doku örnekleri, elektron mikroskopik takip için sırasıyla 0,2 M fosfat tamponlu (pH 7,2) % 3'lük glutraldehit fiksatifinde bekletildikten sonra 0.1 M fosfat tamponu ile 4x15 dakika yıkandı. Ardından 0,2 M fosfat tamponlu osmiyum tetroksit ile 1 saat post fiksasyon yapıldı ve 0.1 M fosfat tamponu ile 4x15 dakika yıkandı. Yükselen alkol serileri işlemlerinden geçirilerek dehidrate edildi. Alkol serilerinin ardından dokular propilen oksitten geçirildi. Ardından araldit karışımında bekletildi. Sonrasında, hazırlanan araldit kapsüllere döküldü ve elektron mikroskopu için bloklar elde edilmiş oldu.

Elektron Mikroskopik Boyama

Hazırlanan blok materyallerinden bir ultramikrotom (LKB NOVA, Bromma, Sweden) aracılığı ile yaklaşık 1µ kalınlığa sahip yarı ince kesitler elde edildi. Alınan kesitler lam üzerine alındı ve % 2'lik toludin mavi ile boyandı. Boyaması yapılan preparatlar Olympus BH 40 marka kamera ataçmanlı ışık mikroskopu altında incelenerek görüntüleri elde edildi.

Yarı ince kesitlerin olduğu preparatların incelenmesi ile yer tayini yapıldıktan sonra ultramikrotomla 60-70 nm kalınlığında ince kesitler elde edildi. Alınan bu ince kesitler cam havuzdan bakır gridler (S 162 -PELCO) üzerine taşındı. İnce kesitleri içeren gridlerin boyanması sürecinde belirli işlemlerden geçirildi. Öncelikle gridler 30 dakika süreyle % 2'lik uranil asetat ile boyandı. Distile su ile birkaç kez yıkandı. Kurutulan gridler 5-7 dakika süre ile kurşut sitrat ile kontrastlandı. Tekrar birkaç kez distile sudan geçirildi.

Gridlerin boyanma protokollerinin tamamlanmasının ardından örnekler transmisyon elektron mikroskopunda (100 SX Jeol, Tokyo, Japan) incelenmeye hazır hale getirildi ve görüntüleri.

Işık Mikroskopu Takibi ve Boyanması

Hastalardan alınan testis biyopsi örnekleri, isimlendirilerek içinde % 10'luk formaldehit olan numune kaplarına konuldu. Testis dokuları yıkandıktan sonra artan alkol serilerinde bekletildi. Alkol sonrası ksilenle muamele edildikten sonra parafinde bekletilip daha sonra dokular bloklandı. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT) ile 5 µm'lik seri kesitler alındı. Dokuların karakterlerinin belirlenebilmesi için seri kesitler hematoksilen ve eozin (H&E) ile boyandı. Gruplara ait kesitlerin fotoğrafları Olympus BH 40 marka kamera ataçmanı olan ışık mikroskopu altında incelenerek çekildi.

Hormon Ölçümleri

Araştırma için belirlenen hastaların hormon ölçümlerinde FSH, LH, testosteron değerlerine bakıldı. FSH için referans değerler 1.27 – 19.26 mIU/ml, LH için referans değerler 1.24 – 8.62 mIU/ml ve Testosteron için referans değerler 1.75 – 7.81 ng/ml olarak alındı.

Histopatolojik Skorum

Işık mikroskopu kullanılarak her bir örneğin histopatolojik değerlendirilmesi skorlandı. Her bir örnek için rastgele beş mikroskopik alan belirlendi ve 20X büyütmede; Yağlı dejenerasyon, Tübüler fokal skleroz, Germ hücre aplazisi, Leydig hücre hiperplazisi, Germ hücreleri arasında

interstisyel ödem, Maturasyon arresti, Mast hücre yoğunluğu, Makrofaj infiltrasyonu, İnflamatuar hücre artışı, Hiyalinizasyon, Kollajen lif artışı, Atrofik seminifer tübüller, Bazal membran kalınlaşması, Damarlarda konjesyon, Damar duvarında dejenerasyon, Hipertrofik hücrel değişiklikler ve Seminifer tübüllerde vakuolizasyon yoğunluğu skorlaması yapıldı.

Tablo 1. Histopatolojik verilerin gruplar arası skorlanması

BULGULAR	SPERM ELDE EDİLEN GRUP	SPERM ELDE EDİLEMİYEN GRUP
Yağlı dejenerasyon	1	2
Tübüler fokal skleroz	1	3
Germ hücre aplazisi	0	1
Leydig hücre hiperplazisi	1	2
Germ hücreleri arasında İnterstisyel ödem	2	1
Maturasyon arresti	1	3
Mast hücre yoğunluğu	0	1
Makrofaj infiltrasyonu	1	3
İnflamatuar hücre artışı	1	3
Hiyalinizasyon	1	2
Kollajen lif artışı	1	2
Atrofik seminifer tübüller	1	2
Bazal membran kalınlaşması	1	3
Damarlarda konjesyon	1	2
Damar duvarında dejenerasyon	1	3
Hipertrofik hücrel değişiklikler	2	2
Seminifer tübüllerde vakuolizasyon yoğunluğu	2	3

Testis biyopsi örneklerinin histopatolojik skorlaması; 0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli şeklinde ifade edildi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen FSH, LH ve testosteron hormon ölçümlerinin istatistiksel verilerinin analizi "SPSS for Windows 19.00" istatistik paket programı ile yapıldı. Hormon seviyelerinin, TESE işlemi ile sperm edilen ve sperm elde edilemeyen gruplar arası karşılaştırılmaları, bağımsız örnekleme Student T testi ile gerçekleştirildi. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi ($p < 0,05$). Değerler; aritmetik ortalama \pm ve standart sapma şeklinde ifade edildi.

Bulgular

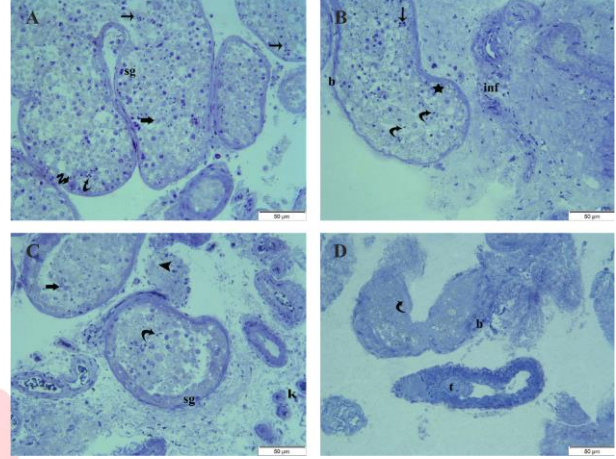
İşık Mikroskobu Bulguları

Sperm Elde Edilen Grubun İşık Mikroskobik Bulguları

Testiküler sperm ekstraksiyonu işlemi sonucunda, seminifer tübüllerin analiz edilmesi ile sperm elde edilen hastalardan alınan biyopsi örnekleri, işık mikroskobik olarak değerlendirildiğinde; bağ doku ve bazal membran sınırlarının, örneklerin büyük bir kısmında daha düzenli bir yapıya sahip olduğu fakat az bir kısmında bazal membranda kalınlaşma izlendi.

Seminifer tübüller incelendiğinde spermatogonyumlar ve spermatogenez aşamasındaki tüm germ hücreleri ile Sertoli hücrelerine rastlandı. Bazı tübüllerde seyrek de olsa kuyruk oluşumu mevcut olan sperm hücreleri izlendi. Bununla birlikte biyopsi örneklerinin bazılarında hipertrofik primer spermatosit hücrelerine, bazılarında ise bu hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarında büzülmelere rastlandı. Seminifer tübüllerdeki germ hücrelerinde yer yer vakuolizasyon ve sitoplazmik birikimler belirlendi. Yine bu örneklerdeki seminifer tübüllerin bir kısmının, atrofik ve

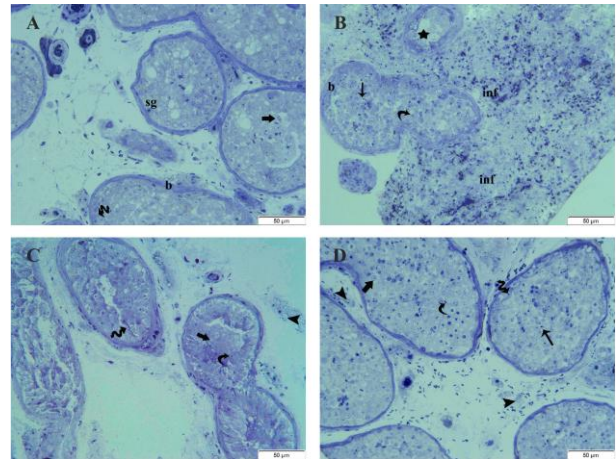
dejeneratif değişikliklere sahip olduğu belirlendi. Dejenere olan tübül alanları fibrotik doku ile yer değiştirmiş durumdaydı. Seminifer tübüllerde düzenli bir lümen yapısının olmaması ve bazı tübüllerde bazal membran ve germ hücreleri arasında ödem oluşumu da dikkat çekiciydi.



Resim 1. Sperm elde edilen gruba ait testis dokusu

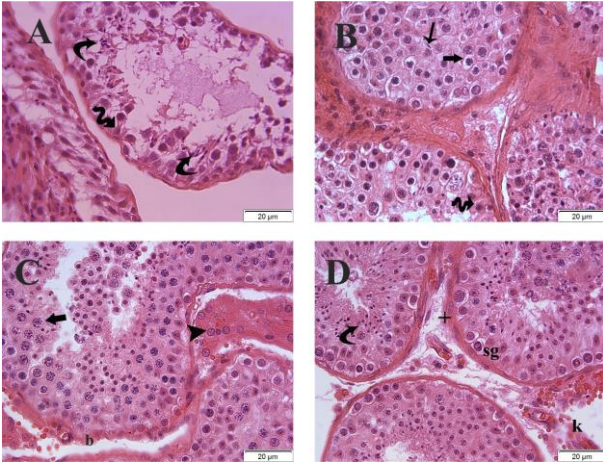
Bazal membran (b), spermatogonyum (sg), primer spermatosit (kalın ok), Sertoli hücresi (spiral ok), Spermatid (kavrık ok), sperm hücresi (ince ok), vakuolizasyon (asteriks), Leydig hücresi (ok başı), inflamasyon (inf), konjesyon (k), tunica intima kalınlaşması (t). Toluidine Blue, X20.

Sperm elde edilen örneklerde, tübüller arasındaki interstisyel bağ dokusu analiz edildiğinde damar yapılarının düzenli olduğu fakat inflamatuvar hücrelerin bağ dokuya geçiş yaptıkları görüldü. Kesitlerin bir kısmında Leydig hücrelerinin hiperplazisi, inflamatuvar hücrelerin özellikle de yaygın bir şekilde makrofajların infiltrasyonu izlendi. Sadece iki hastada eritrosit infiltrasyonu saptanan örneklerin kan damarlarında konjesyon izlenirken, makrofajların göçüne uyum sağlayan damar duvarlarında değişiklik mevcuttu. Örnekler içerisinde büyük bir kan damarının duvarında intima kalınlaşması izlenirken, arter endoteli hücrelerinde, duvarlarında bozulma ve düz kas hücrelerinde hipertrofi belirlendi. Diğer taraftan bazı örneklerde bağ dokusunda, kollajen liflerin artmış olduğu tespit edildi (Resim 1, 2 ve 3).



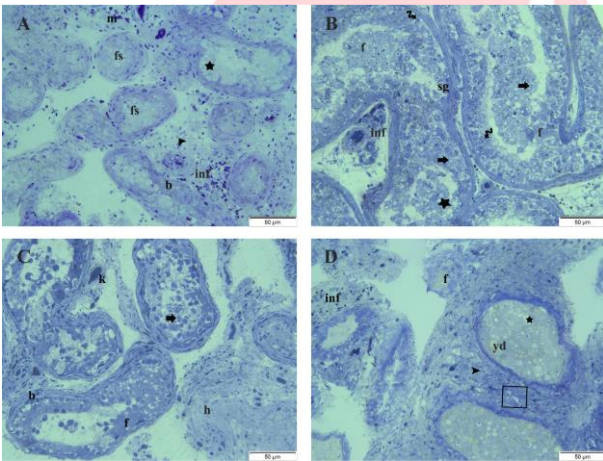
Resim 2. Sperm elde edilen gruba ait testis dokusu

Bazal membran (b), spermatogonyum (sg), primer spermatosit (kalın ok), Sertoli hücresi (spiral ok), Spermatid (kavrık ok), sperm hücresi (ince ok), vakuolizasyon (asteriks), Leydig hücresi (ok başı), inflamasyon (inf). Toluidine Blue, X20.



Resim 3. Sperm elde edilen grubun kesit görüntüleri Bazal membran (b), spermatozom (sg), primer spermatozot (kalın ok), Sertoli hücresi (spiral ok), Spermatozid (kıvrık ok), sperm hücresi (ince ok), Leydig hücresi (ok başı), miyoid hücresi (+), konjesyon (k). Hematoxilen-Eozin, X40.

Sperm Elde Edilemeyen Grubun Işık Mikroskopik Bulguları
TESE işleminde tübül örneklerinde sperm elde edilemeyen hasta gruplarından alınan biyopsi örneklerinin ışık mikroskobu altında histopatolojik olarak analiz edilmesi sonucu; kesit örneklerinin genelinde yoğun dejeneratif hasarlar mevcuttu. Seminifer tübüllerin bazal membranlarında Sperm elde edilen gruba göre kollajen liflerin artışına bağlı olarak aşırı kalınlaşmanın olması, bazı bazal membran sınırlarının düzensiz ve kaybolması, bazal membranda yerleşmiş olan hipertrofik miyoid hücrelerin varlığı belirgindi.

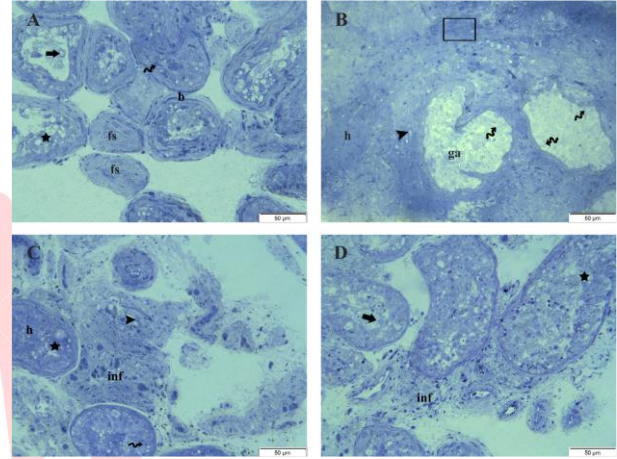


Resim 4. Sperm elde edilemeyen gruba ait testis dokusu Bazal membran (b), fokal skleroz tübüller (fs), yağlı dejenerasyon (yd), spermatozom (sg), primer spermatozot (kalın ok), Sertoli hücresi (spiral ok), vakuolizasyon (asteriks), Leydig hücresi (ok başı), hiyalinizasyon (h), inflamasyon (inf), konjesyon (k), kollajen artışı (□), fibrotik doku (f), mast hücresi (m). Toluidine Blue, X20.

Bununla beraber hastaların bazılarının bazal membranlarında çözümlerin olduğu, kollajen liflerin azalmış olduğu ve ara maddenin artmış olduğu da izlendi. Bu hastaların seminifer tübülleri incelendiğinde, tübüllerin içerisinde fibrinleşme olduğu ve fibrotik oluşumlar ile kollajen birikimleri ve tübül fokal skleroz varlığı tespit edildi. Çoğu seminifer tübülün atrofik olması ve sınırlarında

büzülme dikkat çekmekteydi. Bazal membrana yerleşmiş olan spermatogonyumların sınırlarında düzensizlik ve Sertoli hücrelerinde vakuolizasyon izlenirken, Sertoli hücrelerinin birbirleri ile olan bağlantıları kaybolmuş durumdaydı.

Sperm elde edilemeyen biyopsi örneklerinde bazı seminifer tübüllerde sadece primer spermatozot aşamasında olan germ hücreleri izlendi fakat bu örneklerin tübüllerinin hiç birinde spermatozid ve sperm hücrelerine rastlanmadığı ve maturasyon arresti olduğu belirgindi. Bazı örneklerde ise spermatozid aşamasında olan hücreler izlendi ancak sperm hücreleri izlenemedi.



Resim 5. Sperm elde edilemeyen gruba ait testis dokusu Bazal membran (b), fokal skleroz tübüller (fs), germ hücre apilazisi (ga), primer spermatozot (kalın ok), Sertoli hücresi (spiral ok), vakuolizasyon (asteriks), Leydig hücresi (ok başı), hiyalinizasyon (h), inflamasyon (inf), konjesyon (k), kollajen artışı (□), fibrotik doku (f). Toluidine Blue, X20.

Bu örneklerde spermiyogenez arresti tespit edildi. Bununla birlikte Germ hücre aplazisi saptanan tübüllerde, dik yerleşim gösteren sadece Sertoli hücrelerin bulunduğu ve germ hücrelerinin bulunmadığı izlendi. Çoğu tübüllerde germ hücrelerinde yoğun bir şekilde vakuolizasyon ve yağlı dejenerasyon görüldü. Ayrıca çoğu germ hücrelerinin piknotik çekirdekli ve hidrofik hücresel şişme ya da hipertrofik çekirdek ve sitoplazmik yapılarına sahip olduğu izlendi. Bu hasta örneklerinin bağ dokusu yapılarında da önemli hasarlar tespit edildi. Bağ dokuda ve özellikle de bazal membranlarda yer yer hiyalinizasyon oluşumu göze çarpmaktaydı. Oldukça fazla inflamatuvar hücrelerin olduğu, kollajen miktarının arttığı, interstisyel dokuda fibrotik bağ doku ve vakuolizasyonların bulunduğu, damar duvarlarında dejenerasyon, anormal görünümü ve sitoplazmik büzülmeye sahip olan Leydig hücreleri ile Leydig hücrelerinin hiperplazisi olan kesitler gözlemlendi. İri makrofajların varlığı da çoğu örnekte izlendi. Bir örnekte bağ dokusunda mast hücreleri dikkat çekmekteydi (Resim 4, 5 ve 6).

Yapılan ışık mikroskopik bulguların skorlaması Tablo 1'de özetlenmiştir.

Elektron Mikroskobu Bulguları

Sperm Elde Edilen Grubun Elektron Mikroskopik Bulguları

Seminifer tübüllerinde sperm elde edilen grubun biyopsi örneklerinin ultrastrüktürel yapıları değerlendirildiğinde; çoğu örnekte seminifer tübülü çevreleyen bazal membran sınırlarının düzenli, bununla birlikte bazı tübüllerde nadiren

bazal membran kalınlaşması ve kollajen liflerin artmış olduğu belirlendi.

Bazal membranda yerleşmiş olan miyoid hücrelerinin bazılarında hipertrofi izlendi. Seminifer tübülü oluşturan hücreler incelendiğinde ise, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların lateral yüzeyleri boyunca devamlılığı belirgindi. Bazı Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında vakuolizasyon ve elektron birikimler mevcuttu. Bazal kompartımanda yer alan spermatogonyum hücreleri ve bu hücrelerin bir seri hücre bölünmesi sonucu oluşan kromozomları belirgin primer spermatositler gözlemlendi. Fakat bazı spermatositlerde piknotik çekirdekler ile sitoplazmik büzülme belirlendi. Spermatogenezin aktif olarak izlendiği grupların elektron mikroskopik yapılarında, spermiyogenez aşamasında boyun ve kuyruk oluşumu gözlemlendi ve bu örneklerde hücrelerin etrafında dizilmiş olan düzenli mitokondriler belirgindi. Diğer taraftan, bazı oluşan sperm hücrelerinde ise baş, boyun ve kuyruk bölümlerinin ayrı olduğu ve mitokondrilerin baş kısmı ve kuyruk parçaları etrafında dağıldığı saptandı. Sperm hücresi elde edilmiş olan bu grubun tübüller arası interstisyel bağ dokusunda da sınırları düzenli Leydig hücreleri ve kollajen oluşumuyla ilgili olan fibroblastlar izlendi. Bazı örneklerde bağ dokuda az sayıda makrofajların varlığı ve sitoplazması büzülen dejenere leydig hücreleri de mevcuttu (Resim 7 ve Resim 8).

Sperm Elde Edilemeyen Grubun Elektron Mikroskopik Bulguları

Sperm hücresi elde edilemeyen gruba ait elektron mikroskopik görüntüler, sperm elde edilen grup örnekleri ile karşılaştırıldığında, bazal membran sınırlarında aşırı miktarda artmış düzensizlik dikkat çekti. Bu örneklerin bazal membranlarda yoğun bir şekilde fokal düzensiz kollajen birikimi ile paralel kalınlaşma geliştiği izlendi. Bazı örneklerin bazal membranlarında ise, kollajen miktarındaki azalma ve ödem oluşumu ile ilişkili çözünmelerin olduğu gözlemlendi. Bazal membran ile çevrilmiş olan tübüler duvarda genellikle Sertoli hücreleri izlendi. Sertoli hücrelerin sitoplazmalarında belirgin vakuoller ve lipid inklüzyonları vardı. İnterstisyel dokuda yoğun şekilde artmış bağ dokusu hücreleri ve hiyalinize alanlar gözlemlendi. Bunun yanı sıra bu grubun örneklerinde granül içeren iri makrofajlar ve mast hücreleri görüldü. Etrafında inflamatuvar hücrelerin bulunduğu damar duvarlarının çözüldüğü görüldü. Işık mikroskop bulguları ile tutarlı olan bu bulguda, damar duvarlarında kollajen miktarında azalma, ekstrasellüler madde miktarında artış ve düz kas hücreleri arasında ayrışma vardı. Bazı örneklerde ise, damar endotelinde hipertrofi, damar duvarında kollajen ve düz kas hücreleri miktarında artış ve aynı zamanda düz kas hücrelerinde de hipertrofi tespit edildi (Resim 9. ve Resim 10).

İstatistiksel Bulgular

TESE işlemi sonucu sperm elde edilen ve edilmeyen hastaların serum FSH, LH ve Testosteron hormon düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bu iki grubun TESE biyopsi sperm varlığı ile FSH ve LH hormon düzeyleri arasındaki anlamlılık $p < 0.05$ iken Testosteron hormon düzeyleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark ($p > 0.05$) yoktu. (Tablo 2).

İstatistiksel olarak değerlendirilen diğer veri, histopatolojik bulguların skorlarının (Tablo 1) analiz edilmesi idi. Bu veriler ele alındığında, skorlama yapılan bulgular değerlendirildiğinde, her iki grup arasında önemli farklılık bulundu ve p değeri 0.0001 olarak hesaplandı (Tablo 3).

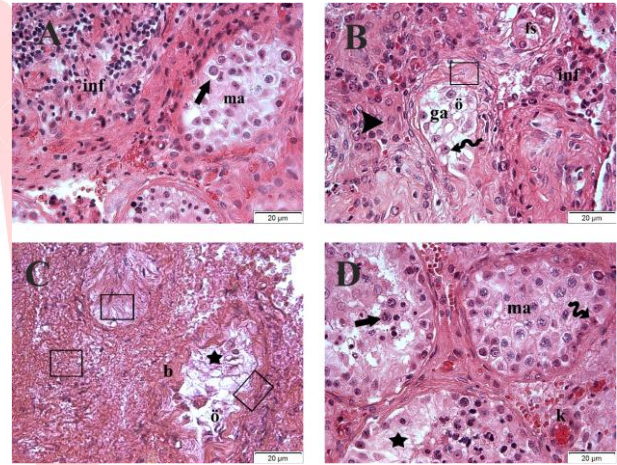
Tablo 2. Gruplar arası FSH, LH ve Testosteron hormon seviyelerinin İstatistiksel karşılaştırılması

Gruplar	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Testosteron(ng/ml)
Sperm (+)	11.58 ± 6.90	6.96 ± 5.24	3.20 ± 0.90
Sperm (-)	29.65 ± 16.14	10.00 ± 7.43	3.10 ± 1.21

Gruplar arası karşılaştırmalar bağımsız örnekleme Student T testi ile yapıldı. $p < 0,05$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Değerler; aritmetik ortalama \pm ve standart sapma şeklinde ifade edildi.

Tartışma ve Sonuç

Klinik ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen kanıtlar, erkek üreme problemlerinde artan bir insidansın olduğunu ileri sürmektedir. Erkek infertilitesinin sebepleri; spermatojenik hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasındaki yetersizlik, spermin üretilmesi sürecinde veya fonksiyonel anlamda anormal olması, spermin iletilmesinde oluşan bozukluklar, genetik ve çevresel faktörlerin yanı sıra genel sağlık ve yaşam tarzı olarak bilinmektedir (9,10).



Resim 6. Sperm elde edilemeyen grubun kesit görüntüleri
Bazal membran (b), primer spermatosit (kalın ok), Sertoli hücresi (spiral ok), vakuolizasyon (asteriks), Leydig hücresi (ok başı), fokal skleroz tübüller (fs), germ hücre aplazisi (ga), maturasyon arresti (ma), ödem (ö), inflamasyon (inf), konjesyon (k), kollajen artışı (□), fibrotik doku (f). Hematoksilen-Eozin, X40.

Son yıllarda infertiliteye sebep olan problemlerin anlaşılması için oldukça fazla çalışma gerçekleştirilmiştir. Spesifik üreme anormalliliği olan yaklaşık 500 mutant fare üretilmiş ve birçok insan ilişkili çalışma yapılmıştır. Erkek bireylerde meydana gelen infertilitenin başlıca nedenleri oligozospermi, astenozoospermi, teratozoospermi ve azospermi durumlarıdır. Azospermi, olguların yaklaşık % 20-30 unu oluşturmaktadır (10,11).

Tablo 3. Histopatolojik skorlamanın gruplar arası istatistiksel karşılaştırılması

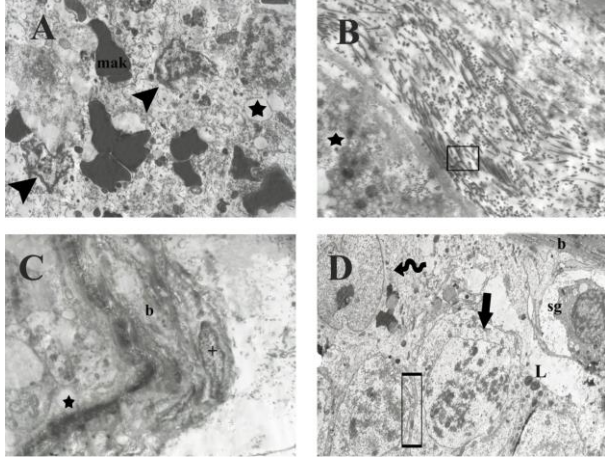
Gruplar	Histopatolojik skor	P anlamlılık değeri
Sperm elde edilen grup (N: 17)	1,059 ± 0,1348 ^a	< 0,0001
Sperm elde edilemeyen grup (N: 17)	2,235 ± 0,1825 ^b	< 0,0001

Gruplar arası karşılaştırmalar bağımsız örnekleme Student T testi ile yapıldı. $p < 0.0001$ olan değerler anlamlı olarak kabul edildi. Değerler; aritmetik ortalama \pm ve standart sapma şeklinde ifade edildi.

İnfertiliteye sebep olan durumlardan azospermi, semen analizlerinde sperm hücresinin olmamasıdır ve infertil olmayan erkeklerde % 1 oranında, infertil olan erkek

bireylerde ise % 15 oranında görülen en şiddetli durumdur (11,12).

Fakat bazı azospermik bireylerde, testis dokusunda aktif olarak devam eden spermatogenezin mevcut olduğu bilinmekte ve doğru tedavi yöntemleri ile sperm üretilmesi uyarılabilmektedir. Günümüzde azospermik olgulardan spermin elde edilmesinde kullanılan en etkin yöntem de TESE olarak bilinmektedir (8).



Resim 7. Sperm elde edilen grubun elektron mikroskopik görüntüleri
Bazal membran (b), spermatogonyum (sg), primer spermatosit (kalın ok), Sertoli hücresi (spiral ok), Leydig hücresi (ok başı), miyoid hücresi (+), makrofaj (mak), vakuolizasyon (asteriks), hücreler arası bağlantılar (□), lipid inklüzyonları (L), kollajen artışı (□). Büyütme: X2500

Ortaya koyduğumuz bu çalışma ile azospermik olgulardan TESE yöntemi ile alınan testis biyopsi örneklerindeki, seminifer tübül yapılarının histolojik ve ultrastrüktürel olarak araştırılmasının gerçekleştirilmesi yanında elde edilen histopatolojik sonuçlar ile hastaların serum FSH, LH ve Testosteron düzeyleri arasındaki ilişki de açıklanmaya çalışılmıştır.

Çalışmanın başlangıcında TESE işlemi yapılan azospermik bireylerden alınan seminifer tübül örneklerinin değerlendirilmesi sonucu hastalar, sperm elde edilen ve edilmeyen olmak üzere iki gruba ayrıldı. Yapılan histopatolojik ve elektron mikroskopik değerlendirmeler ile her iki grupta önemli dejenerasyonların varlığı izlenirken, özellikle sperm içermeyen grubun örneklerinde hem interstisyel doku hem de seminifer tübüllerde daha ciddi bozuklukların görülmesi, şiddetli dejenerasyonun testis dokusunun fonksiyonunu olumsuz yönde etkilediğini düşündürmektedir.

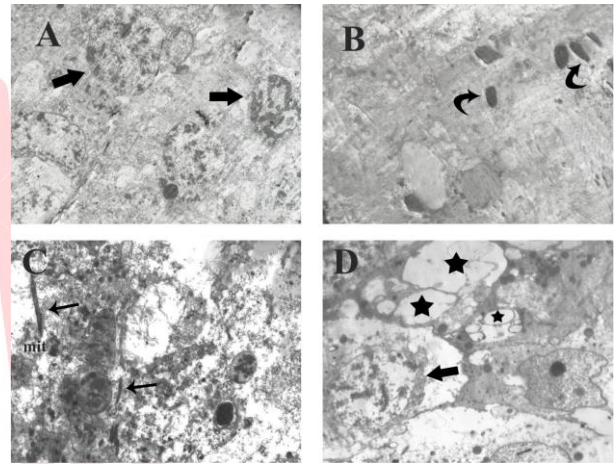
Histopatolojik açıdan gruplar karşılaştırıldığında, sperm elde edilen grubun genelinde bazal membran ve seminifer tübüllerin daha düzenli bir morfolojiye sahip olması, dejenerasyonun olmadığı tübüllerde tüm germ hücre serilerinin bulunması ve hatta bazı tübüllerde spermiyogenezisi tamamlamış olan spermilerin izlenmesi, TESE işlemi ile spermin elde edilmesi ile paralellik gösteren önemli bulgular arasındaydı.

Colgan ve ark. (13) azospermik olgular üzerine yaptıkları çalışmada, %20 normal testiküler histolojiye sahip olguyu rapor etmişlerdir ve bizim elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Aynı şekilde Abdullah ve Bondagji (14) infertil erkek bireylerden alınan testis biyopsi örneklerini, histolojik olarak incelemişler ve düşük de olsa normal spermatogenezin gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Normal spermatogenez sergileyen azospermiye sahip bireylerde, rete testisin ya da duktal sistemin bir kısmının obstrüksiyonunun olduğu düşünülmektedir (14,15).

Normal spermatogenezin yanında, bulgularımız arasında yer alan hipospermatogenez, tüm spermatojenik hücre serilerinin olması fakat normal spermatogenezin daha az sayıda bulunmalarıdır. Seminifer tübül epitelinin daha ince bir görünüme sahip olması hipospermatogenezin histolojik kanıtlarındandır. Bulgularımız arasında azospermik bireylerde, hipospermatogenezin saptanması da, yapılan literatür çalışmaları ile paralellik göstermektedir (14,16-19).



Resim 8. Sperm elde edilen grubun elektron mikroskopik görüntüleri
Primer spermatosit (kalın ok), spermatid (kıvrık ok), sperm hücresi (ince ok), vakuolizasyon (asteriks), mitokondri (mit). Büyütme: X2500

Sperm elde edilmeyen grubun ışık mikroskopik bulguları ele alındığında, tübüllerde ve bağ dokuda hiyalinize alanların mevcudiyeti, spermatogenez sürecindeki germ hücrelerinin izlenmemesi, bazı tübüllerde sadece Sertoli hücrelerinin varlığı (germ hücre aplazisi - Sertoli cell only sendromu), bazılarında da farklı derecelerde maturasyon arresti ve interstisyel dokuda Leydig hücrelerinin hiperplazisi yer almaktaydı. Ramasamy ve arkadaşları da (20), non-obstrüktif azospermi olan 435 erkek birey ile yaptıkları çalışmada, elde ettikleri histopatolojik bulgular arasında maturasyon arresti, Sertoli cell only sendromu ve Leydig hücre hiperplazisinin varlığını göstermişlerdir.

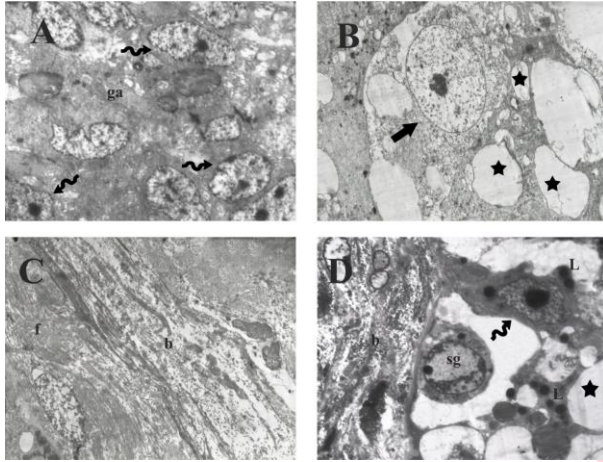
Bulgularımız arasında Sertoli cell only sendromu olan hastaların bağ dokusunun artması, atrofik görümlü seminifer tübüllerin olması ve Sertoli hücrelerinin değişik şekillerde bulunması da yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (20-24).

Aynı zamanda bu grubun örneklerinde makrofajların ve özellikle mast hücrelerinin izlenmesi de dikkat çeken bulgularımız arasında yer almaktaydı. Bu bulgu, elektron mikroskopik görüntülerimizle de desteklenmekteydi. Son yıllarda yapılan çalışmalarda erkek infertilitesinin artmış mast hücreleri ile ilişkili olduğu aydınlatılmıştır (25,26).

Welter ve ark. (27) germ hücre arresti ve ciddi spermatogenez bozukluğu bulunan hastalarda testiküler

makrofajların bulunduğunu göstermişlerdir. İnfertilitesi olan bireylerde yapılan çalışmalar, aktif mast hücrelerinin, fibroblast ve kollajen liflerinin sentezlenmesini uyardığını ortaya koymuştur. Bundan dolayı da mast hücrelerinin kronik olarak inflamasyon ve fibrotik oluşumlarda rol oynadığı bilinmekte ve bu çalışmamızda yer alan histopatolojik ve ultrastrüktürel analizlerle benzerlik göstermektedir (27-29).

Yapılan elektron mikroskopik analizlerde, sperm elde edilen ve edilmeyen hasta gruplarının ultrastrüktürel yapıları değerlendirilmiş ve bu iki grup arasında önemli değişiklikler gözlenmiştir. Sperm elde edilen grupta, germinal epitelin etrafındaki bazal membran genel olarak normal ve sürekliliğini korurken, sperm elde edilmeyen grupta bazal membran sınırlarında düzensizlik ve kalınlaşma mevcuttu. Bazal membranın kalınlaşmasını, Govender ve ark. (30) infertilitenin sebepleri arasında yer alan, inmemiş testis dokusu üzerinde yaptıkları ultrastrüktürel çalışmada göstermişlerdir. Bazal membranda yerleşmiş olan miyofibroblastların miyoid özelliklerini kaybederek fibroblastlara dönüştüklerini ve bu hücrelerin ekstraselüler matris bileşenlerinin sentezlenmesine katılarak, bazal membran kalınlığının artmasında rol oynadıkları düşünülmektedir. Başka açıdan bazal membrandaki bu kalınlaşmanın tübül involüsyon ve seminifer tübül çapında meydana gelen azalma ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (30-32).



Resim 9. Sperm elde edilemeyen grubun elektron mikroskopik görüntüleri

Bazal membran (b), Sertoli hücresi (spiral ok), germ hücre aplazisi (ga), primer spermatozoid (kalın ok), lipid inklüzyonları (L), fibrotik doku (f), vakuolizasyon (asteriks). Büyütme: X2500

Sertoli hücrelerinin, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanmasında ve spermatogenezin düzenlenmesinde oldukça önemli rol oynadıkları bilinmektedir (33).

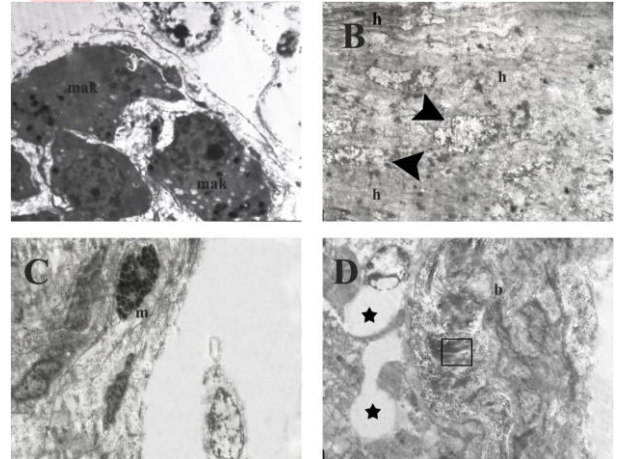
Çalışmamızda Sertoli hücrelerinin ultrastrüktürel yapıları, iki grupta da farklılıklar içermektedir. Sperm elde edilen grupta Sertoli hücreleri arasındaki bağlantıların daha belirgin olması ve sperm elde edilmeyen grubun Sertoli hücrelerindeki vakuolizasyon ile lipid inklüzyonlarının daha yoğun şekilde izlenmesi, insan Sertoli hücreleri ile ilgili yapılan ultrastrüktürel çalışmalarla paralellik sergilemektedir. Sertoli hücrelerinde artan vakuolizasyonun, apoptotik spermatojenik hücrelerin fagositoz edilmesinden dolayı artmış olabileceği düşünülmektedir (33-35). Işık mikroskopik bulgularımıza eşlik eden intratübül kollajen lif artışı ve bağ dokudaki

hiyalinizasyon alanlarının da ultrastrüktürel olarak belirlenmesi, literatürle benzerlik göstererek bulgularımıza desteklemektedir (36,37).

Çalışmamızda araştırılan, diğer parametre serum FSH, LH ve Testosteron düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak analiz edildi. Sperm elde edilen ve edilmeyen gruplarda, FSH ve LH hormon seviyeleri açısından, istatistiksel olarak anlamlılık bulunurken ($p < 0.05$), Testosteron hormonu her iki grupta da normal referans aralığında ölçülerek istatistik olarak $p > 0.05$ olarak belirlendi. Sperm elde edilen grubun ortalama FSH değeri; 11.58 ± 6.90 , LH değeri ise; 6.96 ± 5.24 iken, sperm elde edilmeyen grupta bu değerler sırasıyla; 29.65 ± 16.14 ve 10.00 ± 7.43 olarak hesaplandı (Tablo 2). Bu sonuçlar ele alındığında, FSH ve LH hormon düzeylerinin sperm elde edilen grupta normal referans değerleri arasında olması ve bu gruptaki örneklerde hem ışık hem de elektron mikroskopik düzeyde spermatogenezin aktif olarak devam ettiği tübüllerin izlenmesi ile paralellik gösteren bulgularımız arasındaydı. Bununla birlikte sperm elde edilmeyen grupta ise FSH ve LH hormon seviyelerinin normal değerlerin üzerinde olması dejenerasyon tübüllerin varlığı ile uyumluluk gösterdi.

İnfertilite problemi olan hastalarda, semen analizlerinde anormallik tespit edilmesi halinde, infertilitenin nedenini tanımlamak için hormon düzeylerinin ölçümü yapılmaktadır. Normal değerlerde olmayan hormon seviyelerinden dolayı, bozuk sperm üretiminin gerçekleştiği ve infertilitenin olduğu bilinmektedir (38).

FSH hormonu, ön hipofiz tarafından salgılan ve Sertoli hücreleri üzerinden etki ederek spermatogenez sürecinin başlatılmasında önemli olan gonadotropindir. FSH'nin, hipotalamus ve hipofiz bezi ile testis dokusu arasındaki feed back mekanizmasının bir sonucu olarak spermatogenezin ve Sertoli hücrelerinin fonksiyonel bir belirtici olduğu düşünülmektedir.



Resim 10. Sperm elde edilemeyen grubun elektron mikroskopik görüntüleri

Bazal membran (b), Leydig hücresi (ok başı), hiyalinizasyon (h), vakuolizasyon (asteriks), makrofaj (mak), kollajen artışı (□), mast hücresi (m). Büyütme: X2500

Epidemiyolojik çalışmalarda semen kalitesinin anlaşılması için serum seviyelerinin ölçülmesi gerektiği ve tahmini faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir (39,40).

Ayrıca FSH hormonunun pozitif bir şekilde LH hormonu ile korele olduğu ve bu iki hormonun da infertilitenin belirlenmesinde önemli oldukları bilinmektedir.

LH hormonu da hipofiz bezinin anterior lobundan sentezlenen ve Leydig hücrelerine etki ederek, intratestiküler testosteron hormonunun salgılanmasında rol oynamaktadır (38,39).

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda artmış serum FSH ve LH düzeyleri, testiküler yetmezlik ile atrofik ve dejenere tübüllere sahip azospermik bireylerde ayrıca Sertoli cell only sendromunun izlendiği vakalarda gösterilmiştir (24,41,42).

Goluz ve ark.24 Testosteron seviyesinin, kontrol grubu ile azospermiye sahip bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ve olgularının büyük çoğunluğunun normal testosteron, fakat yüksek LH ve FSH seviyesinde olduklarını göstermişlerdir. Bu durumu, örneklerindeki artan makrofajların parakrin faktörleri ve gonadotropinlerin birlikte Leydig hücrelerinde hasara ve hiperstimulasyona neden olması ile açıklamışlardır. Çalışmamızda da sperm elde edilmeyen grupta belirlenen yüksek FSH, LH ve normal Testosteron seviyeleri ile spermatogenezisin önemli ölçüde olumsuz etkilendiği kanaatine varılmıştır.

Yapılan bu araştırmada, sperm elde edilen grubun normal spermatogenezis sürecinde olan tübüllerinin tespiti ile hormon seviyelerinin normal referans aralığında bulunması arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlendi. Bununla birlikte sperm elde edilmeyen grupta, tespit edilen patolojik anormallikler ile FSH ve LH hormonlarının yüksek olması da testiküler bozukluklarda hormon düzeylerinin önemli belirteçler olduğu kanısına varıldı.

Kaynaklar

1. Povlsen BB, Aw LD, Laursen RJ, et al. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection with normal testicular spermatozoa in a patient with azoospermia and tail stump epididymal sperm. *International braz j urol* 2015; 41:1220-1225.
2. McLachlan RI, O'Bryan MK. State of the Art for Genetic Testing of Infertile Men. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1013-1024.
3. Esteves SC, Miyaoka R, Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics* 2011;66: 1807-5932.
4. Ziarati N, Topraggaleh TR, Rahimizadeh P, et al. Micro-quantity straw as a carrier for cryopreservation of oligozoospermic semen samples: Effects of storage times and cryoprotectant. *Cryobiology* 2019; 86:65-70.
5. Aziz N, The importance of semen analysis in the context of azoospermia. *Clinics* 2013;68:35-8.
6. Esteves SC. Clinical management of infertile men with nonobstructive azoospermia. *Asian J Androl* 2015; 17:459-470.
7. Tsai Y-R, Huang F-J, Lin P-Y, et al. Clinical outcomes and development of children born to couples with obstructive and nonobstructive azoospermia undergoing testicular sperm extraction-intracytoplasmic sperm injection: A comparative study. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 2015; 54:155-159.
8. Güneri Ç, Alkibay T, Tunç L. Effects of clinical, laboratory and pathological features on successful sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Turk J Urol* 2016; 42(3): 168-77.
9. O'Flynn O, Brien KL1, Varghese AC, Agarwal A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil Steril* 2010;93:1-12.
10. Singh SR, Burnicka-Turek O, Chauhan C, Hou SX. Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer. *J Cell Mol Med*. 2011;15(3):468-83.
11. Moein MR, Moein MR, Ghasemzadeh J, et al. Evaluation of sperm retrieval rate with bilateral testicular sperm extraction in infertile patients with azoospermia. *Iran J Reprod Med* 2015; 13:711-714.
12. Esteves SC, Miyaoka R, Roque M, et al. Outcome of varicocele repair in men with nonobstructive azoospermia: systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl* 2016; 18: 246-253.
13. Colgan TJ, Bedard YC, Strawbridge HTG, et al. Reappraisal of the Value of Testicular Biopsy in the Investigation of Infertility. *Fertility and Sterility* 1980; 33: 56-60.
14. Abdullah L, Bondagji N. Histopathological patterns of testicular biopsy in male infertility: A retrospective study from a tertiary care center in the western part of Saudi Arabia. *Urol Ann* 2011; 3:19-23.
15. Nistal M1, Paniagua R. Testicular biopsy: Contemporary Interpretation. *Urol Clin North Am*. 1999;26(3):555-93.
16. Jamal AA, Mansoor I. Morphological profile of testicular biopsies associated with infertility. *Saudi Med J*. 2001 Nov;22(11):992-4.
17. Haddad FH, Omari AA, Malkawi OM, Ajour WK, Izat A, Khasrof H, Khawaldeh AK. Patterns of Testicular Cytology in Men with Primary Infertility *Acta Cytol*. 2004;48(6):807-12.
18. Abdel Raheem A, Garaffa G, Rushwan N, De Luca F, Zacharakis E, Abdel Raheem T, Freeman A, Serhal P, Harper JC, Ralph D. Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *BJU Int*. 2013;111(3):492-9.
19. Epelbaum A, Chan S, Blank W. Pathologic findings of testicular biopsies in men with varicoceles. *Fertility and Sterility* 2003; 80:232-233.
20. Ramasamy R, Yagan N, Schlegel PN. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology* 2005; 65: 1190-1194.
21. Anniballo R, Ubaldi F, Cobellis L, et al. Criteria predicting the absence of spermatozoa in the Sertoli cell-only syndrome can be used to improve success rates of sperm retrieval. *Hum Reprod* 2000; 15: 2269-2277.
22. Hinderer MG, Hedinger C. [Sertoli-cell-only-syndrome. Histology and pathogenesis]. *Schweiz Med Wochenschr* 1978; 108: 858-866.

23. Gul U, Turunc T, Haydardedeoglu B, et al. Sperm retrieval and live birth rates in presumed Sertoli-cell-only syndrome in testis biopsy: a single centre experience. *Andrology* 2013; 1:47-51.
24. Goluža T, Boscanin A, Cvetko J, et al. Macrophages and Leydig Cells in Testicular Biopsies of Azoospermic Men. *BioMed Research International* 2014;10:14
25. Windschüttl S, Nettersheim D, Schlatt S, Huber A, Welter H, Schwarzer JU, Köhn FM, Schorle H, Mayerhofer A. Are testicular mast cells involved in the regulation of germ cells in man? - Windschüttl - 2014 - *Andrology* 2014 ;2(4):615-22.
26. Apa DD, Çayan S, Polat A, et al. Mast Cells and Fibrosis on Testicular Biopsies in Male Infertility. *Archives of Andrology* 2002; 48: 337-344.
27. Welter H, Köhn FM, Mayerhofer A. Mast cells in human testicular biopsies from patients with mixed atrophy: increased numbers, heterogeneity, and expression of cyclooxygenase 2 and prostaglandin D2 synthase. *Fertility and Sterility* 2011; 96: 309-313.
28. Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, et al. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertility and Sterility* 2000; 74:239-244.
29. Nagai T, Takaba H, Miyake K, et al. Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility. *Fertil Steril* 1992; 57: 1331-1336.
30. Govender D, Sing Y, Chetty R. Sertoli cell nodules in the undescended testis: a histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study of hyaline deposits. *Journal of Clinical Pathology* 2004; 57: 802-806.
31. Kretser DM, Kerr JB, Paulsen CA. The Peritubular Tissue in the Normal and Pathological Human Testis. An Ultrastructural Study. *Biol Reprod* 1975; 12: 317-324.
32. Pop OT, Cotoi CG, Ple IE, et al. Histological and ultrastructural analysis of the seminiferous tubule wall in ageing testis. *Rom J Morphol Embryol.* 2011;52:241-8.
33. Ma M, Yang S, Zhang Z, et al. Sertoli cells from non-obstructive azoospermia and obstructive azoospermia patients show distinct morphology, Raman spectrum and biochemical phenotype. *Hum Reprod* 2013; 28: 1863-1873.
34. Amat P, Paniagua R, Montero J. Seminiferous Tubule Degeneration in Human Cryptorchid Testes. *Journal of Andrology* 1985; 6:1-9.
35. Cai LY, Kato T, Chen M, Wang H, Sekine E, Izumi S, Kato Y. Accumulated HSV1-TK Proteins Interfere with Spermatogenesis through a Disruption of the Integrity of Sertoli-Germ Cell Junctions. *J Reprod Dev.* 2012;58(5):544-51.
36. Haider SG, Talati J, Servos G. Ultrastructure of peritubular tissue in association with tubular hyalinization in human testis. *Tissue and Cell* 1999; 31: 90-98.
37. Kumar PA, Pitteloud N, Andrews PAM, et al. Testis morphology in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Reprod* 2006; 21: 1033-1040.
38. Keskin MZ, Budak S, Zeyrek T, et al. The relationship between serum hormone levels (follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, total testosterone) and semen parameters. *Arch Ital Urol Androl.*2015; 194-197.
39. Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R. Relationships Between Serum Hormone Levels and Semen Quality Among Men From an Infertility Clinic. *Journal of Andrology* 2007; 28:397-406.
40. Gordetsky J, Wijngaarden E van, O'Brien J. Redefining abnormal follicle-stimulating hormone in the male infertility population. *BJU International* 2012; 110:568-572.
41. Lardone MC, Piottante A, Valdevenito R, Ebersperger M, Castro A. Histological and hormonal testicular function in oligo/azoospermic infertile men. *Andrologia.* 2013;45(6):379-85.
42. Dan I. Lebovic, John David Gordon, Robert N. Taylor. *Reproductive Endocrinology and Infertility: Handbook for Clinicians* 2013.