

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI



DENEYSEL OLARAK VARİKOSEL MODELİ OLUŞTURULMUŞ  
RATLARDA TESTİKÜLER DOKUDA  
ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN DÜZEYİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Yunus ERTUNG

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Cabir ALAN

Çanakkale - 2013

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI



DENEYSEL OLARAK VARİKOSEL MODELİ OLUŞTURULMUŞ  
RATLARDA TESTİKÜLER DOKUDA  
ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN DÜZEYİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Yunus ERTUNG

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Cabir ALAN

Çanakkale - 2013

T.C.  
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

Üroloji Anabilim Dalı uzmanlık eğitimi  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/11/2013

**TEZ KONU BAŞLIĞI**

"Deneysel olarak Varikozel Modeli Oluşturulmuş Sıçanlarda Testiküler  
Doku ve Kanda Asimetrik Dimetil Ajinin Düzeyi"

Tez Danışmanı: Doç.Dr.CABİR ALAN

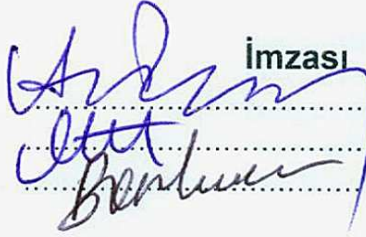
**Tez Jürisi Üyeleri:**

**Adı Soyadı**

Prof.Dr.Ahmet Reşit ERSAY

Doç.Dr.Cabir ALAN

Doç.Dr.Berkan REŞORLU

İmzası  


**ONAY:**

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki  
jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim  
Kurulunun 26./11./2013 tarih ve 2013/44 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

.....  
Dekan

Prof. Dr. Hüseyin ÖZDEMİR  
ÇOMÜ Tıp Fakültesi  
DEKAN

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, meslek hayatıma ışık tutarak yön vermemde yardımcı olan, mesleki ve kişilik özelliklerini örnek alacağım saygıdeğer hocam Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet Reşit ERSAY'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın hazırlanmasında katkıda bulunan, tecrübesiyle tezimin oluşmasında yol gösteren, ihtisasım süresince azim ve sabırla emek sarfeden ve benim iyi bir hekim olmama vesile olan Doç. Dr. Cabir ALAN'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tezimin yapılma aşamasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Bahadır KIRILMAZ ve Doç. Dr. Dilek Ülker ÇAKIR 'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Birlikte çalışmaktan onur duyduğum ve desteklerini hiç esirgemeyen tüm hocalarım ve asistan doktor arkadaşlarıma, üroloji kliniğinin ve birlikte çalıştığımız ameliyathanemizin tüm hekim, hemşire ve personeline teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Bugünlere gelmem için maddi, manevi tüm desteğini her zaman hissettiğim aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr.Yunus ERTUNG

# İÇİNDEKİLER

## DİZİN

## Sayfa No:

İç Kapak .....	i
Kabul –Onay Sayfası .....	ii
Teşekkür .....	iii
İçindekiler .....	iv
Özet .....	vi
İngilizce özet.....	viii
1.Amaç .....	1
2.Genel Bilgiler .....	3
2.1 Varikosel .....	3
2.1.1 Arteryel Kanlanma ve Venöz Drenaj.....	4
2.1.2. Varikosel Fizyopatolojisi.....	5
2.1.3. Varikosel Tanısı .....	6
2.1.4 Varikoselin Etkileri .....	7
2.1.5. Varikosel Tedavisi .....	8
2.2 Oksidatif Stres .....	9
2.2.1 Serbest Radikaller .....	9
2.2.2 Serbest Oksijen Radikalleri, Reaktif Oksijen Türleri.....	10
2.2.3 Varikosel ve Oksidatif Stres .....	12
2.2.4 Nitrik Oksit .....	12
2.2.4.1 Nitrik Oksit sentezi .....	13
2.2.4.2 Nitrik Oksit Sentaz .....	13
2.2.4.3 Nitrik Oksit'in Etkileri .....	15
2.2.4.4 Nitrik Oksit Sentetaz İnhibitörleri .....	17
2.2.4.5 Nitrik Oksit ve İnfertilite.....	18
2.3 Asimetrik Dimetilarjinin (ADMA) .....	19
2.3.1 Asimetrik Dimetilarjinin nedir?.....	19
2.3.2 Asimetrik Dimetilarjinin Sentezi .....	22
2.3.3 Asimetrik Dimetilarjinin Degradasyonu .....	23

3. Materyal ve Metod .....	24
3.1 Deney Hayvanları .....	24
3.2 Cerrahi İşlem .....	25
3.3 Biyokimyasal İnceleme Yöntemi .....	27
3.4 Histopatolojik İnceleme .....	37
4. Bulgular .....	39
5. Tartışma .....	42
6. Sonuçlar .....	47
Kaynaklar .....	50

## ÖZET

### Amaç

Endotelial fonksiyonların sürdürülmesinde NO çok önemli bir role sahiptir. ADMA, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini inhibe ederek NO oluşumunda önemli bir inhibitördür. Bu çalışmada deneysel olarak varikozel oluşturulan sıçanlarda testiküler dokudaki asimetrik dimetilarginin (ADMA) ve nitrik oksit (NO) parçalanma ürünü olan nitrit-nitrat düzeyi ölçülerek birbirleriyle olan ilişkileri istatistiksel olarak araştırılmıştır.

### Materyal Metod

Çalışma 21 adet Sprague-Dawley tipi erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Ratlar kontrol grubu (6 rat), Sham grubu (6 rat) ve deney grubu (9 rat) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Deney grubunda Eter anestezi sonrası sol renal ven proksimalinden parsiyel ligasyonu ile sol varikozel oluşturuldu. 8 hafta sonra tüm ratlar sakrifiye edildi. Testis diseke edilip, eksise edildikten sonra -80 derecede saklandı. Biyokimyasal değişiklikleri testip etmek için testiste SOD (Superoksit Dismutaz) enzim aktivitesi, ve NO son ürünü olan nitrit ve nitrat tuzlarının düzeyleri saptandı. Plazmadaki nitrit-nitrat düzeyini incelemek için ventrikül içinden 5cc alınan kan örnekleri çalışıldı ve daha sonra tüm ratlar sakrifiye edildi. ADMA analizi için yarışmalı tipte bir ELİSA kiti olan ADMA kiti kullanıldı.

### Bulgular

Oksidan stres artışına bağlı olarak, primer antioksidan özellikteki enzim olan (SOD) değerleri 3 grupta incelendi ve tüm grupların ikili karşılaştırmalarında istatistiksel anlamlı derecede fark saptandı ( $p=0.0002$ ). Bu da artmış oksidatif strese yanıt olarak ortaya çıkmıştır. ADMA değerlerinin varikozel deney grubunda sham ve kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir ( $p: 0,004$ ). Sham grubunda kontrol grubundan daha yüksek miktarda ADMA düzeylerine rastlanmıştır. Doku ve plazmadaki NO son ürünü olan tuzlar deney grubunda ve sham grubunda kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ( $p= 0.0003$ ). Bu düşüklüğün sorumlusu ortamdaki bulunan NOS inhibisyonu olduğu düşünülmektedir.

## **Sonuç**

ADMA düzeylerindeki artışın endotel disfonksiyonuyla doğrudan ilişkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Çalışmamızda deneysel olarak varikozel modeli oluşturulmuş olan ratlarda artmış ADMA düzeyinin NO sentezini bozarak infertiliteye neden olabileceğini düşünmekteyiz. Bu konu ile ilgili daha ileri çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.



## **ABSTRACT**

### **Purpose**

NO has a very important role in maintaining endothelial function. ADMA, nitric oxide synthase (NOS) activity by inhibiting the formation of NO, is a major inhibitor. In this study, experimental varicocele on testicular tissue in rats asymmetric dimethyl arginine (ADMA) and nitric oxide (NO) breakdown products, nitrite-nitrate levels were measured and statistically analyzed their relations with each other.

### **Materials and Methods**

Research was performed with 21 Sprague-Dawley male rats. Rats were divided into 3 groups including the control group (6 rats), sham group (6 rats) and experimental group (9 rats). In the experimental group after ether anesthesia, with partial ligation of the proximal left renal vein, left varicocele was created. After 8 weeks, the rats were sacrificed. Testes dissected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  after being excised. For detecting biochemical changes in the testis, levels of SOD (superoxide dismutase) enzyme activity, and the end product of NO metabolism nitrite and nitrate salts were determined. To examine plasma nitrite-nitrate levels, 5cc blood samples were taken through the For analysing ADMA, ADMA kit was used which is a competitive-type ELISA kit.

### **Findings**

Due to increased oxidative stress, which is the primary antioxidant enzymes in the (SOD) values and all three groups had been viewed pairwise comparison and the groups revealed a statistically significant difference ( $p = 0.0002$ ). This has emerged in response to increased oxidative stress. ADMA levels in the varicocele experimental group compared to the sham and control groups were found to be significantly higher ( $p = 0.004$ ) in the sham group compared with control group. ADMA levels have been found in high amounts Plasma and tissue salts which are the end product of NO in the experimental group and the sham group was significantly lower than the control group ( $p = 0.0003$ ). Responsible for the decrease in value is thought to be NOS inhibition located in the environment.

**Result**

The increase in ADMA levels are directly associated with endothelial dysfunction has been shown in earlier studies. In our study in rats with experimental varicocele model was created and increased NO synthesis of ADMA levels might lead to infertility are corrupting. Further studies on this topic are needed.

# DENEYSEL OLARAK VARİKOSEL MODELİ OLUŞTURULMUŞ RATLARDA TESTİKÜLER DOKU VE KANDA ASİMETRİK DİMETİL ARJİNİN DÜZEYİ

## 1.AMAÇ

Varikozel ve testis işlev bozukluğu arasındaki ilişki yıllardır bilinmektedir. Varikozel genç erkeklerin yaklaşık %10'unda saptanır ve en sık olarak sol tarafta olmak üzere, testis üzerinde pampiniform pleksusun genişlemesinden oluşur. Hastaların %65-70'inde sperm yoğunluğu ve hareketi önemli oranda azalmıştır. İnfertilite sık gözlenir ve varikozelin düzeltilmesiyle hastaların önemli bir kısmında geri döndürülebilir. Varikozel sıklıkla düzeltilebilir infertilitenin en sık nedeni olarak bilinsede varikozelin patofizyolojik mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Nitrik oksit (NO): İnsan biyolojisinde çeşitli, etkileri son yıllarda tanımlanan, küçük molekül ağırlıklı (30 dalton) ve heterodinamik molekül, renksiz, kokusuz toksik bir gazdır. Suda (20 santigrad derecede) ve daha kolay bir şekilde de organik çözenlerde çözülebilen, hücreler arasında ve içinde kolaylıkla dolaşabilen paramanyetik bir moleküldür. NO endotelial hücre relaksasyonunun fizyolojik mediatörü olarak tanımlanmış ve vazoregülasyonda, trombosit agregasyonunda, immünitede ve nörotransmisyonunda rol aldığı gösterilmiştir. Endotelial fonksiyonların sürdürülmesinde NO çok önemli bir role sahiptir ve her zaman endotelden NO'nun tonik salınımına uğradığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Endotelial NO sentezi azaldığında veya bozulduğunda endotelial disfonksiyon gelişerek dokunun beslenmesi bozulur. Varikozelde de ana sorun genişlemiş olan damarlar nedeniyle, testiküler kan akımının bozulmasıdır. Yani pleksus pampiniformisde endotelial disfonksiyon gelişmesidir. Endotelial disfonksiyon gelişmesindeki en önemli faktörler; bozulmuş endotelial bağımlı vazodilatasyon, azalmış nitrik oksit (NO) sentezi ve salınması, anormal vazokonstriksiyon, dimetil arjinin düzeyinin artmış olmasıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalar vasküler patolojilerde nitrik oksit

sentezini inhibe etmek suretiyle etki gösteren ve endojen olarak salınan asimetrik dimetil arjininin önemini ortaya koymuştur. Asimetrik dimetil arjinin, endojen nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörüdür. NOS'un vücuttaki fonksiyonu, L-arjinin'den nitrik oksit sentezinin sağlanmasıdır. Vasküler endotelde gerçekleşen bu reaksiyonda ADMA (asimetrik dimetil arjinin), NOS aktivitesini inhibe ederek L-arjininin hücre içine alımını engeller. Yani ADMA, nitrik oksit oluşum hızını düzenler. Bozulan endotel bağımlı vazodilatasyon, plateletlerin agregabilite artışı ve monosit adhezyonu artışının klinik delili olarak ortaya çıkan endotel disfonksiyonu, ADMA artışını uyarır.

Bu çalışmada deneysel olarak varikozel oluşturulan sıçanlarda testiküler dokudaki ADMA ve NO düzeyi ölçülerek birbirleriyle olan ilişkileri istatistiksel olarak araştırılacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 VARİKOSEL

Milattan sonra birinci yüzyılda Celcius ilk kez skrotal venlerdeki dilatasyonu tanımlayarak varikoselli kişilerin testislerinin atrofik olduğunu bildirmiştir. Osmanlı dönemi cerrahlarından Şerefeddin Sabuncuoğlu, Cerrahiyet'ül Hanniyye adlı eserinde "Devali (varikosel), testis damarlarının bükülüp üzüm salkımına benzer bir şekilde olması ve bu nedenle testisin aşağıya sarkmasıdır. Böyle bir hasta hareket ve spordan aciz kalır" yazmaktadır. Curling 1856'da varikoselin testislerin salgılama gücünde düşüklük oluşturduğunu öne sürmüştü ve ilk kez varikosel-infertilite ilişkisinden söz etmiştir. Barwell 1885'te sol varikoselli kişilerde aynı taraf testisin diğerine göre daha küçük ve yumuşak olduğunu, skrotal venlerin bir ip ile bağlandıktan sonra testisin düzeldiğini rapor etmiştir. Gerçek anlamda varikoselektominin erkek üreme sistemine etkisi, Bennet'in 1889'da bilateral varikoselektomi uyguladığı bir olgunun semen parametrelerinde düzelme saptamasıyla ortaya konulmuştur. Daha sonra 1929'da Macomber ve Sanders'in yayımladıkları olgu sunumunda oligospermik bir varikoselli infertil olgunun varikoselektomi sonrası normospermik ve fertil hale geldiğini rapor etmişlerdir. Tulloch'un 1955'te infertilite nedeniyle varikoselektomi uyguladığı olgu serisinin sonuçlarını yayımlaması ile varikoselektomi erkek infertilitesinin cerrahi tedavisi haline gelmiştir. Hastalık yüzyıllardır bilinmesine karşın patofizyolojisi günümüze kadar tam olarak aydınlatılamamıştır.

Varikosel, spermatik kord içerisinde testiküler venlerin dilatasyonu olarak tanımlanır ve erkek infertilitesinin en sık düzeltilebilir nedenidir(1,2). Varikosel, erişkin erkek popülasyonun %15-22'sinde görülmesine rağmen, infertilite araştırması nedeniyle başvuruların ortalama %30-40'ında saptanan ve erkek infertilitesinin en sık rastlanan patolojisidir(5). Erişkin dönemde prevalansı %15 gibi oranlara çıkan varikosel, 10 yaş altında nadiren tespit edilir.

Tedavi edilebilir infertilitenin en sık sebebi varikoseldir. Sol tarafta görülme oranı yaklaşık %90'dır.Çoğu çalışmada bilateral varikosel görülme oranı %10' lar civarında bildirilmektedir(6,7). Yalnızca sağ tarafta görülme oranı %2'den azdır ve genellikle vena kava inferior ya da spermatik vende kompresyona veya obstrüksiyona (tromboz) sekonder olarak oluşmaktadır(8). Primer infertilite ile kıyaslandığında sekonder infertilite ile başvuranlarda daha sık tespit edilmektedir(7).

### **2.1.1 Arteriyel Kanlanma ve Venöz Drenaj:**

Pek çok arter ve bunların birbirleriyle oluşturduğu anastomozlar testisin kanlanmasını sağlarken birden çok vende oluşturdukları pleksusla venöz kan drenajını sağlar. Testis kanlanmasının esas kaynağı aortanın dalı olan internal spermatik (testiküler) arterdir. İnternal spermatik arter, genitofemoral sinir, üreter ve eksternal iliak arterin önünde seyrederek internal inguinal halkaya ulaşır. İnguinal kanal boyunca vas deferens ve spermatik kordun diğer bileşenleri ile ilerler ve eksternal inguinal halkadan çıkarak kanalı terk eder. Bu noktadan sonra daha kıvrımlı hale gelen arterin ana testiküler ve epididimal dallara ayrılması testisin üst veya orta 1/3'lük kısmında gerçekleşir. Deferensiyal arterle testis posteriorunda testise yakın bir anastomoz yapar. Deferensiyal arter, inferior vezikal arterin dalı olup vas deferensi kanlandırır. Eksternal spermatik (kremasterik) arter ise inferior epigastrik arterin dalıdır. Spermatik kordu besler. Bu arter, internal spermatik arter ile testise yakın bir seviyede anastomoz yapar. Epididim başı hizasında arterlerce oluşturulan anastomozlar testisin kollateral dolaşımını destekler.

Pampiniform pleksus, testis dokusu içinde anterior ve posteriorundan gelen 10-12 adet ven tarafından oluşturulur. Spermatik venler testisi posteriorundan terkeder, epididimisten gelen dalları da alarak birleşip pleksus pampiniformisi oluşturur ve vas deferensin önünde ilerlerler. Eksternal inguinal halka seviyesi altında 3-4 adet ven oluşturacak şekilde düzenlenirler ve inguinal kanalı boyu boyunca kat ederler. İnternal inguinal halkadan çıkıp internal

spermatik arterin her iki yanında seyreden 2 ven oluşturacak şekilde birleşirler. Hemen sonra bu 2 ven de birleşerek arterin lateralinde, üreterin anteriorunda seyreden internal spermatik veni oluşturur. İnternal spermatik ven sağda dar bir açı ile vena kava inferiora, solda ise dik açı ile sol renal vene açılır. Kremasterik venöz ağ inferior epigastrik vene, deferensiyal ven ise pelvik pleksusa drene olur(9-10) . Deferansiyel venlerin varikozel oluşumunda etkileri yoktur(11) .

### **2.1.2 Varikozel Fizyopatolojisi**

Sağ testiküler ven vena kava inferior'a oblik açıyla açılırken, sol testiküler ven sol renal vene dik açıyla açılır. Sol renal venden yüksek hidrostatik basınç direk olarak aynı taraf pampiniform pleksusa iletilir, bunun da venlerde dilatasyon ve kıvrılmaya yol açması varikozel oluşumu için ileri sürülen ilk hipotezdir. İkinci hipotez ise spermatik venöz valflerin olmayışı sonucu oluşan venöz kan reflüsünün varikozele neden olduğunu ileri sürer. Üçüncü hipotez, sol renal venin aorta ve superior mezenterik arter arasında sıkışmasına bağlı olarak testiküler venin parsiyel obstrüksiyonunun (nutcracker fenomeni ) varikozel nedeni olduğunu ileri sürer (3).

Varikozelin testis histolojisi ve fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri olduğunu ileri süren diğer hipotezler (4):

- 1- Testiküler Kan Akımı
- 2- Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi
- 3- Hipertermi
- 4- Venöz Basınç
- 5- Renal-Adrenal Reflü
- 6- Hormonal Disfonksiyon
- 7- Otoimmünite
- 8- Akrozom Reaksiyonu
- 9- Oksidatif Stres
- 10- Apoptoz

### 2.1.3 Varikosel Tanısı

Varikoselli infertil bir erkeğin rutin standart değerlendirmesi tıbbi ve üreme öyküsünü içeren dikkatli bir anamnez, fizik muayene ve en az 2 semen analizini içermelidir. İki semen analizi arasındaki süre 7 günden az ve 3 haftadan uzun sürede olmamalıdır. Daha sonra saptanan patolojilere göre ileri değerlendirme gerekli olabilir. Varikoselin tanısında fizik muayene, skrotal ultrasonografi, sintigrafi ve venografi gibi yöntemler uygulanmasına rağmen, fizik muayene en değerli yöntemdir(19-23).Ortak görüş; “varikoselin tanısı fizik muayene ile konulur ve tanı için ek görüntüleme yöntemlerine gerek yoktur” şeklindedir. Ancak, fizik muayeneyi güçleştiren durumların varlığında (testisleri skrotumun üst tarafında olan hastalar, küçük skrotum kesesine sahip hastalar, fizik muayenede zorluk yaratan anatomik özellikler, krameter hiperrefleksisi, ortam-hasta yapısı nedeniyle muayene zorluğu) renkli Doppler ultrasonografisi gerekli olabilir. Varikosel tedavisi sonrası nüks ve tedavisinde radyolojik embolizasyon düşünülen olgularda venografi uygulanabilir(20-24).

Fizik muayene; valsalva manevrası öncesi ve sonrasında spermatik kordun palpasyonu şeklinde yapılır. Hasta ayakta dururken valsalva manevrası yaptırıldığında spermatik venler çok daha iyi olgunlaşır. Bu nedenle, düşük dereceli varikosellerin fizik muayenede saptanabilmesi için muayene mutlaka ayakta yapılmalıdır. Fizik muayene bulgusuna göre varikosel 3 derecede sınıflandırılır(15).

1.derece: Valsalva manevrası sırasında palpe edilebilen varikosel,

2.derece: Valsalva manevrası yapılmadan palpasyon ile saptanabilen varikosel,

3.derece: Valsalvasız uzaktan, gözle görülebilen varikoseldir.

Varikoselli infertil her olguda rutin endokrin ve genetik testlere gerek yoktur. Özellikle sperm sayısı 10 milyon/ml'den daha az saptanan olgularda, cinsel fonksiyonlarda bozukluk ve endokrinopatiji düşündürülecek klinik



bulguların varlığında; varikozel tedavisine yanıtı göstermesi açısından serum follikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron düzeyi yararlı olabilir.(15,20). Sperm sayısı 5-10 milyon/ml'den az olan varikozelli olgular potensiyel genetik bozukluklar açısından bilgilendirilerek karyotip ve Y kromozomu analizi uygulanmalıdır. Genetik bozukluğa sahip erkeklerde saptanan varikozel muhtemelen rastlantısal bir bulgudur ve bu olgularda tedavi fertilitiyi düzeltmeyecektir(26).

Fizik muayenede tespit edilememiş, ancak radyolojik yöntemlerle tanı konulmuş varikozele "subklinik varikozel" denir. Subklinik varikozelin tedavi edilmesinin seminal parametreler ve gebelik oranları üzerindeki etkisi kesin olarak ispat edilmiş değildir. Bugünkü veriler subklinik varikozelin tedavi edilmemesi gerektiği yönündedir(20).Kesin bir kanıya varabilmek için prospektif, randomize ve kontrollü geniş hasta serilerine ihtiyaç vardır. Bu nedenle subklinik varikozel tanısı konulan olgular tedavi edilmeden önce sperm değerlerinde ve gebelik şanslarında herhangi bir düzelme olamayabileceği, hatta postoperatif semen parametrelerinin olumsuz etkilenebileceği konusunda uyarılmalıdır.

Günümüzde gelişen tanı yöntemleri, venografi ve renkli doppler ultrasonografinin daha sık kullanılması ile varikozelin bilateral görülme sıklığı %50'lere yükselmiştir(28).

#### **2.1.4 Varikozelin Etkileri**

Varikozeli olan hastalarda ipsilateral testisin diğerinden küçük olduğu bilinmektedir. Haans ve arkadaşları varikozeli olan hastalarda testiküler volüm kaybının düşük sperm sayısı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır (129). Sigman ve Jarow varikozel derecesi ile testis volümü arasındaki ilişkiyi araştırmış ve sol testiküler varikozelin azalmış testis volümü ile ilişkili olduğunu, bu azalmanın derece 3, 2 ve 1 varikozelde sırasıyla %73, %53 ve %43

olduğunu belirtmişlerdir (130). Sokamoto ve arkadaşları, skrotal ultrason kullanarak infertil erkeklerde varikosel ve testis volümü arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Sol klinik varikoselin önemli ölçüde ipsilateral testiküler hipertrofi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Bununla beraber, varikosel varlığı göz önüne alınmaksızın fertil ve infertil erkeklerde testiküler volüm açısından önemli bir farklılık tespit etmişlerdir. Buna karşın subklinik varikosel, testiküler volüm üzerine önemli bir etkiye sahip değildir (131).

Bu anomaliler tek veya kombine olarak izlenebilir. Varikosel hastalarında aynı zamanda Leydig hücre atrofisi, Sertoli hücre dejenerasyonu, bozulmuş spermatogenezis formunda histolojik değişiklikler olduğu tespit edilmiştir. Varikosel, spermatogenezde oligozoospermi, astenozoospermi veya teratozoospermi şeklinde bozukluklara yol açabilir. Bu anomaliler tek veya kombine olarak izlenebilir.

### **2.1.5 Varikosel Tedavisi:**

Varikosel tedavisinde altın standart açık cerrahidir. Açık cerrahi yüksek inguinal, inguinal, subinguinal ve skrotal yaklaşımlarla yapılabilir. Alternatif tedaviler arasında perkütan embolizasyon ve laparoskopik cerrahi sayılabilir. Varikosel tedavisinde amaç, testiküler arteri, lenf damarlarını, vas deferens ve damarlarını koruyarak tüm internal ve eksternal spermatik ven dallarını bağlamaktır. Ameliyat sonrası testiküler venöz drenaj, vas deferensin venleri aracılığı ile olur (5).

Varikosel, ilerleyici testis hasarı ile seyrederek testis gelişiminde gerilemeye ve spermatogenezis bozarak infertiliteye neden olabilir (sperm sayısı, motilite ve morfolojide bozulma), testiküler volümde azalma ve Leydig hücre fonksiyonunda azalmayla ilişkilidir (27).

## 2.2 OKSİDATİF STRES

Sağlıklı aerobik organizmada, reaktif oksijen türlerinin oluşması ile antioksidan sistemlerin buna karşı savunması yaklaşık olarak dengededir(119,120). Bu dengeyi sağlayan kompleks olaylardan herhangi birinin etkilenmesi inflamatuvar reaksiyonlar ve otoimmunité gibi patolojik olayların uyarılmasını başlatabilir(121). Oksidan stres; hücresel antioksidan savunmanın reaktif oksijen türlerinin seviyesini toksik eşik altına tutmakta yetersiz kalması olarak tanımlanabilir(119). Başka bir şekilde tanımlayacak olursak; doku veya hücrede oluşan serbest oksijen radikallerinin konsantrasyonunun antioksidan kapasiteyi aşması olarak tanımlanır. Oksidan stres, aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, antioksidan savunmanın yetersizliği ya da her iki durumun birlikte bulunması ile oluşur(119).

### 2.2.1 Serbest Radikaller

Serbest radikaller, en dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektron içeren reaktif atom veya moleküllerdir. Organizmada normal olarak meydana gelebildiği gibi(mitokondride gerçekleşen elektron-transport reaksiyonları, P450 metabolizması, peroksizomlarda gerçekleşen reaksiyonlar, inflamatuvar hücre aktivasyonları vb.), çeşitli dış kaynaklı etkilerle de(UV ışınları, X-ray, sigara, çevresel toksinler, farmakolojik tedaviler) oluşabilir. Oksijen türevi radikaller, biyolojik sistemin en iyi bilinen serbest radikalleridir ve canlı hücrelerde, normal süreçte fizyolojik miktarlarda üretilirler. Aşırı oluştuklarında hücre ve dokuların hasarına neden olurlar(122). Yapılarındaki ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktiftirler ve tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliği gösterirler. Dolayısıyla serbest radikaller organizma için zararlıdır ve genel olarak “oksidanlar” olarak adlandırılırlar.

“Oksidanlar” dediğimiz bu yıkım ürünlerinin yol açtığı biyolojik hasarlar için “oksidatif stres” tanımı kullanılmaktadır. İleri derecede tepkici serbest radikal olan veya hücrede kolayca bu serbest radikallerine çevrilen oksijen içeren bileşikler tanımlamak için reaktif oksijen türleri (ROS) tanımlaması kullanılmaktadır. Canlı organizmada oksidanların zararlı etkilerine karşı “antioksidanlar” dediğimiz savunma düzenekleri vardır. Oksidatif stres de oksidan ve antioksidan sistemlerin dengeye ulaşmadığı; yani serbest radikal üretiminin, sistemin reaktif araçları detoksifiye etmekteki kabiliyetini aştığı durumlarda oluşmaktadır.

Oksidatif stresin genellikle protein, lipid ve DNA metabolizması üzerindeki toksik etkilerinden dolayı hastalıklara yol açtığı savunulmuştur. ROS aşırı miktarda üretildiğinde veya enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında zincirleme tepkimelerle hücre hasarı veya ölümü gerçekleşebilir. Ayrıca artmış ROS’lar nörotransmitterlere, hormonlara ve birçok mediatöre etki ederek homeostatik mekanizmayı bozabilirler.

### **2.2.2 Serbest Oksijen Radikalleri(SOR), Reaktif Oksijen Türleri(ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri(RNS)**

Serbest radikallerin biyolojik ortamlardaki türleri Reaktif Oksijen Türleri(Reactive Oxygene Species - ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri(Reactive Nitrogene Species - RNS)’dir. Bunlardan ROS; oksijen radikallerini ve radikal olmayan reaktif oksijen türevlerini kapsayan genel bir terimdir. RNS’ler de, fizyolojik önemi olan serbest radikal türleridir(123). Yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller ve radikal türevi, radikal olmayan reaktif türler; canlı organizmalar için tehlikelidir ve tüm hücre yapılarına hasar verir. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda nitrik oksit, süperoksit anyonu ve reaktif oksijen türleri sinyal iletiminde düzenleyici medyatör olarak önemli rol oynarlar. ROS’ların aracılık yaptığı bir çok cevap, aslında hücreleri oksidatif strese karşı korur, redoks homeostazını yeniden oluştururlar(124).

### Reaktif Oksijen Türleri(ROS)

- Hidroksil radikali(OH-)
- Süperoksit Anyonu(O<sub>2</sub>-)
- Hipoklorik Asit(HOCl)
- Singlet O<sub>2</sub>
- Hidrojen Peroksinitrit(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Peroksil Radikali(ROO-)

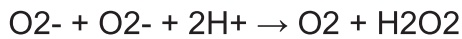
### Reaktif Nitrojen Türleri (RNS)

- Nitrojen dioksit(NO<sub>2</sub>-)
- Nitrik Oksit(NO)
- Peroksinitrit(ONOO-)

Reaktif nitrojen metabolitleri serbest nitrojen metabolitleridir ve SOR'un alt sınıfı oldukları düşünülür.

#### 2.2.2.1 Süperoksit dismutaz

Süperoksit serbest radikalının (O<sub>2</sub>'<sup>-</sup>) hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve moleküler oksijene (O<sub>2</sub>) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir . İnsan seminal plazması yüksek SOD aktivitesine sahiptir ve çoğu prostattan sentezlenir. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomeri sitozolik Cu-Zn SOD'dur ve aktivitesinin %75'inden sorumludur (125). SOD'un ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen, bu enzim sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyleri düşük tutulur.



### 2.2.3 Varikosel ve oksidatif stres

İnsan ve deneysel araştırma verileri varikoselin patofizyolojisinde apoptozis, hipoksi ve reaktif oksijen türlerinin rolünün olduğunu göstermektedir. Deneysel varikosel modellerinde hipoksi, germ hücre apoptozisini arttırmakta ve mikrovasküler hemodinamiyi hızlandırmaktadır. Deneysel varikosel modellerinde testiküler dokuda “hypoxia-inducible factor 1 alfa” (HIF-1 alfa) artmış bulunmuş, hipoksiye yanıt olarak artmış anjiogenezin bir göstergesi olan mikrovasküler dansite artışı saptanmıştır.(126-127)

Varikosele bağlı oksidatif strese yanıt olarak semen ve testis dokusunda hidrojen peroksit, serbest radikaller ve süperoksit anyonlarının arttığı gösterilmiştir(128). Ayrıca varikoselli olgularda spermatozoal reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) arttığı ve seminal total antioksidan kapasitenin azaldığı rapor edilmiştir (132).

Varikoselli hastalarda oksidatif stresin göstergesi malondialdehit (MDA) ve süper oksit dismutaz (SOD) seviyelerinde artış gösterilmiştir (133). Varikoselde internal spermatik vende oksidatif stresin ve antioksidan enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür. Antioksidan enzim aktivitesinin artması, serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkilerini dengelemeye yönelik bir cevap olabilir (134).

### 2.2.4 Nitrik Oksit

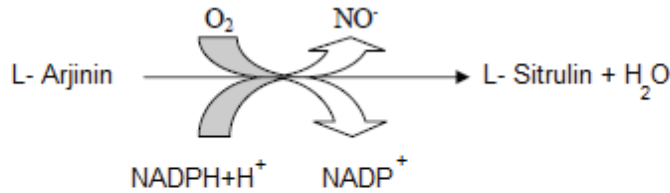
Nitrojen monoksitin (NO) kimyasal özelliklerine ilişkin ilk çalışmalar 1772 yılında J.Priestly tarafından yapılmıştır. 1914 yılında H. Dale ilk kez in vivo olarak NO'nun varlığını ortaya koymuştur. İlk olarak endotel hücrelerinde tespit edilmiş, sonra bütün memeli hücrelerinde bulunmuştur. 1987 yılında damar endotel hücrelerinde bir enzim aracılığıyla NO oluşumunun gösterilmesi biyolojik araştırmalarda yeni bir alanın açılmasına neden olmuştur. Daha sonraki yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar hızla artmış ve organizmadaki önemi nedeniyle 1992 yılında “yılın molekülü” olarak tanımlanmıştır (32).

NO atmosferde nitrojen ve oksijen moleküllerinin çok yüksek sıcaklıklarda birleşmesi ile oluştuğu gibi, eksoz ve endüstriyel atıklara bağlı olarak da meydana gelmektedir.

NO stabil olmayan, inorganik, renksiz, oksijen yokluğunda suda çözünebilen bir gazdır. Orbitalinde taşıdığı eşleşmemiş tek elektronu nedeniyle radikal özelliğindedir. Sıvı ortamlarda serbestçe diffüze olabilir ve hücre membranlarında rahatça geçebilir. Dokuda yarılanma zamanı 10-60 sn'dir. Oksijen varlığında hızlıca nitrit ve nitrata inaktive olur(33).

#### 2.2.4.1 NO Sentezi

Nitrik oksit sentaz(NOS) tarafından, NADPH ve oksijen varlığında, yarı esansiyel, bazik yan zincirli bir aminoasit olan L-arjinin'in, L-sitrülin'e oksidasyonu sırasında NO sentezlenmektedir. Monooksijenaz aktivitesi gösteren NOS ile katalizlenen bu reaksiyonda moleküler oksijenin bir atomu, arginin'in guanido-nitrojen atomuna aktarılırken, diğeri suya redüklenmektedir.



Şekil 1 : Nitrik Oksit Sentezi

#### 2.2.4.2 Nitrik oksit sentaz

NO sentezi, sitokrom P450-oksidoredüktaz ailesine ait bir enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından katalizlenir. Enzimin C-terminal redüktaz bölgesi NADPH, FMN, FAD için bağlanma yerleri, N-terminal bölgesi tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), hem ve L-Arjinin için bağlanma yerlerine sahiptir. Hem ve BH<sub>4</sub> enzimin dimerizasyon ve elektron transportunun stabil hale gelmesini sağlar. Kofaktör olarak NAD, FMN, BH<sub>4</sub>'e ve fonksiyonel olabilmesi

için hem ve kalmodulin'e ihtiyaç duyar. NOS aynı anda bu 5 kofaktör/prostetik grup bağı gerektiren, bilinen tek enzimdir (35,36).

NOS enzimleri yapısal ve sentezi uyarılabilen olarak iki ana gruba ayrılır;

1- Yapısal NOS (cNOS)

a. Nöronal (nNOS) : Nöronlardaki nitrik oksit sentaz.

b. Endotelial (eNOS) : Endotel hücrelerindeki nitrik oksit sentaz.

2- İndüklenebilen (iNOS)

Yapısal NOS : Endotel ve nöron kaynaklıdır. Damar duvarındaki gerilmelere veya asetil kolin, bradikinin gibi nörotransmitterlerin çeşitli reseptörleri uyarmalarına cevaben, aralıklı olarak, hücre sinyali için yeterli olacak seviyede (pikomol) NO sentezlenmesini sağlar (37). İndüklenebilir NOS (iNOS) : Ekspresyonu tümör nekrozis faktör- alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon-gama (IF- $\gamma$ ) gibi sitokinler tarafından indüklenir ve büyük miktarlarda NO sentezlenmesini sağlar. iNOS'un bu aşırı aktivitesi septik şok, hemorajik şok ve hepatit gibi akut ve kronik hastalıklarda görülmektedir. iNOS ile NO sentezi, ROS oluşumuyla eş zamanlı olarak oluşmaktadır (38) NOS izoformlarının hepsi de NADPH ve kalmoduline bağımlı olup, aktiviteleri farklı şekillerde düzenlenmektedir. Örneğin, eNOS endotel hücrelerde lokalize olarak bulunmakta ve bu enzimle yapısal NO üretimi, endojen substratların bağlandığı bir çok reseptörün uyarılmasını takiben, intraselüler  $Ca^{+2}$  seviyeleri tarafından kontrol edilmektedir. iNOS aracılıklı immünolojik bir uyarıya cevap olarak, çeşitli hücre tiplerinde yüksek düzeylerde NO sentezlenmektedir. Örneğin, makrofajlar, fibroblastlar, glial hücreler, kardiyak miyositler ve düz kas hücrelerinde, bakteriyel LPS ve IL-1 gibi proinflamatuvar sitokinler iNOS ekspresyonunu indüklerler. Her iki enzim de L-arginin guanidin terminalindeki modifikasyonlarla inhibe edilir. Endotel kaynaklı NOS (eNOS) ile sentezlenen NO, vazodilatatör etkisiyle vasküler Hemostazisi sağlar, ayrıca trombosit agregasyonunu, endotelde adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu ve düz kas proliferasyonunu önleyici etki gösterir (35).



### 2.2.4.3 Nitrik Oksit'in Etkileri

Nitrik oksitin biyolojik etkileri(40):

- 1- Etki yerinde üretilen NO konsantrasyonuna ve üretildiği spesifik bölgeye,
- 2- Süperoksit anyonları veya hem grupları gibi reaktif gruplara bağlanmaya paralel olarak meydana gelen NO inhibisyonuna,
- 3- NO etkilerine aracılık eden guanilat siklaz enziminin kullanılabilirliğine bağlıdır.

NOS'un miktarındaki artış çoğunlukla NO miktarında artışı beraberinde getirir ve bu durum NOS'un aktivitesini daha da artırabilir. iNOS aracılığıyla uzun süre salınan NO, sadece mikroorganizmalar için değil, kendisini üreten ve komşu hücreler için de sitotoksiktir. Ve NO'in ROS ile reaksiyonu sonucu oluşan radikaller (peroksinitrit gibi) çok daha toksiktir (41). İnflamasyonun çeşitli modellerinin patofizyolojisinde NO'nun rolü olduğu için NOS inhibitörleri, NOS aktivitesini azaltmalarından dolayı inflamasyonun şiddetini azaltırlar (42).

Aktif guanilat siklaz tarafından intraselüler seviyesi yükselen cGMP, kinazlar aracılığıyla, kalsiyumun ya hücre dışına çıkarılmasını ya da hücre içinde depolanmasını uyararak, intraselüler Ca<sup>2+</sup> seviyelerini düşürür. NO'nun cGMP bağımlı etkileri denilen bu mekanizmaya dayanan bazı biyolojik etkileri aşağıdaki gibi sıralanabilir(34,39):

- 1- Vasküler olan ya da olmayan düz kasların gevşemesi
- 2- Platelet adezyonunun ve agregasyonunun inhibisyonu
- 3- Santral ve periferel sinir sistemlerinde sinyal iletiminin sürdürülmesi.
- 4- Nötrofil kemotaksisinin önlenmesi

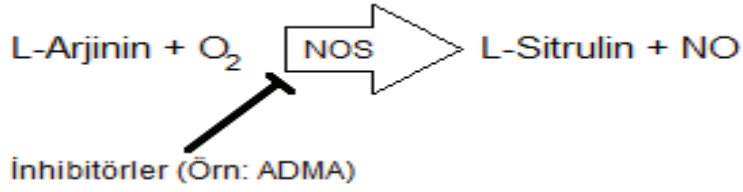
Yukarda sayılan etkileri yanında NO.'nun, cGMP'den bağımsız biyolojik etkileri de vardır.

Bunları da şu şekilde sıralamak mümkündür(39).

- 1- Siklooksijenaz gibi bazı enzimlerin hem gruplarına bağlanarak aktive olmalarını sağlar.
- 2- NADH (nikotinamid adenin dinükleotid, redükte form) : süksinat oksidoredüktaz, akonitaz gibi bazı mitokondriyal demir-sülfür enzimlerini inhibe eder.
- 3- NOS ile yapısal benzerlik gösteren sitokrom p450 sistemini inhibe eder. Endotel hücrelerde gen transkripsiyonunu ve translasyonu doğrudan modüle ederken, nöronlarda gen ekspresyonu üzerine kalsiyumun etkisini artırır.
- 4- Na-K-ATPaz ve kalsiyuma bağımlı potasyum kanallarını aktive eder.
- 5- Bir çok inflamasyon durumunda yüksek düzeyde sentezlenen NO; mantar, bakteri, helmint, protozoa gibi mikroorganizmalar ve tümör hücreleri için sitostatik ve sitotoksik etkiye sahiptir.
- 6- p53 (tümör baskılayıcı gen) düzeylerini artırarak, apoptoz aracılı hücre ölümüne yol açar.
- 7- Tıpkı  $\alpha$ -tokoferol gibi lipid peroksi radikallerini yakalayıp, zincir yayılma reaksiyonlarını ve böylece lipid peroksidasyonunu önleyerek antioksidan özellik gösterir. Radikallerle etkileşim hızı açısından, NO'nun iyi bir antioksidan olduğu ispatlanmıştır.

NO'nun fizyolojik özelliklerini kısaca sıralarsak:

- Guanilat siklaz, siklooksijenaz aktivasyonu
- Normal vasküler tonus
- Plaklet agregasyonunun inhibisyonu
- Kısa süreli vazodilatasyon
- Gıda alımı ile uyarılan mide dilatasyonu
- Mukoza sterilitesi
- Uzun süreli potansiyon-hafıza
- Sinir iletimi
- Analjezi
- Gebelikte maternal immunsupresyon



Şekil 2: NO sentezinde ADMA'nın yeri

#### 2.2.4.4 NOS İnhibitörleri

1. **L-NMA (N-metil-L-arjinin):** Tüm NOS izoformlarının inhibitörü (43).
2. **L-NNA (N-(Omega)-nitro-L-arjinin):** eNOS inhibitörü (44).
3. **L-NAME (L-NG-Nitroarjinin metil ester):** eNOS ve nNOS inhibitörü (45).
4. **7-NI (7-nitroindazol):** nNOS inhibitörü (46).
5. **L-NMMA (L-NG-monometil Arjinin):** Tüm NOS izoformlarının inhibitörü (47).
6. **L-NAA (N-omega-amino-L-arjinin):** iNOS ve cNOS inhibitörü (48).
7. **L-SMTC (S-metil-L-tiositrüllin):** nNOS inhibitörü (49).
8. **L-NIO (N(5)-(1-iminoetil)-L-ornitin):** Tüm NOS izoformlarının inhibitörü (50).
9. **Agmatin(L-arjinin metil ester):** iNOS inhibitörü (51).
10. **L-kanavanin:** iNOS inhibitörü (52).

**11. Aminoguanidin:** iNOS inhibitörü (53).

**12. AE-ITU ( aminoetil isotiourea):** iNOS inhibitörü (54).

**13. ADMA ( asimetrik dimetil arjinin)**

#### **2.2.4.5 NO ve İNFERTİLİTE**

Günümüzde sperm fonksiyon bozukluğu ve infertilite arasındaki ilişkinin açıklanabilmesi için yapılan çalışmalar serbest oksijen radikalleri üzerine odaklanmıştır ve oksidatif stresin erkek üreme fonksiyonu üzerine olan rölatif etkisi araştırılmıştır. Oksidatif stres, oksijen ve oksijen kaynaklı oksidanların serbest oksijen radikallerini arttırmasıyla başlayan bir durumdur. Birçok hücrenin antioksidan mekanizmaları oksidatif stres altında bozulur. Hem serbest oksijen radikallerinin artımı, hem de hücrenel antioksidan kapasitenin azalması oksidatif stresin gelişmesine neden olur. Dolayısıyla, oksidatif stresin infertilitedeki rolü, üreme organındaki antioksidanlara karşı koyma mekanizmalarının bilinmesi tedavi edici potansiyel taşımaktadır.

Serbest oksijen radikalleri çok yüksek reaktif okside edici ajandır. Bir serbest radikal bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşır. Serbest oksijen radikalleri süperoksit anyon, hidrojen peroksit, peroksil radikaller ve reaktif hidroksil radikalleri içerir. Ayrıca üreme ve sperm fonksiyonları üzerinde çok etkili olduğu gösterilmiş olan nitrik oksit ve peroksinitrit anyonu gibi nitrojen derive serbest radikaller yer almaktadır.(1)

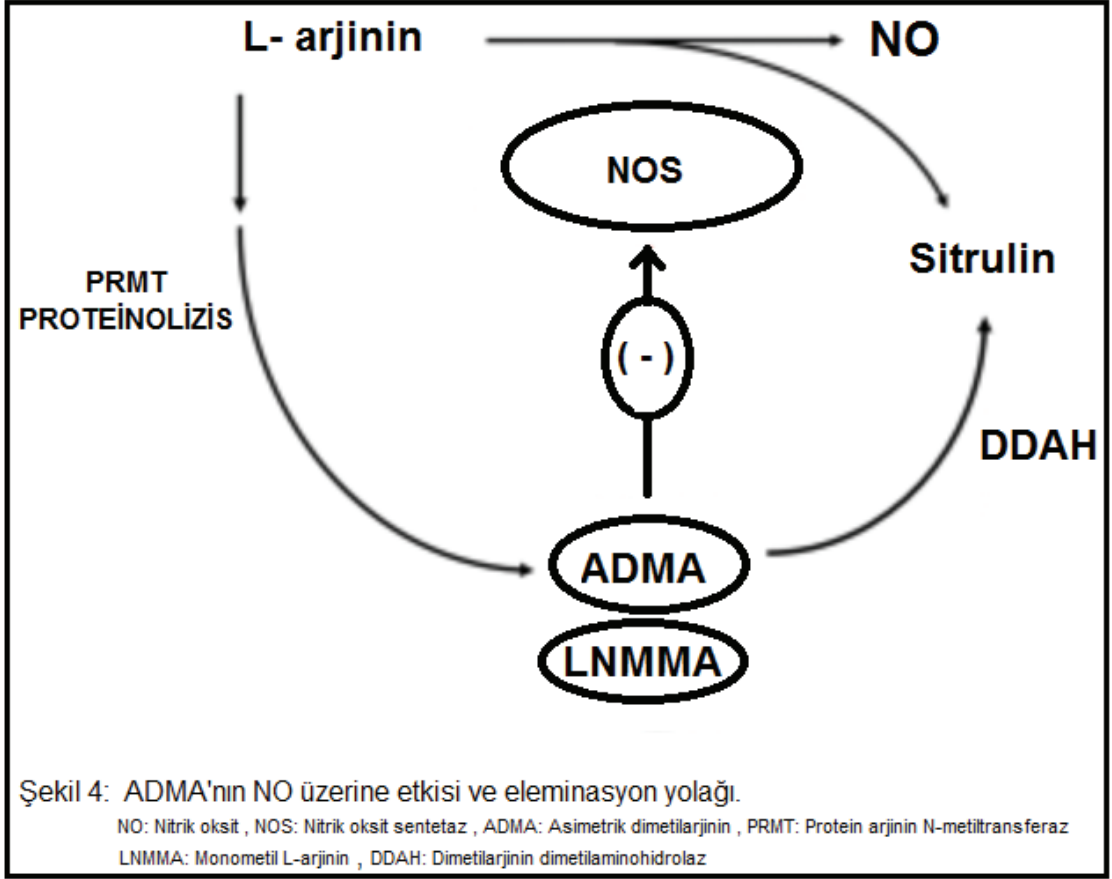
Son zamanlarda yapılan çalışmalarda nitrik oksit radikallerinin sitotoksik ve patolojik olaylarda ve inflamasyonda birçok biyolojik rolleri olduğu bulunmuştur. Enfeksiyon ve inflamasyona yanıt olarak NO biyosentezi olması, sperm motilite ve fonksiyonunda bozulmaya neden olabilmektedir. Nitrik oksitle tetiklenen sperm hasarının primer mekanizmasının mitokondrial solunum ve DNA biyosentezinin inhibisyonu olduğu düşünülmektedir.(2)

Bazı çalışmalarda NO seviyesinin özellikle varikoselle ilişkili olduğu fakat infertilite ile bir ilgisinin olmadığı ileri sürülmüştür(3). Kısa ve arkadaşları, suprafizyolojik NO düzeylerinin testis ve sperm fonksiyonu üzerinde olumsuz etkisi olduğunu ve varikosel ile semen NO düzeyi arasında bir ilişki olduğu göstermiştir. NO' nun varikoselin patogenezisinde önemli bir rolü olduğu sonucuna varılmıştır.

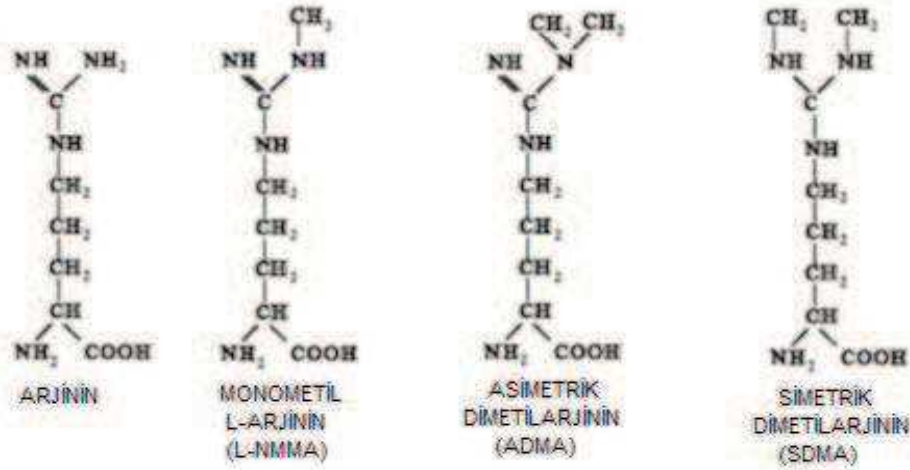
## **2.3 ADMA**

### **2.3.1 ADMA nedir?**

Asimetrik dimetilarjinin(ADMA) nitrik oksit sentaz(NOS) aktivitesinin yarışmalı olarak inhibe eden bir aminoasitdir(55). ADMA, intraselüler alandaki arjinin N-metiltransferaz (PMRT) ile arjininin rezidüel kısmının metilasyonu ile oluşmaktadır.ADMA'nın sadece %20'si idrarla atılır.İnsanlar günlük yaklaşık olarak yaklaşık 300 mikromol(60mg) ADMA üretir(56).ADMA'nın yaklaşık %80'i dimetilarjinin dimetilaminohidrolazın (DDAH) enzimatik degradasyonu ile temizlenir.



DDAH; ADMA'yı sitrölin ve dimetilamine çevirir. DDAH, ADMA'nın plazma ve doku düzeylerini regüle ederek, NOS aktivitesini korur. NOS regölatörü olarak DDAH'nin kritik rolü transgenik ve DDAH'nin aşırı düzeyde verildi fareler üzerinde gösterilmiştir. DDAH transgenik hayvanlarda, artmış DDAH aktivitesi, azalmış ADMA düzeyi, plazma ve idrarda nitrojen oksit artışı ve vasküler dirençte azalma açıkça görölmektedir(58). Homozigot DDAH'nin aşırı düzeyde verildiği fareler yaşamadığı, heterojen DDAH'nin aşırı düzeyde verildiği farelerde plazma ADMA düzeyinde artış, plazma ve idrarda NO azalması ve vasküler dirençte artış tespit edilmiş(59).



Şekil 3 : Arjinin ve türevlerinin moleküler formasyonu

Doğada metillenmiş arjininin 3 çeşidi bulunmaktadır. ADMA, N-monometil-L-arjinin (L-NMMA), simetrik dimetilarjinin (SDMA) (83). Metillenmiş arjinin biyolojik aktivitesi ilk kez Hibbs ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. L-NMMA'nın in vitro ortamda makrofaj aktivasyonunu inhibe ettiğini bildirdiler (85). İnsan plazmasındaki L-arjininin 40-100 µM arasında olduğu ve L-argininin 3 µM gibi küçük konsantrasyonun NOS'un yarı- maksimal aktivitesini indüklediği bildirilmiştir (93,94). Dolaşımdaki ADMA'nın 1-10 µM'sinin NOS inaktivasyonu için gerçekten L-arginin ile rekabet edip edemeyeceği hala sorgulanmaktadır. Bu konuyla ilgili olarak, Cardounel ve arkadaşları, intrasellüler ADMA seviyesinin önemli ölçüde ekstrasellüler seviyeden daha yüksek olduğunu gösterdi (95). Buna ek olarak, balonla hasarlanmış arterlerde ADMA düzeyinin dört kat arttığını, ve bunun da vasküler relaksasyon için önde gelen nedenlerden biri olduğunu gösterdiler. Böger R ve ark, son zamanlarda geniş topluluğu taban alarak yaptıkları epidemiyolojik çalışmada ADMA'nın tüm nedenlere bağlı mortalite ile önemli oranda ilişkili olduğunu doğruladılar (96). Yakın zamanda, ADMA'nın kronik infüzyonunun aşırı düzeyde eNOS verilen farelerde bile vasküler lezyonu indüklediği bildirilmiştir (97), bu in vivo ortamda ADMA'nın tanımlanmamış bazı ek etkilerinin de (NO/NOS bağımsız etki) olabileceği fikrini bize verir. Buna ek olarak, her 3 metilarjininin plazma membran katyonik amino asit taşıyıcısı ile ilişkili L-arjinin taşınmasına müdahale

ettiği bildirilmiştir (98). Bu nedenle, SDMA'nın NOS aktivitesi üzerinde direkt bir etkisi olmamasına rağmen L-arjininin kullanılabilirliğini sınırlayarak NO üretimini inhibe etmesi de mümkündür. Gerçekten de, Bode-Boger ark son zamanlarda, SDMA'nın kulture ECs'de doza bağımlı olarak NO sentezini bloke ettiğini ve KAH hastalarında SDMA plazma düzeyinin koroner arter hastalığı (KvH) yaygınlığı ile ilişkisinin anlamlı olduğunu gösterdiler (99).

### 2.3.2 ADMA SENTEZİ

Normal koşullarda, insanlarda günlük yaklaşık olarak 300 µmol ADMA sentezi olduğu bildirilmiştir (100). Pek çeşit tür hücre metillenmiş arjinin üretebilir. Bu dimetilarjininler protein metiltransferaz (PRMTs) tarafından üretilen, transkripsiyon sonrası metillenmiş proteinlerin degrade olmasıyla elde edilir (101) (Şekil 1). S-Adenozilmetionin PRMTs aracılı reaksiyonlarda metil vericisi olarak çalışır (101). Arjinin-metillenmiş proteinlerin proteolizi sonrası serbest dimetilarjininler hücreden salınır. Bugüne kadar, 11 PRMT geni, PRMT1-11 bildirilmiştir (102,103). PRMT'nin 2 tipi vardır: tip 1 (PRMT1-4, 6, 8 ve 10-11) asimetric şekilde arjininin rezidüel kısımlarının dimetilasyon ve monometilasyonunu katalizler ve ADMA ve L-NMMA üretir, oysa, tip 2 (PRMT5, 7 ve 9) arjininin rezidüel kısımlarının simetric dimetilasyon ve monometilasyonunu katalizler ve SDMA ve L-NMMA üretir (102). Böylece, tip 1 PRMT'nin in vivo ortamda ADMA oluşumunda temel görevi olduğu düşünülüyor. Tip 1 PRMT'nin, damarlar, kalp ve böbrek de dahil olmak üzere çeşitli organlarda bulunur (104-107). Son zamanlarda, okside düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'nin PRMT genleri üzerinden endotelial hücrelerle ADMA oluşumunu artırdığı rapor edildi (101). Ayrıca, PRMT genlerinin indüksiyonu yoluyla endotelial hücrelerden ADMA sekresyonu artırılabilir (108). Bu gözlemler, in vivo ortamda, ADMA'nın kısmen tip 1 PRMT ile regülasyonunun yapılabileceğini öngörmektedir.



### 2.3.3 ADMA DEGRADASYONU

Farelerde dolaşımdaki ADMA % 90'dan fazlasının dimetilarjinin dimetilaminohidrolazın (DDAH) etkisi ile metabolize olduğu bilinmektedir (109). ADMA ve L-NMMA (SDMA değil) DDAH aracılığı ile sitrulin ve dimetilamine metabolize oluyor (Şekil 1). DDAH tüm vücuda yaygın olarak dağıtılır (110-113), ve DDAH'ın 2 izoformu vardır (DDAH-I ve DDAH-II) (111). Buna rağmen, DDAH izoformlarının spesifik işlevleri tam olarak anlaşılmış değildir, her iki izoformu ADMA'yı metabolize edebilmektedir. DDAH-I nöronal NOS üreten dokularda yer almaktayken, DDAH-II endotelial NOS içeren dokularda hakimdir (113,114). DDAH inhibitörü olan 4124W metilarjinin metabolizmasını inhibe eder. Ayrıca endotelial NOS'u inhibe edebilecek düzeyde ADMA'yı artırdığı gösterilmiştir (115). Buna ek olarak, DDAH'nın aşırı ekspresyonu kültürdeki vasküler düz kas hücrelerinde ADMA üretimini azalttığı böylece, NO oluşumundaki artış indüklenebilir NOS üzerinden olur (116). Bundan başka, ADMA'nın hiperkolesterolemi, diyabet ve KBH'da artması, ADMA'nın DDAH aracılığı ile metabolizmasının bozulmasına bağlıdır (117,118).

## 3.MATERYAL VE METOD

### 3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınarak Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesinde Deney Hayvanı araştırılması için ayrılan bölümde gerçekleştirildi. Çalışma Trakya Üniversitesinden temin edilen 21 adet adolesan dönemdeki (ortalama 6 haftalık) Spraque-Dawley tipi erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Ratların ağırlıkları 190-292 gr arasında değişmekte olup ortalama ağırlıkları 240 gramdı. Hayvanlar sabit sıcaklık(18-21C) ve nem oranında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olan standart laboratuvar ortamında barındırıldılar. Her kafeste 3-4 rat olmak üzere sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendiler. Barınma süresince deney hayvanları standart beslenme, barınma ve bakım koşullarına tabi tutuldular ve deney hayvanlarına standart dışı kısıtlama uygulanmadı.

### Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Ratlar toplam 3 gruba ayrıldılar. Cerrahi sırasında mikro cerrahi setler kullanıldı.

Grup 1: Kontrol grubu. Herhangi bir işleme tabi tutulmadı ve 8 hafta sonra sakrifiye edildi (6 rat).

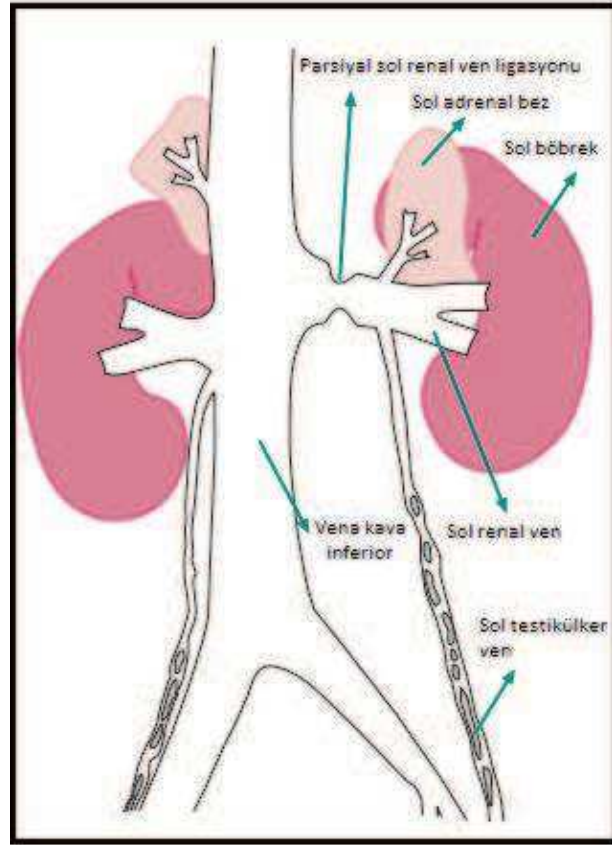
Grup 2: Sham grubu. Sol renal ven proksimalinden etrafı dönüldü ancak ligasyon yapılmadan bırakıldı ve 8 hafta sonra sakrifiye edildi (6 rat).

Grup 3: Varikosel oluşturulan grup. Anestezi sonrası sol renal ven proksimalinden parsiyel ligasyonu ile sol varikosel oluşturuldu. 8 hafta sonra sakrifiye edildi (9 rat).

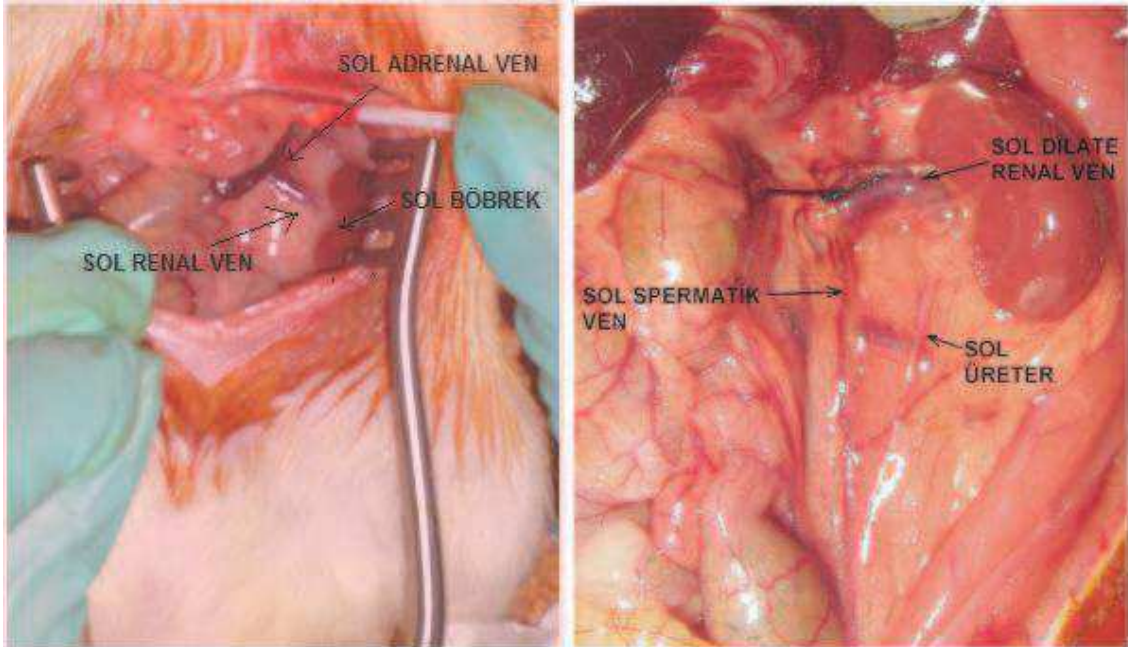
### 3.2 Cerrahi İşlem

Deneysel sol varikozel oluşturulacak ve sham operasyonu uygulanacak ratların tümü işlemde 6 saat öncesinden başlayarak sadece su içmelerine izin verilerek aç bırakıldı. Ratlar antisepsi kurallarına uyulup, vücut ısıları korunarak laboratuvar şartlarında operasyona alındı. Eter inhalasyonu ile anestezi sağlandıktan sonra tüm ratlar sırt üstü yatırıldı ve batın orta hat çizgisi her iki yanda 1'er cm'lik alan traş edilerek tüylerden arındırıldı. Cerrahi alan açığa çıkarıldıktan sonra % 10 Povidone Iodine ile uygun saha temizliği yapıp yalnızca cerrahi alan açıkta kalacak şekilde batın steril örtülerle kapatıldı.

Varikozel modeli: Steril cerrahi aletlerle karın ön yüzüne 2 cm'lik bir insizyon uygulandı. Linea alba üzerinden cilt, cilt altı, karın ön duvarı ve periton geçilerek batın içerisine ulaşıldı. Barsaklar mediyale devrilerek sol renal ven, vena kava, yağ ve bağ dokuları diseke edilerek uygun görüntü sağlandı ve sol renal ven proksimali serbestlendi. Varikozel modeli oluşturulacak gruplardaki ratlarda renal ven proksimali bir ince uçlu klemp yardımı ile dönüldükten sonra 4/0 ipek geçildi. Takiben 0,85mm kalınlıkta L şeklindeki metal çubuk sol renal ven üzerine paralel olacak şekilde yerleştirildi ve 4/0 ipek suture ile renal veni ve metal çubuğu saracak şekilde daraltıldı. Daha sonra metal çubuk geri çekilerek renal vende % 50 oranında daralma gözlemlendi. Daha sonra 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sutureler ile batın 2 tabaka halinde kapatıldı.



Şekil 5: Parsiyal sol renal ven ligasyonunun anatomik gösterimi



Şekil 6: renal venin lokalizasyonu ve parsiyel ligasyonu

Sham modeli: Steril cerrahi aletlerle karın ön yüzüne 2 cm'lik bir insizyon uygulandı. Linea alba üzerinden cilt, cilt altı, karın ön duvarı ve periton geçilerek batın içerisine ulaşıldı. Barsaklar mediyale devrilerek sol renal ven, vena kava ve yağ ve bağ dokuları diseke edilerek uygun görüntü sağlandı ve sol renal ven proksimali serbestlendi. Renal venin etrafı bir ince uçlu klemp yardımı ile döndürüldükten sonra 4/0 ipek geçildi ancak bağlanmadan (daraltma işlemi yapılmadan) işlem sonlandırıldı. Daha sonra 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sütürler ile batın 2 tabaka halinde kapatıldı.

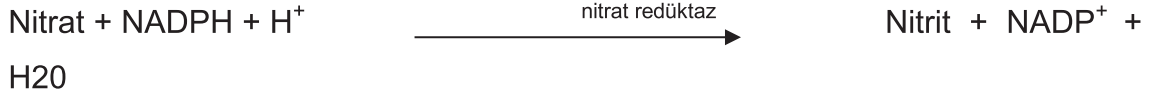
### 3.3 Biyokimyasal İnceleme Yöntemi

Testis diseke edilip, eksize edildikten sonra -80 derecede saklandı. Biyokimyasal değişiklikleri testip etmek için testiste SOD (Superoksit Dismutaz) enzim aktivitesi, ve NO son ürünü olan nitrit ve nitrat tuzlarının düzeyleri saptandı. Plazmadaki nitrit-nitrat düzeyini incelemek için ventrikül içinden 5cc alınan kan örnekleri çalışıldı ve daha sonra tüm ratlar sakrifiye edildi.

**Doku Homojenizasyonu:** Doku örnekleri tartıldıktan sonra total nitrit/nitrat ve süperoksit dismutaz (SOD) tayinleri için, %0,9 NaCl içerisinde homojenize edilip, %10'luk homojenatlar hazırlandı. Elde edilen doku homojenatları daha sonra 30 saniye aralıklarla, orta şiddette iki kez sonike edildi. Homojenizasyon ve sonikasyon işlemleri yaklaşık 4C'de soğuk ortamda yapıldı. Sonikasyon işleminden sonra, total nitrit/nitrat ve SOD tayinleri için, hazırlanmış homojenatlar 15.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Her iki tayin de süpernatantlardan alınan örneklerde yapıldı.

## Nitrit/nitrat

Nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile ve NADPH varlığında nitrite indirgenir.



Nitritin sülfonilamid ve N-1\_nafıl etilendiamin dihidroklorid ile reaksiyona girmesi sonucu kırmızı-mor renkli diazo bileşiği oluşur. Oluşan diazo bileşiğinin 540 nm dalga boyunda okunur. Bu işlemle total nitrit ve nitrat düzeyi tayin edilmiş olunur. Ayrıca nitrat redüktaz reaksiyonunu oluşturmadan plazma nitrit düzeyi direkt reaksiyonel oluşan renkli diazo bileşiğinin yine 540nm'de köre karşı spektrofotometrik değerlendirmesinden hesaplanır.

Yöntemin uygulanışı Boehringer Mannheim "nitric oxide colorimetrik assay" kiti kullanılmıştır.

	Kör nitrit (µl)	Örnek kit (µl)	Kör nitrit + nitrat(µl)	Örnek nitrit + Nitrat (µl)
Örnek	-	500	-	500
Distile su	770	270	500	-
Reaksiyon karışımı 2	-	-	250	250
Çözelti 3	-	-	20	20
Oda ısısında 30dk beklenir ve süre sonunda A1 okuması yapılır.				
Renk reaktifi 1	250	250	250	250
Renk reaktifi 2	250	250	250	250
Karanlıkta 15 dakika bekletilip, süre sonunda A2 okuması yapılır				

Hesaplama = (A2-A1)nitrit-(A2-A1)kör nitrit  
Nitrit+nitrat= (A2-A1)nitrit+nitrat-(A2-A1)kör nitrit+nitrat  
Nitrat = Anitrit+nitrat-Anitrit  
Hesaplamalar standart eğrisi kullanılarak yapılır.

### Doku SOD aktivitesi tayini

Süperoksid serbestleştirici olarak kullanılan ksantin/ksantin oksidaz sistemiyle nitroblue tetrazolium indirgenmesinin SOD tarafından inhibisyonuna dayanır. 1Ü SOD aktivitesi nitroblue tetrazolium indirgenmesini %50 inhibe eden protein konsantrasyonu olarak ifade edilir (101).

Reaksiyon karışımı: 40ml ksantin, 20 ml EDTA 20ml nitroblue tetrazolium, 12 ml sodyum karbonat 6 ml bovin serum albumin karıştırılır ve pH=10,2'ye ayarlanır.

Ksantin oksidaz çözeltisi: 0,167 U/ml

	Örnek (µl)	Kör (µl)
<b>Reaksiyon karışımı</b>	2850	2850
<b>Süpernatant</b>	150	-
<b>Ksantin oksidaz</b>	50	50
25C'de 20 dk inkübe edilir		
<b>CuCl2</b>	50	50

Spektrofotometride 560 nm dalga boyunda suya karşı formazon oluşumu ölçülür

Hesaplama:

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{\text{kör}} - A_{\text{örnek}})}{A_{\text{kör}}} \times 100$$

Doku SOD aktivitesi Sun yöntemi modifiye edilerek ölçülmüştür.

Kullanılan istatistiksel yöntem: Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testine göre değerlendirildi.

## **ADMA**

### **KAN ÖRNEĞİ ANALİZLERİ**

Alınan kan örneklerinde çalışılacak ADMA (asimetrik dimetiltarjinin) analizleri için periferal venöz kandan tüplere alınan 5 cc kan örneği 3,000 × g de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Ayrılan örnekler çalışma gerçekleştirilinceye dek -40 °C de saklanmıştır.

ADMA'nın serumdaki miktarını ölçmek için çalışmamızda BioVendor Research and Diagnostic Products (Cat.No: REA 201/96) manufactured by DLD Diagnostica GMBH / germany) kiti kullanılmıştır. Yarışmalı tipte bir ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kiti olan ADMA Kiti, ADMA düzeylerinin serum ve plazma örneklerinde kantitatif ölçümü için uygundur. ELISA çalışması Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D. Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

### **ELISA (Enzim Linked ImmunoSorbent Assay)**

ELISA yöntemi, 1960'lı yıllarda Radioimmunoassay yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Radioimmunoassay yöntemini radyoaktif madde ile işaretlemeyi gerektirir ve ciddi bir atık sorunu beraberinde getirir. Oysa ELISA yönteminde işaretleme enzimlerle yapılır ve atık problemi yoktur, kullanılan reaktiflerin yarı ömürleri uzundur.

ELISA yöntemi, özgül antijen-antikor bağlanmasını göstermek amacıyla enzimle işaretli konjugat ve enzim substratı kullanılarak renklendirilmesi esasına dayanmaktadır. Yöntem; antijen, antikor ve haptenlerin saptanmasında kullanılan kantitatif bir tekniktir.



ELISA'nın son zamanlarda yaygın olarak kullanılması, monoklonal antikorların yaygınlığına ve hem otoimmün hem de infeksiyöz hastalıklar için birtakım rekombinant spesifik antijenlerin geliştirilmiş olmasına bağlanmaktadır.

ELISA'da kullanılan reaktiflerin uzun ömürlü olmaları, atık maddeleri ile ilgili radyasyon tehlikesi olmaması, basit testler olması, otomatize edilebilmesi ve ticari plak okuyucuları ile bir dakikada değerlendirilebilmeleri bugün laboratuarda kullanılan birçok tekniğe olan üstünlükleridir. ELISA'nın laboratuarda çok fazla örnekle çalışma imkanı verdiği gibi analizlerin kısa sürede sonuçlanması gibi üstünlükleri de vardır. Hepatit, AIDS, kızamık gibi hastalıkların, hormonlar, kanser markerleri, hematolojik ve bakteriyolojik determinantların tanısında ve birçok klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır.

### **ELISA Bileşenleri**

Genel olarak 6 farklı ELISA protokolünden bahsedilebilir. Yarışmacı olan (kompetitif) ve olmayan ELISA testleri vardır. Yarışmacı ELISA genellikle antijen varlığını göstermek için kullanılır. Aranılan antijene özgül antikor katı faza bağlanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve test edilecek antijen (klinik örnek) katı fazdaki antikora aynı zamanda eklenir ve her iki antijenin de antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması amacıyla inkübe edilir. İnkübasyondan sonra yıkanarak bağlanmamış antijenler uzaklaştırılır ve enzim substratı konarak inkübe edilir. Bağlanmış enzim substratla reaksiyona girerek renk oluşturur, spektrofotometrede absorbans okunur. Substratın hidroliz miktarı, örnekteki antijen miktarı ile ters orantılıdır. Yani sonuçta renk değişikliği olmazsa bu klinik örnekte antijen varlığını gösterir .

Bütün ELISA testleri kompleks, birden fazla içeriği olan sistemlerden oluştuğundan ve bu içeriklerin duyarlı ve kesin sonuçlar alınmasını direkt etkilemelerinden dolayı, test parametrelerinin ve içeriklerinin dikkatlice seçilmesi gerekmektedir.

i. Katı faz

İmmünreaktiflerin antijen ya da antikorun bağlandığı katı faz, daha sonra oluşacak olan antijen-antikor reaksiyonlarının kendine bağlı kalmasını sağlar. Katı faza bağlanmayı etkileyen faktörler şunlardır; katı fazın yapısı, antijenin fiziksel özellikleri, izoelektrik noktası, kimyasal yapısı, immünreajenlerin konsantrasyonu ve saflığı, kaplama için gerekli ısı ve inkübasyon periyodu, kaplama solüsyonunun iyonik gücü ve pH'dır.

ii. Konjugat

Yönteme bağlı olarak ELISA, enzimle işaretli antijen veya antikor içermelidir. Konjugat kullanılırken antikorun enzimle işaretlenmesi kolay olduğu için daha sıklıkla antikor kullanılır. Klinik immünoloji laboratuvarlarında en yaygın olarak kullanılan enzimler alkaline fosfataz ve horseradish peroksidaz'dır. Bunun dışında  $\beta$  galaktosidaz, glukoz oksidaz, üreaz, karbonik anhidraz, lizozim, glukoz-6 fosfat dehidrogenaz enzim olarak kullanılabilir.

iii. Substrat

Substrat, enzimle reaksiyona giren ve böylece renk değişikliğine uğrayan maddedir. Kullanılan enzime bağlı olarak kullanılan substrat, floresan, radyoaktif, kemilüminesans, kromojenik karakterli olabilir. Substrat enzime spesifiktir. Öncelikle substrattan ölçülebilir ve çözünür bir reaksiyon ürünü oluşmalıdır. Bu ürün renkli olup gözle ya da spektrofotometre ile tespit edilebilir. En yaygın kullanılan substratlar O-fenilendiamin (OPD), 5-aminosalisilik asit, Azido-benzo-thiazolidin-sülfat (ABTS), 3-3', 5-5' Tetrametilbenzidin (TMB), alfa-naftol ve toluidin'dir.

<u>Elisa Protokolleri</u>	<u>Kullanımları</u>	<u>Gerekli Kimyasallar</u>	<u>Yorumlar</u>
İndirekt	Antikor aramada	Antijen saf veya yarı saf:antikor içeren test solüsyonu;immunize örneklerde İgG yi bağlayan enzim konjugatı	Önceden varolan spesifik antikorların kullanımına gerek duyulmaz; relatif olarak fazla miktarda antijen gerektirir.
Direkt Kompetitif	Antijen aramada; çözünür antijeni saptama	Antijen saf veya yarı saf; antijen içeren test solüsyonu; spesifik antijen için enzim-antikor konjugatı	Sadece iki basamaktan oluşan bu hızlı test; antijenik çapraz reaksiyonu ölçmede çok başarılı
Antikor Yöntemi	Sandviç Antijen aramada; çözünür antijeni saptamada	Antikor yakalama(capture) (saf veya yarı spesifik antikor); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	En hassas antijen testi; relatif olarak fazla miktarda saf veya yarı saf antikor gerektirir.
Çift Antikor Yöntemi	Sandviç Antikor arama	Antikor yakalama(capture) (immunize örneklerde İg için spesifik); antijen içeren test solüsyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Saflaştırılmış antijen gerektirmez; beş basamaklı relatif olarak uzun bir testtir.
Direkt Hücresel Yöntem	Antijen eksprese eden hücrelerin aranmasında; hücresel antijen ekspresyonunun ölçülmesi	İlgili antijeni eksprese eden hücreler; hücresel antijeni için spesifik enzim-antikor konjugatı	Fazla miktarda taramalarda hassas bir testtir. heterojen hücre gruplarında hassas değildir.
İndirekt Yöntem	Hücresel Hücresel antijenlere karşı oluşan antikorların aranmasında	İmmünizasyonda kullanılan hücreler, antikor içeren test solüsyonları; immunize örneklerde İg bağlayan enzim konjugatı	Düşük miktarda eksprese edilen hücresel antijenler için spesifik antikorları saptamayabilir.

Tablo 7: Elisa protokolleri

## ELISA Prokolleri

Antijen ve antikor bağlanması özgül olduğu için örnekte aranılan antijen ya da antikorların varlığı, miktarı ve cinsi kendileri için özgül olan antijen ya da antikorlar kullanılarak saptanabilir. Değişik şekilde tanımlanan ELISA yöntemleri bulunmaktadır.

### Direkt ELISA

Direkt ELISA non kompetatif yöntemin en basit formudur. Antijen katı faza pasif absorsiyon ile bağlandıktan sonra enzimle işaretli antikor eklenir. Bağlı olan ve olmayan reaktifler birbirinden yıkama işlemi ile fiziksel olarak ayrılmaktadır. Yıkama safhasının ardından substrat eklenerek renk değişimi izlenir. Bu yöntem ölçülecek her antijen için enzimle işaretli spesifik antikor gerektirir. Bu da birçok farklı antijenin saptanması gereken durumlarda sorun oluşturur.

### İndirekt ELISA

İndirekt yöntem antikor saptanmasında ve ölçümünde kullanılan en basit yöntemdir. En önemli avantajı direkt yöntemde olduğu gibi her antijen için enzimle işaretli spesifik antikor gerektirmemesidir. Tek bir işaretli antiglobulin ile çok sayıda farklı antijen test edilebilir. İndirekt yöntemden insan ve hayvan infeksiyonlarında, antikor ölçümünde geniş anlamda yararlanılmaktadır. İndirekt yöntemde antijen aramaya yönelik testlerde çeşitli modifikasyonlar vardır.

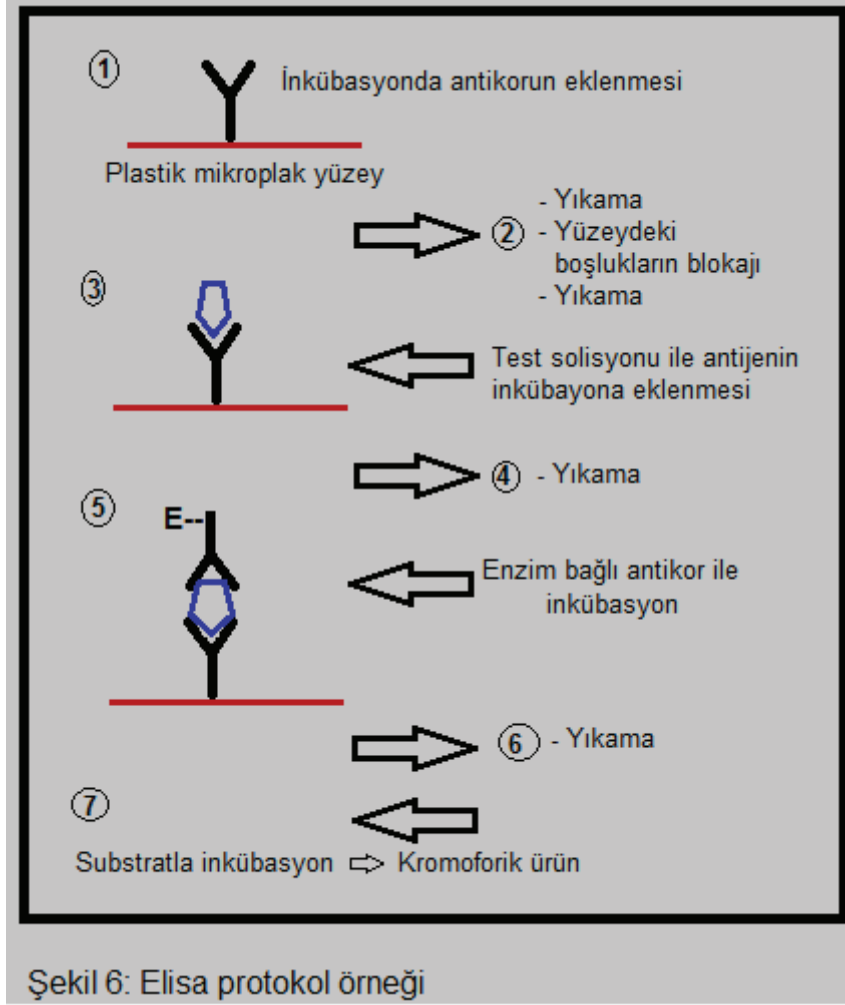
#### i. Sandviç Yöntem

ELISA yöntemlerinden en çok kullanılan sandviç yöntemidir. Katı faz antijene karşı oluşmuş antikor ile kaplanır. İncelenecek örnek eklenir. İnkübasyon sırasında örnekte, katı fazdaki antikora spesifik antijen varsa solid faza bağlanır

ve yıkanır. Daha sonra antijene spesifik antikorlar eklenir. Serbest antikorlar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra 2. antikorun hazırlandığı türe spesifik enzimle işaretli antikorlar eklenir. Son olarak enzim substratı eklenerek renk değişimi izlenir. Oluşan rengin şiddeti antijen miktarı ile doğru orantılıdır.

## ii. Kompetitif ELISA

ELISA testinde, antijen varlığını gösterebilmek için aranan antijene özgül antikor katı faza bağlanmıştır. Enzimle işaretli antijen ve antijen içerdiği düşünülen klinik örnek katı faza bağlı antikora aynı anda eklenir ve her iki antijenin antikordaki bağlanma bölgeleri için yarışması amacıyla inkübe edilir. Eğer enzimle işaretli antijen katı fazdaki antikora bağlanmışsa yıkama işleminden sonra eklenen substrat hidrolize olarak renk değişikliğine yol açar. Ancak klinik örnekte aranılan antijen mevcutsa katı fazdaki özgül antikora bu antijen bağlanacağından pozitif sonuç renk değişikliğinin olmaması ile ortaya çıkar. Bu tip yöntemler yüksek konsantrasyondaki antijenlerin ölçümünde ve ayrıca antikorlar için tek bir bağlanma bölgesi bulunan hormonların tespitinde kullanılır. Kolay, hızlı ve inkübasyon sayısı azalmış bir testtir. Nonkompetatif yöntem ile kıyaslandığında, kompetatif yöntem daha spesifiktir.



Çalışmaya başlamadan önce  $-40^{\circ}\text{C}$  de saklanan örnekler oda ısısına gelene kadar bekletilmiştir. Karşılaştırmalı ADMA ELİSA mikrotiter plate formatını kullanır. ADMA mikrotiter platin solit fazına bağlıdır. Örneklerdeki ADMA Acylation Reagent kullanılarak Acyle hale getirilmiştir. Solit faz bağlı ADMA ile yarışmaya katılır. Fare Anti-ADMA Anti-serum bağlayan alanların fixe edilmesi için Solit faz bağlı ADMA ile yarışmaya katılır. Sistem dengeye ulaştığında serbest antijen ve serbest antijen antiserum kompleksleri yıkma prosesleri ile uzaklaştırılmıştır. Solit faz ADMA ya bağlı antibody antirabbit-peroksidaz ile tespit edilmiştir. Substrat TMB /peroksidaz reaksiyonu  $450\text{ nm}$  de okunmuştur. Solit faz ADMA ya bağlı antibody miktarı örneğin ADMA konsantrasyonu ile orantılıdır. Örnekteki ADMA konsantrasyonunun tespiti için,

hazırlanmış “kalibrasyon eğrisi” kullanılmış olup sonuçlar mililitrede nanogram (ng/mL) olarak ifade edilmiştir.

### **3.4. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME**

I. Rutin Histolojik inceleme: H+E.

II . TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Yöntemi.

Apoptozis rutin histolojik teknikler ile gösterilebilir. HE boyama yöntemi son zamanlarda apoptozisi tespit etmede daha hassas yöntemlerle birleştirilmiştir. Bu yöntemlerin başında TUNEL yöntemi gelmektedir. Apoptozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) tekniğinden yararlanılmış; deneylerde Oncogene Research Products, San Diego, Kaliforniya, ABD firmasının QIA 33 (kolorimetrik) katalog numaralı DNA fragmantasyonu tespit kitleri kullanılmıştır.

#### **TUNEL Yöntemi İle Işık Mikroskobisinde Kolorimetrik**

İnceleme: Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz onjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile ters boyama yapılarak işlem sonlandırılır.

TUNEL boyama protokolü:

Lamlar, gece boyu (12saat) 37°C'lik etüvde bekletildikten sonra

deparafinizasyona alındı. Bu amaç ile;

Deparafinizasyon ve rehidratasyon:

1. Oda ısısında 15 dakika ksilene daldırıldı. Taze ksilen kullanarak 2. kez 15 dakika inkübe edildi.

2. Oda ısısında 5 dakika %100 etanole daldırıldı. Taze etanol kullanarak 2. kez 5 dakika inkübe edildi.

3. Oda ısısında 5 dakika %90 etanole daldırıldı.

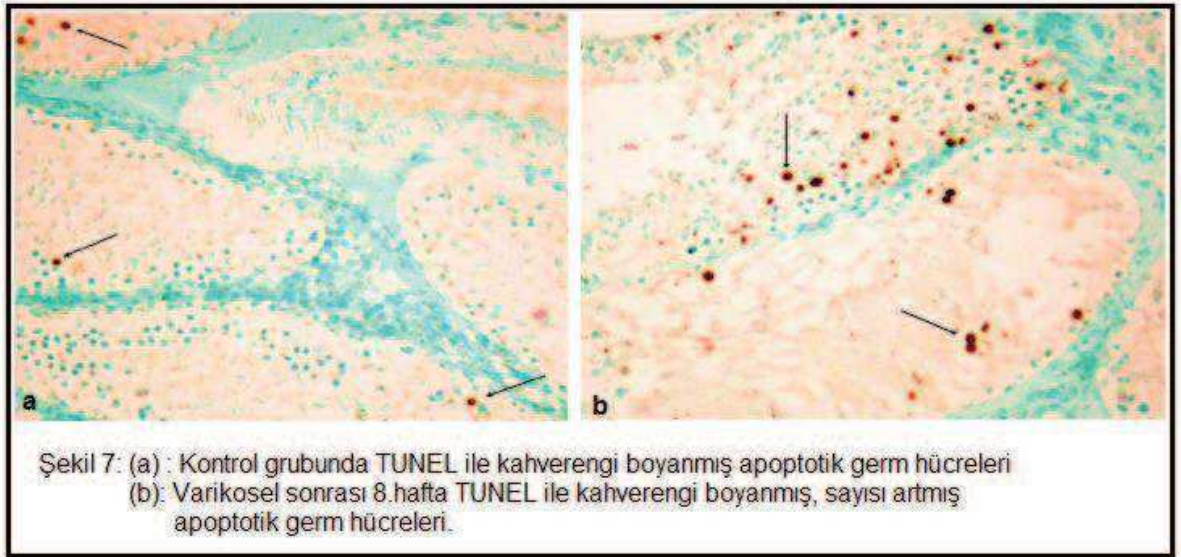
4. Oda ısısında 5 dakika %80 etanole daldırıldı.

5. Oda ısısında 5 dakika %70 etanole daldırıldı.

6. Kısaca 1XTBS(Tris buffer saline) ile durulandı ve spesimenin etrafı dikkatle kurulandı.

Spesimenin geçirgenliğini arttırmak amacıyla;

2 mg/ml proteinaz K 10 mM Tris PH8 içinde 1: 100 dilüe edildi.( Lam başına 2mg/ml Protenaz K'nın 1 mikrol 'si 10mM Tris'in 99mikrol'sine eklenerek karıştırıldı.)





## 4. BULGULAR

Oksidan stres artışına bağlı olarak, primer antioksidan özellikteki enzim olan (SOD) değerleri 3 grupta incelendi ve tüm grupların ikili karşılaştırmalarında istatistiksel anlamlı derecede fark saptandı ( $p=0.0002$ ). Buda artmış oksidatif strese yanıt olarak ortaya çıkmıştır.

	Ortalama	Standart sapma	Median değer
<b>Kontrol</b>	38.92	$\pm 37.53$	37.53
<b>Sham</b>	49.22	$\pm 2.99$	50.72
<b>Deney</b>	54.68	$\pm 0.35$	54.67

Tablo 1 : Gruplara göre dokuda ölçülen SOD değerleri (Ü /gr.yaş doku)

$$KW-x^2 = 17,37 \text{ ve } P=0,0002$$

	Ortalama değer	Standar sapma	Median değer
<b>Deney</b>	2,06	1,1	2,4
<b>Sham</b>	0,75	0,14	0,77
<b>Kontrol</b>	0,69	0,08	0,69

Tablo 2 : Gruplara göre kan örneklerinde ölçülen ADMA değerleri (ng/ml)

Bu sonuçlar ; ADMA değerlerinin varikozel deney grubunda sham ve kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu tespit edilmiştir (p: 0,004).Sham grubunda kontrol grubundan daha yüksek miktarda ADMA düzeylerine rastlanmıştır. Buda bize oksidatif stres yaratan cerrahi işlemlerinde ADMA düzeylerini yükseltebileceğini göstermektedir.

NO son ürünü olarak tespit edilebilen nitrit /nitrat düzeyleri hem testis dokusunda hem de plazmada saptandı.

	<b>Ortalama</b>	<b>Standart sapma</b>	<b>Median değer</b>
<b>Kontrol</b>	0.45	$\pm 0.04$	0.44
<b>Sham</b>	0.33	$\pm 0.06$	0.35
<b>Deney</b>	0.28	$\pm 0.02$	0.28

Tablo 3 : Gruplara göre dokuda ölçülen nitrit/nitrat değerleri ( $\mu\text{mol/g}$ )

$$KW-x^2 = 16,06 \text{ ve } P=0,0003$$

	<b>Ortalama</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	<b>Standart sapma</b>	<b>Median değer</b>
<b>Kontrol</b>	31.72	$\pm 2.36$	31.02
<b>Sham</b>	21.28	$\pm 3.16$	21.64
<b>Deney</b>	16.86	$\pm 0.57$	16.69

Tablo 4 : Gruplara göre plazmada ölçülen nitrit/nitrat değerleri

$$KW-x^2 = 16,05 \text{ ve } P=0,0003$$

Bu sonuçlara göre dokudaki NO son ürünü olan tuzlar deney grubunda ve sham grubunda kontrol grubundan istatistiksel olarak düşük bulunmuştur (p= 0.0003). Bu düşüklüğün sorumlusu ortamdaki bulunan eNOS inhibisyonu olduğu düşünülmektedir.

Plasma nitrit /nitrat düzeyleri tayini sonucu olarak elde ettiğimiz veriler tabloda verilmiştir. Bu sonuçlarda plasma değerleri en düşük deney grubunda saptanmış daha sonra sham grubu ve en yüksek değer kontrol grubunda olmuştur ve tüm gruplar arası fark bulunmuştur (p= 0.0003).

	Kontrol		Sham		Deney		p
	ORT	SS	ORT	SS	ORT	SS	
Doku nitrat	0,45	0,04	0,33	0,06	0,28	0,02	0,0003
Plazma nitrat	31,72	2,36	21,28	3,16	16,86	0,57	0,0003
SOD	38,92	4,76	49,22	2,99	54,68	0,35	0,0002
ADMA	0,69	0,08	0,75	0,14	2,06	1,1	0,004

Tablo 5. Verilerin toplu gösterimi

## 5. TARTIŞMA

Varikoselde ana sorun genişlemiş olan damarlar nedeniyle testiküler kan akımının bozulmasıdır.Yani pleksus pampiniformisde endotelial disfonksiyon gelişmesidir.Endotelial disfonksiyon gelişmesindeki en önemli faktörler:oksidatif stres, bozulmuş endotelial bağımlı vazodilatasyon,azalmış nitrik oksit sentezi ve salınması,anormal vazokonstrüksiyon,dimetil arjinin düzeyinin artmış olmasıdır.Son yıllarda yapılan çalışmalar vasküler patolojilerde nitrik oksit sentezini inhibe etmek suretiyle etki gösteren ve endojen olarak salınan asimetrik dimetil arjinin önemini ortaya koymuştur.

Varikoselli hastalarda oksidatif stresin göstergesi malondialdehit (MDA) ve süper oksit dismutaz (SOD) seviyelerinde artış gösterilmiştir (133). Varikoselde internal spermatik vende oksidatif stresin ve antioksidan enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür. Antioksidan enzim aktivitesinin artması, serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkilerini dengelemeye yönelik bir cevap olabilir (134).

Özbek ve arkadaşları İnfertilite nedeniyle üroloji polikliniğine başvuran 15 varikoselli hasta (25-36 yaş arası) ve 12 fertil normal hasta (24-36 yaş arası) nın spermlerini seminal plazmadan ayrılmasından sonra enzimatik metotla glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Hasta grubun preoperatif değerleri kontrol grubuna göre düşük bulunurken ( $p<0.05$ ), post operatif değerlerleri ile kontrol grubu arasında belirgin bir fark bulamamışlardır. ( $p>0.05$ ). Sonuç olarak Özbek ve arkadaşları bu çalışma ile varikoselli hastaların seminal sıvısındaki azalmış antioksidan enzim aktivitesinin (AOE) bu hastalardaki sperm disfonksiyonundan sorumlu olabileceğini ve operasyon sonrası bu değerlerin normale gelebileceğini söylemişlerdir(135).

Aitken RJ ve arkadaşları Serbest oksijen radikallerinin infertiliteye olan etkilerini araştırmışlar. SOR artışının sperm fonksiyonlarını, dolayısıyla fertilizasyon oranlarını olumsuz etkilediğini bildirmiştir(136).

Bizim çalışmamızda SOD doku düzeyinde bakılmış olup, anlamlı derecede varikozel deney grubunda sham ve kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (p: 0,0002). Aynı zamanda sham grubundada kontrol grubuna göre SOD düzeyleri yüksek bulunmuştur. Varikozel oluşturulmuş ratlarda testiküler dokuda antioksidan kapasitesindeki aktiviteyi göstermektedir.

NO doku ve plazma düzeylerine baktığımızda varikozel grubunda anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p: 0,0003). Bu düşüşün nedeni olarak NOS inhibitörü olan ADMA' nın düzeylerine baktık.

Vallance ve ark, 1992 yılında ADMA ve L-NMMA' nın insan plazma ve idrarında bulunduğunu ve NOS'un yarışmacı endojen inhibitörleri olarak davrandıklarını rapor ettiler (86). L-NMMA' nın insan plazmasında çok az bulunduğu ve NOS aktivitesi üzerinde etkisi bulunmadığı için ADMA, NOS aktivitesini inhibe eden asıl endojen üretimi metillenmiş arjinin olduğu düşünüldü. (82,83). ADMA her üç NOS izoformunu inhibe etmektedir. İn vitro çalışmalarda fizyolojik olarak uygun ölçüde ADMA seviyesinin NOS'u önemli oranda inhibe ettiği ve sonrasında kültürdeki endotel hücreleri (ECs) ve izole insan kan damarlarında NO üretimini azalttığı gösterilmiştir (87,88,89). Normal farelerde ADMA uygulaması renal vasküler direnci ve kan basıncının (KB) artışına neden olur (90,91). Ayrıca, ADMA konsantrasyonları belirgin olarak artmış böbrek yetmezliği olan hastaların plazması, (ECs) kültüründe NO üretimini önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (92). Bu gözlemler, ADMA'nın in vivo ortamda yapılacak bir biyolojik çalışmaya bizi telkin etmektedir.

ADMA, NO sentezinde endojenik bir inhibitör olarak rol oynar. Kan damarlarında, NO kan akımını arttırmak için vasküler düz kasları gevşetir ve vasküler hastalıkla ilişkili olayları ( lökosit adhezyonu, platelet agregasyonu ve vasküler düz kas proliferasyonu) bastırır(60). NO aynı zamanda anjiogeneze aracılık ettiği için vasküler rejenerasyonda önemlidir(61,62). Sonuç olarak, ADMA'nın endojenik NOS inhibitörü olarak vasküler hastalıklarla bağlantılı olması muhtemeldir.

Hiperkolesterolemi, insülin rezistansı, diabetes mellitus, hipertansiyon ve kronik renal yetmezlikte bulunan kişilerin serum ADMA düzeylerinde artış vardır(63). Bu durumlar DDAH aktivitesini bozan vasküler oksidatif stres durumları ile ilişkidir(64). İnsanlarda , ADMA sistemik ve renal venlerin direncinde artışa, vasküler kompliansta azalmaya, serebral kan akımında azalmaya, sodyum retansiyonunda artışa, kardiyak outputta azalmaya neden olur(65,66,67). Ayrıca serum ADMA düzeyi ile son dönem renal yetmezlik ve genel popülasyonun her ikisinde bulunan karotid arterdeki anormal incelleme arasında korelasyon tespit edilmiştir(68,69). Son dönem renal yetmezlikte, serum ADMA'sı aynı zamanda ventriküler hipertrofi ile de korelasyon gösterir(70). Vasküler fonksiyonda ve yapıda ki patolojik değişiklikler seçilmiş hasta gruplarında ADMA düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur(71,72,73).

Endotel tüm vücutta vasküler laminayı kaplayan tek katlı yüzeyel hücrelerdir. Vasküler tonus, geçirgenlik, platelet agregasyonu, enflamasyon ve düz kas proliferasyonu gibi vasküler fonksiyonların temel regülatörü olarak tanımlanmıştır (77,78). Endotelial disfonksiyonun tanımı, endotelial tabakanın organ fonksiyonunun korunması için gerekli olan karakteristik özelliklerini kaybetmesi olarak tanımlanmıştır (77,78). Endotelial disfonksiyon aterosklerozun inisiasyon ve progresyonunda anahtar faktör ve hipertansiyon, diabetes mellitus, dislipidemi, obezite, sigara ve/veya KBH gibi durumları da kapsayan kardiovasküler risklerin artmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. (77,78). Endotelial disfonksiyon NO'nun üretim ve/veya biyoyararlanımının azalması ile karakterizedir. Bundan başka, endotelial hücre hasarının kendisinin de biyolojik NO aktivitesini azalttığı, kısır döngü oluşturarak aterosklerozun gelişim ve progresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (79,80). Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun artması NO yetersizliğine neden olmaktadır (ROS) (80) ; NOS'un önemli kofaktörü olan tetrahidrobiopterinin (BH4) azalması (81) ; L-arjininin biyoyararlanımının azalması; ve/veya ADMA gibi endojenik NOS inhibitörlerinin artması (82,83) indükleyebilir. Bunların arasında endotelial disfonksiyonda ADMA'nın rolünün daha fazla olduğu düşünülüyor (84).

Yukarıda da belirtildiği gibi pek çok çalışmada serumda artan ADMA düzeyleri endotelial disfonksiyon riski için bir marker olmaktadır. Bizim çalışmamızda da varikozel oluşturulan deney grubunda hem SHAM grubuna hem de kontrollere göre ADMA düzeylerinde anlamlı artış saptanmıştır. Bu göstermektedir ki varikozel ADMA düzeylerini arttıran dolayısıyla da endotelial disfonksiyon için risk oluşturan bir durumdur.

Varikozel modelinde istatistiksel olarak anlamlı derecede ADMA seviyelerinin artması, doku ve plazma NO seviyelerinin azalması varikozelli bireylerde görülen infertilite ile ilişkilendirilebilir. İnfertilitesi bulunan olgularda endotelial disfonksiyonun bir göstergesi olarak ADMA'nın rolünü gösteren daha geniş serilerde yapılacak prospektif çalışmalara ışık tutması açısından çalışmamız oldukça değer taşımaktadır.

Çalışmamızda varikozel modelinde kontrol ve SHAM grubuna göre ADMA ve SOD seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artış saptanırken doku nitrat, plazma nitrat varikozel modelinde SHAM ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptanmıştır. Doku ve plazma nitrat düzeylerindeki düşüş endotelial disfonksiyonun önemli bir göstergesidir. Çalışmamız varikozelin endotelial disfonksiyonla ilişkisini kanıtlamaktadır. Dolayısıyla varikozel infertilite için önemli bir risk faktörüdür. Çalışmamıza popülasyonumuzun az olması göz önüne alındığında ADMA'nın varikozelli vakalarda infertilite ile ilişkili olduğunu gösterecek daha geniş prospektif çalışmalara ihtiyaç duyulacağı aşikardır.

Pek çok çalışmada vasküler hastalıklarda ve erektil disfonksiyonda NO yolunda benzer patolojik süreçler bulunduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamızda da varikozelde artmış ADMA düzeylerinin, azalmış doku ve plazma NO düzeyinin gösterilmesi dolayısıyla endotelial disfonksiyonun gösterilmesi bu gerçeği destekler niteliktedir.

Son 10 yılda çok sayıda çalışma serum ADMA konsantrasyonunu etkileyen pek çok faktör demonstre edilmiştir. Bunlar arasında Hiperlipidemi, Diyabetes Mellitus, Hipertansiyon, periferik arter hastalığı, Stroke, Hiperhomosisteinemi gibi hastalıklar bulunmaktadır. Bu hastalıkların tedavisinde kullanılan Rosuvastatin, Metformin, Rosiglitazon, ACE inhibitörleri gibi ilaçlar

serum ADMA seviyelerini arttırmaktadırlar. Artmış ADMA konsantrasyonları Diyabetes Mellitus, Hiperlipidemi, Hipertansiyon, Stroke gibi endotelial disfonksiyon için iyi demonstre edilmiş bir risk faktörü olarak kabul görmüştür. Pek çok çalışmada Endojen ADMA'nın endotelial disfonksiyon için iyi bir indikatör olduğu ve Kronik Böbrek Yetmezliği ile de ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

Endojen ADMA endotelial disfonksiyon için bir indikatördür. Bu bağlamda varikoselli, infertilitesi olan hastalarda serum ADMA düzeyleri bir marker olarak kullanılabilir. Çalışmamızda ADMA artışının ortaya konmuş olması bunu desteklemektedir.

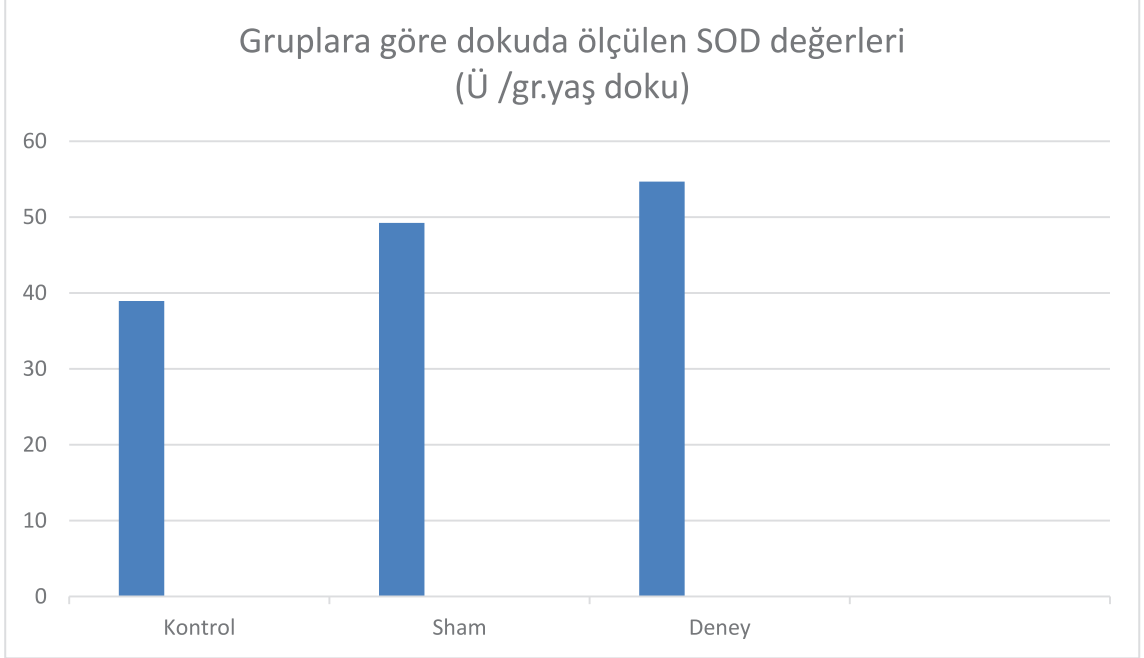
Serum ADMA seviyeleri venöz staz oluşturulan deney grubunda SHAM grubu ve kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Çalışma popülasyonumuzun küçük sayıda olmasına rağmen varikoselli farelerde ADMA seviyelerinin SHAM ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olması Varikoselin şiddeti ile ilişkili prediktif bir değer taşıdığını düşündürmektedir. Çalışmamız bunu göstermesi açısından oldukça önem taşımaktadır.

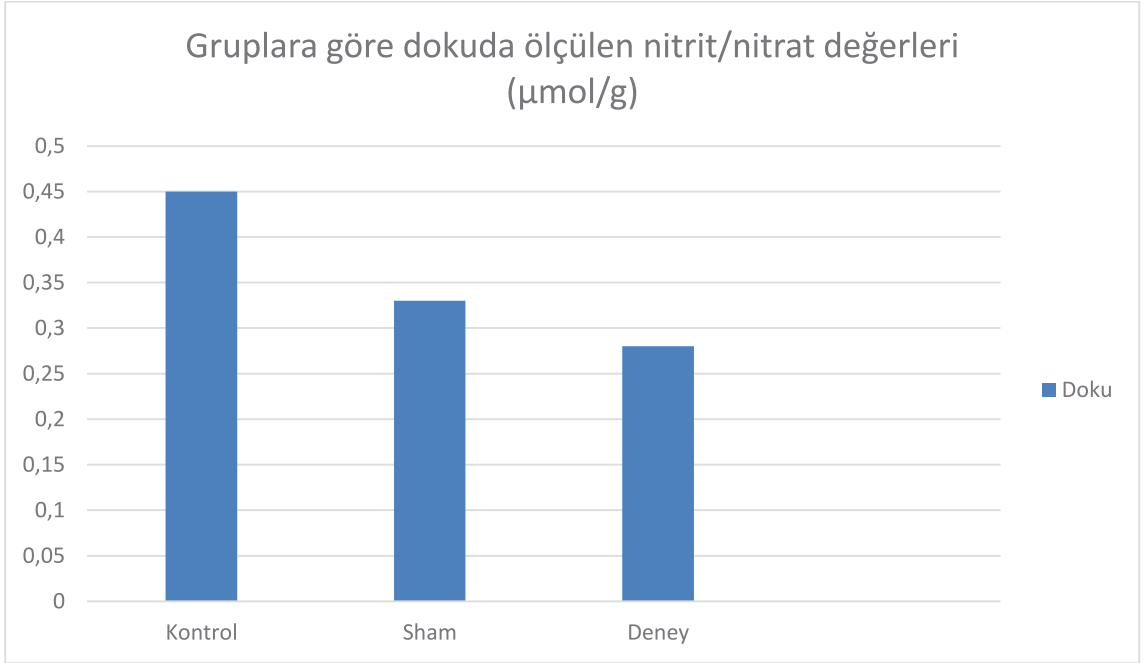
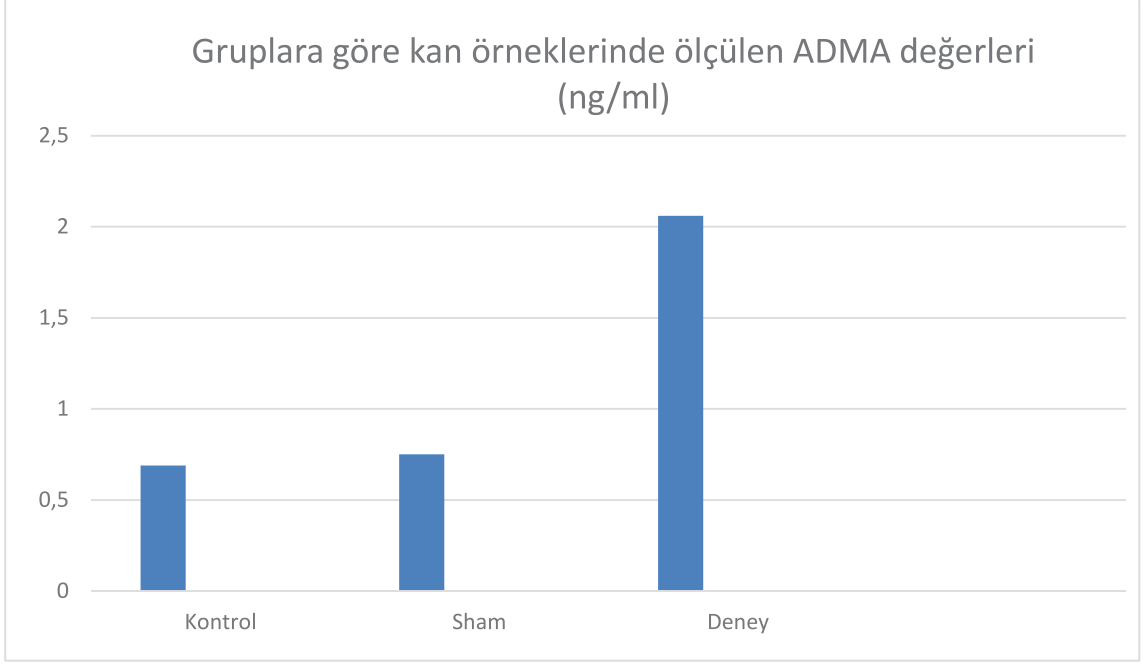
Varikoselin şiddeti, Erektile Disfonksiyon ve İnfertilite için prediktif bir değer taşımaktadır. Bunu destekleyen daha geniş vaka serili prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.



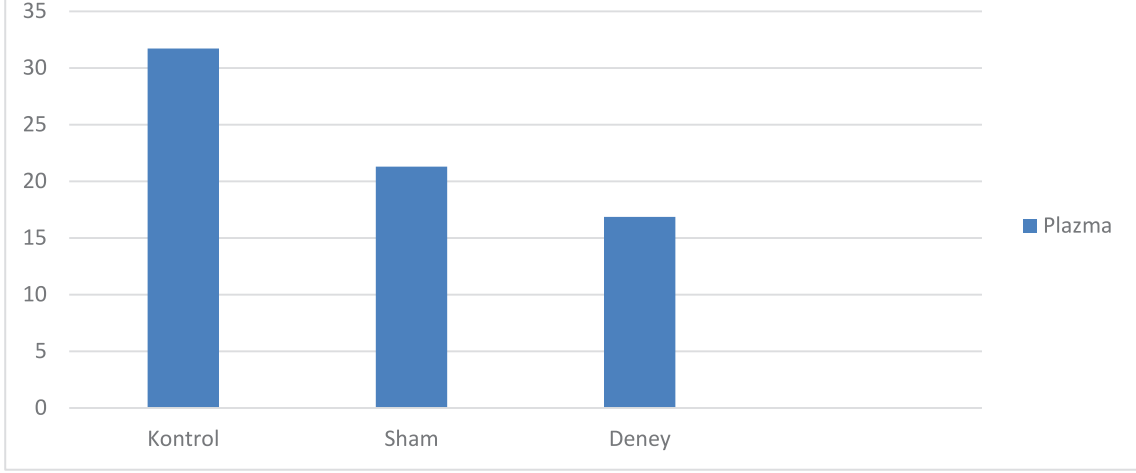
## SONUÇLAR

1. Serum ADMA düzeyleri deney grubunda SHAM grubuna ve kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
2. Doku-plazma Nitrat ve SOD değerleri deney grubunda SHAM ve kontrol grubunda anlamlı derecede düşük bulunmuştur.
3. ADMA seviyelerinin artması varikozel de endotelial disfonksiyonun önemli bir göstergesidir.
4. ADMA geleneksel risk faktörleri (Hiperlipidemi, Hipertansiyon, Diyabetes Mellitus) endotelial disfonksiyon için iyi demonstre edilmiş bir risk faktörüdür.
5. Çalışmamız; Varikozelli bireylerde görülen infertilitenin ADMA ile ilişkisini ortaya koyma açısından büyük önem taşımaktadır. Bunu destekleyecek geniş serilerde prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.





## Gruplara göre plazmada ölçülen nitrit/nitrat değerleri



## KAYNAKLAR

1. AHLBERG NE, BARTLEY O.(1996). Right and left gonadal veins: Anatomical and statistical study.Acta Radiol Diag. 4: 593-601.
2. SAYPOL DC.(1981).Varicocele.J Androl.2: 61-67.
3. JAROW JP. (2001). Effects of varicocele on male infertility. Hum Reprod Update; 7 1:59-64.
- 4.WALSH PC, RETİK AB, VAUGH ED, WEİN AJ, ED.(1997). Campbell's Urology. Saunders,: 1317-8.
5. KADIOĞLU A, ÇAYAN S, AYDOS K, AŞÇI R, ALICI B.(2004) Türk Androloji Derneği Yayınları Varikosel Kılavuzu. İstanbul; 1-15.
6. JAROW JP, OGLE SR, ESKEW LA.( 1996). Seminal improvement following repair of ultrasound detected subclinical varicoceles. J Urol; 155:1287-1290.
7. GORELİCK JI, GOLDSTEİN M.( 1993). Loss of fertility in men with varicocele. Fertil Steril;59:613-616.
8. GRİLLO-LOPEZ AJ.( 1971). Primary right varicocele. J Urol; 105:540-541.
9. COOLSAET BL.( 1980). The varicocele syndrome: Venography determining the optimal level for surgical managment. J Urol; 124:833-839.
10. DRAKE RL, VOGL W, MİTCHELL AWM.( 2005). Pelvis and Perineum. In: Drake RL, Vogl W, Mitchell AWM, ed. Gray's Anatomy for Students. Philadelphia. Elsevier Inc,: 363-465.

11. HİNMAN FJ.( 1993). Testis. Hinman FJ ed. Atlas of Urosurgical Anatomy. Philadelphia. W.B.Saunders Company: 471-503.
12. GOLUBOFF ET, CHANG DT, KIRSCH AJ, FİSCH H(1994).İncidence of external spermatic veins in patients undergoing inguinal varicocelelectomy. Urology.44: 6-12.
13. KENDİRİCİ M, MİROĞLU C.( 2004). Varikosel patofizyolojisi."erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi"(Editörler: Kadioğlu A,Çayan S,Semerci B ve ark).Türk Androloji Derneği yayını, İstanbul, ,sayfa 427-446.
14. FRETZ PC, SANDLOW JI.( 2002). Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. Urol Clin North Am;29(4):921-937
15. ÇAYAN S,KADIOĞLU A,ORHAN I,KANDIRALI E,TEFEKLİ A,TELLALOĞLU S. ( 1999) The effect of microsurgical varicocelelectomy on serum follicle stimulating hormone, testosterone and free testosterone levels in infertile men with varicocele. BJU Int;84(9):1046-1049.
16. KÖKSAL İT, TEFEKLİ A,USTA M,EROL H,ABBASOĞLU S,KADIOĞLU A.( 2000) The role of reactive oxygen species in dysfunction associated with varicocele. BJU Int;86:549-552.
17. ÇAM K,ŞİMŞEK F,YÜKSEL M,TÜRKERİ L,HAKLAR G,YALÇIN S,AKDAŞ A. (2004). The role reactive oxygen species and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vitamin E treatment. Int J Androl;27(4):228-233.
18. AŞÇI R,SARIKAYA Ş, BÜYÜKALPELLİ R,YILMAZ AF, YILDIZ S.( 1999). The effects of experimental varicocele on testicular histology and fertility in monorchic adult rats, BJU Int;83:493-497.

19. TAŞÇI AL, GÜRBÜZ N. (2004). Varikoselin tanısı."Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi"(Editörler: Kadioğlu A,Çayan S,Semerci B ve ark).Türk Androloji Derneği yayını, İstanbul, sayfa 447-457.
20. SHARLİP ID, JARROW JP, BELKER AM, ET AL. (2001). AUA Best practice polcy: Report on Varicocele and infertility.
21. WEİDNER W,COLPİ GM, HARGREAVE TB, ET AL. (2002). EAU Guideline on male infertility. Eur Urol;42:313-322.
22. AYDOS K,BALTACI S,SALİH M,ANAFARTA K, BEDÜK Y,GÜLSOY U.( 1993) Use of color Doppler sonography in the evaluation of varicoceles. Eur Urol;24:221-225.
23. TAŞÇI A,RESİM S,ÇAŞKURLU T,DİNÇEL Ç,BAYRAKTAR Z,GÜRBÜZ G(2001). Color doppler ultrasonography and spectral analysis of venosus flow in diagnosis of varicocele. Eur Urol;40:404-408
24. TEFEKLİ A,ÇAYAN S,ULUOCAK N,POYANLI A,ALP T,KADIOĞLU A.( 2001). Is internal spermatik venography necessary in determining recurrence varicocele after varicocele surgery? Eur Urol;40:404-408.
25. DUBİN L, ALMELAR RD. (1970). Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. Fertil Steril;21:606-609.
26. ÇAYAN S,LEE D,BLACK LD, REİJO PERA RA, TUREK PJ.( 2001). Response to varicocelectomy in oligospermic men with and without defined genetic infertility, Urology;57:530-535.

27. World Health Organization: The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* 1992;1289-1293.
28. DUBIN L, AMELAR D.( 1978). Varicocele. *Urol ClinN Amer.* 5:563-587,.
29. REGE N, PHADKE A, BHATT J.( 1979). Serum gonadotropins and testosterone in infertile patients with varicocele. *Fertil Steril.* 31: 413-419
30. TAKIHARA H, SAKATOKU J, COCKETT A T K.( 1991) The pathophysiology of varicocele in male infertility. *Fertil Steril.* 55: 861-868.
31. ZHONGHUA NAN KE, XUE XU Y, XU QY, YANG BH, ZHU XM, PENG YF. (2008 ). Relationship of nitric and nitric oxide synthase with varicocele infertility. *May;14(5):414-7.*
32. DAVIES MG, FULTON GJ, HAGEN PO.( 1995). Clinical Biology of Nitric Oxide. *Brit. J. Surg* 82: 1598-1610,
33. MONCADA S. (1993). The L-arginin nitric oxide pathway. *NEJ Medicine* 329: 2002-2012.
34. MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA.(1991). Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev* 43: 109-42.
35. HENSLEY K, WILLIAMSON KS, FLOYD RA. (2000). Measurement of 3-Nitrotyrosine and 5-Nitro- $\gamma$ -Tocopherol by High-Performance Liquid Chromatography with electrochemical detection. *Free Radic Biol Med* 28: 520-8.
36. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol rev* 43: 109-42, 1991.

37. SEVEN I, TÜRKÖZKAN N, ÇİMEN B.( 2005). The effects of nitric oxide synthesis on the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in guinea pig kidney exposed to lipopolysaccharides. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 271: 107-112.
38. SASS G, KOERBER K, BANG R, GUEHRING H, TIEGS G.( 2001). Inducible Nitric Oxide Synthase is Critical for Immune-Mediated Liver Injury in Mice. *J. Clin. Invest* 107: 439-447.
39. CUZZOCREA S, RILEY DP, CAPUTÌ AP, SALVEMINI D.( 2001). Antioxidant Therapy: A New Pharmacological Approach in Shock, Inflammation, and Ischemia/Reperfusion Injury. *Pharmacol Rev* 53: 153-159.
40. NATHAN C.( 1994). Nitric oxide and bioprotein; a study in chiaroscuro. *J Clin Invest* 93: 1875-1876.
41. WEINBERGER B, HECK DE, LASKIN DL, LASKIN JD.( 1999). Nitric oxide in the lung: Therapeutic and cellular mechanisms of action. *Pharmacol Ther* 84: 401-411.
42. CUZZOCREA S, REITER RJ.( 2001). Pharmacological Action of Melatonin In Shock, Inflammation And Ischemia/Reperfusion Injury. *Eur. J. Pharm* 426: 1-10.
43. SALERNO L, SORRENTI V, DI GIACOMO C, ROMEO G, SIRACUSA MA.(2002) Progress in the development of selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 8(3): 177-200.
44. XUE Q, DUCSAY CA, LONGO LD, ZHANG L.( 2008). Effect of Long-Term High Altitude Hypoxia on Fetal Pulmonary Vascular Contractility. *J Appl Physiol*, 104(6): 1786-92.



45. MATEJÍKOVA J, KUCHARSKA J, PANEZA D, RAVÍNGEROVA T.( 2008). The effect of antioxidant treatment and NOS inhibition on the incidence of ischaemia induced arrhythmias in the diabetic rat heart. *Physiol*.
46. CALSTRÖM M, BROWN RD, EDLUND J, SALLSTRÖM J, LARSSON E, TEERLÍN T, PALM F, WOHLÍN N, PERSSON AE.( 2008). Role of nitric oxide deficiency in the development of hypertension in hydronephrotic animals. *Am J Physiol Renal Physiol*. Feb;294(2): F362-70.
47. IDE K, WORTHLEY M, ANDERSON T, POVLÍN MJ.( 2008). Effect of systemic administration of the nitric oxide synthase inhibitor L-NMMA on the human ventilatory response to hypoxia. *Adv Exp Med. Biol.* 605:41-5.
48. STRÍCKLETT PK, HUGHES AK, KOHAN DE.( 2006). Endothelin-1 stimulates NO production and inhibits cAMP accumulation in rat inner medullary collecting duct through independent pathways. *Am J Physiol Renal Physiol Jun*; 290(6):F1315- 9.
49. CERVENKA L, KRAMER HJ, MALY J, HELLER J.( 2001). Role of nNOS in regulation of renal function in angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension*, Aug;38(2): 280-5.
50. MATSUMURA N, KÍKUCHÍ-UTSUMÍ K, NAKAKÍ K.(2008) Activities of 7-nitroindazole and (1-(2-(trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) independent of neuronal nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther*, 325(2): 357-62.
51. ABE K, ABE Y, SAÍTO H.( 2008) Agmatin suppresses nitric oxide production in microglia. *Brain Res*, Jul 28; 872 (1-2):141-8.
52. MONSART A, BOLLAERT PE, GIUMMELY P, COPDEVILLE- ATKÍNSON C, ATKÍNSON J.(2006). Effects of dexamethasone and L-canavanine on the intracellular calcium-contraction relation of the rat tail artery during septic shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Sep; 291(3):H 1177-82.

53. LUKACOVA N, DAVIDOVA A, KOLESAR D, KOLESAROVA M, SCHREIBEROVA A, LACKOVA M, KRIZANOVA O, MARSOLA M, MARSALA J.( 2008) The effect of N-nitro-L-arginine and aminoguanidine treatment on changes in constitutive and inducible nitric oxide synthases in the spinal cord after sciatic nerve transection. *Int J Mol Med*, Apr; 21(4): 413-21.
54. WANG LM, TRAN XF, SONG OY, GAO ZM, LUO FW, YANG CM. (2003). Expression and role of inducible nitric oxide synthase in ischemia-reperfusion liver in rats. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, May; 2(2): 252-8.
55. KIELSTEIN A, TSIKAS D, GALLOWAY GP, MENDELSON JE.(2007) Asymmetric dimethylarginine(ADMA) –A modulator of nociception in opiate tolerance and addiction? *Nitric Oxide*
56. ACHAN V, BROADHEAD M, MALAKI M, ET AL.(2003). Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;23:1455–9.
57. KIELSTEIN JT, FROLICH JC, HALLER H, FLISER D.( 2001). ADMA (asymmetric dimethylarginine): an atherosclerotic disease mediating agent in patients with renal disease? *Nephrol Dial Transplant*;16:1742–5.
58. DAYOUB H, ACHAN V, ADIMOOLAM S, ET AL.( 2003). Dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates nitric oxide synthesis: genetic and physiological evidence. *Circulation*;108:3042–7.
59. LEIPER J, NANDI M, TORONDEL B, ET AL.( 2007). Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med*;13:198–203.

60. COOKE JP.(2004). Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation*;109:1813–8.
61. JACOBI J, SYDOW K, VON DG, ET AL.(2005). Overexpression of dimethylarginine dimethylaminohydrolase reduces tissue asymmetric dimethylarginine levels and enhances angiogenesis. *Circulation*;111:1431–8.
62. THUM T, TSİKAS D, STEİN S, ET AL.( 2005). Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *J Am Coll Cardiol*;46:1693–701.
63. KİELSTEİN JT, ZOCCALİ C.(2005). Asymmetric dimethylarginine: a cardiovascular risk factor and a uremic toxin coming of age? *Am J Kidney Dis*;46:186–202.
64. ITO A, TSAO PS, ADİMOOLAM S, ET AL.(1999) Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*;99:3092–5.
65. KİELSTEİN JT, IMPRAİM B, SİMMEİ S, ET AL.( 2004). Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation*;109:172–7.
66. KİELSTEİN JT, DONNERSTAG F, GASPER S, ET AL.( 2006). ADMA increases arterial stiffness and decreases cerebral blood flow in humans. *Stroke*; 37:2024–9.
67. KİELSTEİN JT, SİMMEİ S, BODE-BOGER SM, ET AL.( 2004). Subpressor doğe asymmetric dimethylarginine modulates renal function in humans through nitric oxide synthase inhibition. *Kidney Blood Press Res*; 27:143–7.

68. ZOCCALÌ C, BENEDETTO FA, MAAS R, ET AL.(2002). Asymmetric dimethylarginine, C-reactive protein, and carotid intima-media thickness in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*; 13:490–6.
69. FURUKÌ K, ADACHI H, MATSUOKA H, ET AL.( 2007) Plasma levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) are related to intima-media thickness of the carotid artery An epidemiological study. *Atherosclerosis*;191(1):206–10.
70. ZOCCALÌ C, MALLAMACÌ F, MAAS R, ET AL.( 2002). Left ventricular hypertrophy, cardiac remodeling and asymmetric dimethylarginine (ADMA) in hemodialysis patients. *Kidney Int*;62:339–45.
71. KIELSTEIN JT, BODE-BOGER SM, HESSE G, ET AL.(2005). Asymmetrical dimethylarginine in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*;25:1414–8.
72. SCHNABEL R, BLANKENBERG S, LUBOS E, ET AL.( 2005). Asymmetric dimethylarginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res*;97:e53–9.
73. ZOCCALÌ C, BODE-BOGER S, MALLAMACÌ F, ET AL.(2001) Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*;358:2113–7.
74. GO AS, CHERTOW GM, FAN D, MCCULLOCH CE, HSU CY.(2004) Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.*;351:1296-1305.
75. AMANN K, WANNER C, RITZ E.( 2006). Cross-talk between the kidney and the cardiovascular system. *J Am Soc Nephrol.*;17:2112-2119.

76. SARNAK MJ, LEVEY AS, SCHOOLWERTH AC, ET AL.( 2003). Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation.*;108:2154-2169.
77. DAVIGNON J, GANZ P.( 2004) Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.*;109:III27-III32.
78. DEANFIELD JE, HALCOX JP, RABELINK TJ.( 2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*;115:1285-1295.
79. COOKE JP, DZAU VJ.( 1997). Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. *Annu Rev Med*;48:489-509.
80. MATSUOKA H.( 2001) Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human. *Diabetes Res Clin Pract*;54:S65-S72.
81. UEDA S, MATSUOKA H, MIYAZAKI H, USUI M, OKUDA S, IMAIZUMI T.( 2000) Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in long-term smokers. *J Am Coll Cardiol*;35:71-75.
82. UEDA S, YAMAGISHI S, KANDA Y, OKUDA S. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) may be a missing link between chronic kidney disease (CKD) and cardiovascular disease (CVD). *Nephrology*.
83. BOGER RH.( 2007) The pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr.*;137:1650S-1655S.
84. ZOCCALI C.(2007) The endothelium as a target in renal diseases. *J Nephrol*;20:S39-S44.

85. HIBBS JB JR, VAVRIN Z, TANTOR RR.(1987) L-Arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J Immunol.*;138:550-565.
86. VALLANCE P, LEONE A, CALVER A, COLLIER J, MONCADA S.(1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*;339:572-575.
87. FARACI FM, BRIAN JE JR, HEISTAD DD.(1995) Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol*;269:H1522-H1527.
88. SEGARRA G, MEDINA P, BALLESTER RM, ET AL.(1999) Effects of some guanidino compounds on human cerebral arteries. *Stroke*;30:2206-2210.
89. SEGARRA G, MEDINA P, VILA JM, ET AL.(2001) Inhibition of nitric oxide activity by arginine analogs in human renal arteries. *Am J Hypertens.*;14:1142-1148.
90. GARDINER SM, KEMP PA, BENNETT T, PALMER RM, MONCADA S.(1993) Regional and cardiac haemodynamic effects of NG, NG, dimethyl-L-arginine and their reversibility by vasodilators in conscious rats. *Br J Pharmacol.*;110:1457-1464.
91. JIN JS, D'ALECY LG.(1996). Central and peripheral effects of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthetase inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol*;28:439-446.
92. XIAO S, WAGNER L, SCHMIDT RJ, BAYLIS C.(2001) Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney Int*; 59:1466-1472.

93. POLLOCK JS, FORSTERMANN U, MITCHELL JA, ET AL.(1991) Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A;88:10480-10484.
94. JESERICH M, MUNZEL T, JUST H, DREXLER H.(1992) Reduced plasma L-arginine in hypercholesterolaemia. Lancet; 339:561.
95. CARDOUNEL AJ, CUI H, SAMOUILOV A, ET AL.(2007). Evidence for the pathophysiological role of endogenous methylarginines in regulation of endothelial NO production and vascular function. J Biol Chem; 282:879-887.
96. BOGER RH, SULLIVAN LM, SCHWEDHELM E, ET AL.(2009) Plasma asymmetric dimethylarginine and incidence of cardiovascular disease and death in the community. Circulation; 119:1592-1600.
97. SUDA O, TSUTSUI M, MORISHITA T, ET AL.(2004) Asymmetric dimethylarginine produces vascular lesions in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice: involvement of renin-angiotensin system and oxidative stress. Arterioscler Thromb Vasc Biol; 24:1682-1688.
98. CLOSS EI, BASHA FZ, HABERMEIER A, FORSTERMANN U.(1997). Interference of L-arginine analogues with L-arginine transport mediated by the y<sup>+</sup> carrier hCAT-2B. Nitric Oxide; 1:65-73.
99. BODE-BOGER SM, SCALERA F, KIELSTEIN JT, ET AL.(2006) Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. J Am Soc Nephrol; 17:1128-1134.
100. ACHAN V, BROADHEAD M, MALAKI M, ET AL.(2003) Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is

actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 23:1455-1459.

101. BOGER RH, SYDOW K, BORLAK J, ET AL.( 2000). LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res*; 87:99-105.

102. ANTHONY S, LEIPER J, VALLANCE P.( 2005) Endogenous production of nitric oxide synthase inhibitors. *Vasc Med*; 10:S3-S9.

103. SCEBBA F, DE BASTIANI M, BERNACCHIA G, ANDREUCCI A, GALLI A, PITTO L.(2007) PRMT11: a new Arabidopsis MBD7 protein partner with arginine methyltransferase activity. *Plant J*; 52:210-222.

104. RAWAL N, RAJPUROHIT R, PAIK WK, KIM S.(1994) Purification and characterization of S-adenosylmethionine-protein-arginine N-methyltransferase from rat liver. *Biochem J*; 300:483-489.

105. GHOSH SK, PAIK WK, KIM S.(1988) Purification and molecular identification of two protein methylase I from calf brain: myelin basic protein- and histone-specific enzyme. *J Biol Chem*; 263:19024-19033.

106. GARY JD, CLARKE S.(1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*; 61:65-131.

107. SPOTO B, PARLONGO RM, PARLONGO G, SGRO' E, ZOCCALI C.(2007) The enzymatic machinery for ADMA synthesis and degradation is fully expressed in human adipocytes. *J Nephrol*; 20:554-559.

108. OSANAİ T, SAİTOH M, SASAKİ S, TOMİTA H, MATSUNAGA T, OKUMURA K.



( 2003) Effect of shear stress on asymmetric dimethylarginine release from vascular endothelial cells. *Hypertension*; 42:985-990.

109. OGAWA T, KIMOTO M, SASAOKA K.(1987). Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG, NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem Biophys Res Commun*; 148:671-677.

110. MACALLISTER RJ, FICKLING SA, WHITLEY GS, ET AL.(1994) Metabolism of methylarginines by human vasculature; implications for the regulation of nitric oxide synthesis. *Br J Pharmacol*;112:43-48.

111. KIMOTO M, WHITLEY GS, TSUJI H, ET AL.(1995) Detection of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase in human tissues using a monoclonal antibody. *J Biochem*; 117:237-238.

112. KIMOTO M, MIYATAKE S, SASAGAWA T, ET AL.(1998) Purification, cDNA cloning and expression of human NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Eur J Biochem*; 258:863-868.

113. LEIPER JM, SANTA MARIA J, CHUBB A, ET AL.(1999) Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deaminases. *Biochem J*; 343:209-214.

114. LEIPER J, NANDI M, TORONDEL B, ET AL.(2007) Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med*; 13:198-203.

115. MACALLISTER RJ, PARRY H, KIMOTO M, ET AL.(1996) Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol*.;119:1533-1540.

116. UEDA S, KATO S, MATSUOKA H, ET AL.(2003) Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circ Res*;92:226-233.
117. ITO A, TSAO PS, ADIMOOLAM S, ET AL.(1999) Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation.*;99:3092-3095.
118. MATSUGUMA K, UEDA S, YAMAGISHI S, ET AL.( 2006) Molecular mechanism for elevation of asymmetric dimethylarginine and its role for hypertension in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.*;17:2176-2183.
119. SCHULZ JB, LINDENAU J, SEYFRIED J, DICHGANS J.(2000) Glutathione, Oxidative Stress and Neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*; 267: 4904-11.
120. HALLIWELL B, CROSS CE.(1994) Oxygen-derived Species: Their Relation to Human Disease and Environmental Stress. *Environmental Health Perspectives*; 102(10): 5-12
121. İYİDOĞAN Y, GENÇ S, KOÇAK Y, AKKUŞ E.(2003) Seminal Plazma Superoksid Dismutaz ve Total Antioksidan Düzeylerinin Erkek İnfertilitesine Etkileri. *Türk Üroloji Dergisi*; 29(3): 296-300
122. ÇAKMAK A, ZEYREK D, KÜRKÇÜ R, ATAŞ A, ÇİMEN E, OCAK AR, EREL Ö. (2009) Evaluation of Systematic Oxidant and Antioxidant Status in Amateur Adolescent Athletes. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science*; 29(2): 367-74
123. USMAR VD, WISEMAN H, HALLIWELL B.(1995) Nitric Oxide and Oxygen Radicals: A Question of Balance. *Federation of Biochemical Societies*; 369: 131-5.

124. DRÖGE W.(2002) Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. American Physiological Society; 82: 47-95
125. VALKO M, RHODES CJ, MONCOL J, IZAKOVIĆ M, MAZUR M.(2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact.;160:1-40
126. BARQAWI A, CARUSO A, MEACHAM RB.(2004) Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. J Urol;171(1):501-3.
127. KILINÇ F, KAYASELÇUK F, AYGÜN C, GÜVEL S, EĞİLMEZ T, ÖZKARDEŞ H.(2004) Experimental varicocele induces hypoxia inducible factor-1, vaskular endothelial growth faktör expression and angiogenesis in the rat testis. J Urol;172(3):1188-91
128. LEE JD, JENG SY, LEE TH.( 2006) Increased expression of hypoxia-inducible factor-1 alfa in the internal spermatic vein of patients with varicocele. J Urol;175 (3 Pt 1):1045-8
129. HAANS LC, LAVEN JS, MALI WP, TE VELDE ER, WENSING CJ.(1991) Testis volumes, semen quality, and hormonal patterns in adolescents with and without a varicocele. Fertil Steril; 56(4):731-4.
130. SIGMAN M,JARROW JP.(1997) Ipsilateral testicular hypotrophy is associated with decreased sperm counts in infertile men with varicoceles. J Urol; 158(2):605-7
131. SAKAMOTO H, OGAWA Y, YOSHIDA H.(2008) Relationship between testicular volume and varicocele in patients with infertility. Urology;71(1): 104-9.
132. HENDIN BN, KOLETTIS PN, SHARMA RK, THOMAS AJ, AGRWAL A. (1999) Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen

species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. J Urol;161(6):1831-4.

133. AKYOL O, OZBEK E, UZ E, KOÇAK I.(2001) Malondialdehde level and total superoxide dismutase activitiy in seminal fluid from patieints with varicocele. Clin Exp Med;1(1):67-8.

134. OZBEK E, CENKMEN M, SİMSEK A, TURKOZ Y, SOYLU A, ILBEY YO, BALBAY MD.(2008) Comparison of antioxidant enzyme activity in the internal spermatic vein and branchial veins of patients with infertile varicocele. In Urol Nephrol;40(3):679-83

135. EMİN ÖZBEK, YUSUF TÜRKÖZ, MUSTAFA ÇEKMEN (2000) Varikoselli Hastaların Seminal Sıvısında Preoperatif ve Postoperatif Antioksidan Enzim Aktivitesi Van Tıp Dergisi: 7 (1).

136. AİTKEN RJ, IRVİNE DS, WU FC. (1991). Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. Am J Obstet Gynecol.164(2):542-51