



T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**VARİKOSEL OLUŞTURULAN RATLARDA GERM
HÜCRE APOPTOZİSİNİ ÖNLEYİCİ BİR ALTERNATİF
MEDİKAL TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE ELEKTRON
MİKROSKOBİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Dr. İzzet OĞUZ
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ**

MERSİN – 2007

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**VARİKOSEL OLUŞTURULAN RATLARDA GERM
HÜCRE APOPİTOZİSİNİ ÖNLEYİCİ BİR ALTERNATİF
MEDİKAL TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL VE ELEKTRON
MİKROSKOBİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**Dr. İzzet OĞUZ
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ

**Bu tez, BAP-TF TTB (İO) 2005-4 TU kodlu proje olarak
Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından desteklenmiştir**

MERSİN – 2007

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın **Prof. Dr. Tülin BAYKAL** başta olmak üzere Sayın **Doç. Dr. Banu YILMAZ** ve Sayın **Yrd. Doç. Dr. Ebru BALLI'YA** teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez konusunun seçilmesi, tezin yürütülmesi ve son halini almasına kadar gösterdiği sabrı, teşvikleri ve yardımlarından dolayı tez danışmanım Sayın **Yrd. Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ'A** çok teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi tezin oluşmasında da yükümü paylaşan **Uzm. Dr. Mesut TEK'E**, görüş ve desteklerini esirgemeyen **Doç. Dr. Selahittin ÇAYAN'A**,

Biyokimyasal analizler ve bu konuda her türlü sorunumda bana yardımcı olan **Arş. Gör. Nil DOĞRUER** ve **Doç. Dr. Burak ÇİMEN** hocama,

İstatistiksel analizleri yürüten Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi **İlter HELVACI'YA**,

Tezin her aşamasında yardımları olan **Dr. Leyla BAHAR** ve **Lab. Tek Menekşe DALAY'A**,

İhtisas eğitimi boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatım boyunca daima yanımda olan **sevgili aileme**, her zaman benimle yaşayan **babama** ve tıp fakültesine girdiğim andan beri bana tüm kalbiyle her türlü desteği veren **eşime** teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	5
İNGİLİZCE ÖZET.....	7
GİRİŞ VE AMAÇ.....	9
GENEL BİLGİLER.....	10
Varikosel Epidemiyolojisi.....	10
Varikosel Etiyolojisi.....	10
Varikoselin Patofizyolojisi.....	11
Spermatogenez.....	17
Spermatogonyal faz (Spermatositogenez).....	18
Spermatosit Fazı (Mayoz).....	19
Spermatid Fazı (Spermiyogenez).....	19
Varikoseldeki Histolojik Değişiklikler.....	20
Apopitozun Işık, Elektron Mikroskopik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	22
Elektron Mikroskopik Morfolojik Özellikler.....	23
Işık Mikroskopik Morfolojik Özellikler.....	24
Apopitozun Biyokimyasal Özellikleri.....	25
Apopitozis Mediyatörleri ve Hücre İçi Metabolik Değişiklikler.....	27
Kaspaz Ailesi ve Apopitozdaki Rollerini.....	27
Varikoselde Apopitoz.....	30
Reaktif Oksijen Radikalleri ve Apopitoz.....	31
PARP (Poli ADP-Riboz Polimeraz).....	32
PARP İnhibisyonu ve Apopitoza Etkisi.....	33
GEREÇ VE YÖNTEMLER	35
Deney Gruplarının Oluşturulması	35
Deneysel Varikosel Protokolü ve Testis Eksizyonu.....	35
Biyokimya Protokolü.....	37
Işık Mikroskopik Doku Takip ve İnceleme Protokolü.....	38
Doku Takip Protokolü.....	38

Testiküler Histolojinin Değerlendirilmesi İçin	
Modifiye Johnsen Skoruması.....	39
İmmünohistokimyasal Çalışma Protokolü.....	40
Apoptotik İndekslerin Hesaplanması.....	42
Elektron Mikroskopik Doku Takip Protokolü.....	42
İstatistiksel Analiz.....	44
BULGULAR.....	45
Biyokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi.....	45
Johnsen Skorlarının Değerlendirilmesi.....	46
Apoptozin Değerlendirilmesi.....	47
Elektron Mikroskopik Bulguların Değerlendirilmesi.....	53
TARTIŞMA.....	58
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	62
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	82
ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ.....	84
TABLolar DİZİNİ.....	85

ÖZET

Varikosel, yüzyıllardır bilinmesine karşın patofizyolojisi günümüze kadar tam olarak aydınlatılamamış erkek infertilitesinin en önemli sebebidir. İnfertilite nedeniyle başvuranların ortalama %30-40'ında varikosel saptanmaktadır. Patofizyolojisinde, değişen testiküler kan akımı, testis-interstisyel sıvı ilişkisi, hipertermi, ikincil venöz basınç artışı, renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu, oksidatif stres ve apopitoz yer almaktadır. Özellikle reaktif oksijen radikallerinin sperm deoksiribonükleik asit (DNA) hasarına yol açtıkları gösterilmiştir. Oluşan DNA hasarının tamirinde Poly ADP-Riboz Polimeraz (PARP) esansiyel de olsa, varikoselin süresi ve iskemik ortama bağlı oksidatif stres artışı ile bu enzimin aşırı aktivasyonu hücrenin apopitoz ile ölümüne yol açabilir. Varikoselde bazı antioksidanların etkinliği çalışılmışsa da PARP inhibitörlerinin etkisi henüz denenmemiştir. Bu çalışmada amaç, deneysel olarak varikosel oluşturulmuş erişkin ratlarda, intraperitoneal 3-aminobenzamide (3-AB) injeksiyonunun testis histolojisi ve apopitoz üzerine etkisini araştırmaktır.

Çalışmaya 26 adet erişkin Wistar cinsi erkek rat dahil edildi. Ratlar toplam 4 gruba ayrıldı. Birinci grupta yer alan 6 hayvan hiçbir işleme tabi tutulmadı. İkinci gruptaki 6 hayvana ise sham operasyonu uygulandı. Üçüncü grupta yer alan 5 hayvana renal venin parsiyel ligasyonu sonucu varikosel oluşturuldu. Dördüncü grupta yer alan 9 hayvanda ise varikosel oluşturuldu ve 30 gün süreyle günde iki kez intraperitoneal 3-aminobenzamide injeksiyonu yapıldı. 30 gün sonra İlk üç gruptaki tüm hayvanlara orşiektomi yapıldı. Testis dokuları 3 parçaya ayrılarak histopatolojik, elektron mikroskopik ve biyokimyasal inceleme için hazırlandı. Dördüncü grupta yer alan hayvanların testis dokuları da ilaç uygulanması bitince çıkartıldı. Tüm testis dokuları, Johnsen skorları açısından değerlendirildi. Apopitoz değerlendirilmesi için ise poliklonal Anti-Aktif Caspase 3 antikorunu kullanıldı.

Doku malondialdehit (MDA) değerlerinin, varikosel grubunda, kontrol, sham ve varikosel + 3-AB grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanırken (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$) antioksidan enzim değerleri açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Grupların ortalama Johnsen skorları karşılaştırıldığında, varikosel grubu ile

kontrol, sham ve varikosel + 3-AB grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$). Varikosel grubunda ortalama apoptotik indeks, kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde artmış bulundu ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla $p=0,445$ ve $p=0,175$). Varikosel oluşturulup ardından 30 gün süreyle intraperitoneal 3-AB uygulanan grupta apoptotik indeks, kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış bulunurken (sırasıyla $p=0,007$, $p=0,001$), varikosel grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe rastlanmadı ($p= 1,000$). Elektron mikroskopik incelemede, varikosel grubunda, düzensiz, laminasyon gösteren, katlantılı bazal lamina, seminiferöz tübül hücrelerinin sitoplazmalarına doğru invajinasyonlar göstermekteydi ve bazı Sertoli hücre sitoplazmalarında, düz yüzlü endoplazmik retikulum (DER) sisternalarının farklı büyüklüklerde genişlemeler gösterdiği saptandı. Bu bulgular varikosel+3-AB grubunda da gözlemlendi.

Çalışmamızın sonuçları, varikoselin, spermatogenezi etkilediğini, ortalama Johnsen skorlarında düşmeye ve apoptotik indekste artışa neden olduğunu göstermektedir. 3-aminobenzamid uygulamasının, Johnsen skor ortalamalarını, kontrol ve sham grubu düzeyine yükselttiği ancak apoptotik indeks ortalamalarının, varikosel grubundan farklı olmadığı gözlenmiştir. Varikosel sonucu gelişen iskemik ve oksidatif strese bağlı testis hasarının gerilemesinde 3-aminobenzamid'in olumlu etkileri olabilir.

Anahtar sözcükler: Apoptoz, Elektron Mikroskopi, Testis, Varikosel, 3-aminobenzamid

ABSTRACT

The Investigation of The Effect of an Alternative Medical Treatment Preventing Germ Cell Apoptosis in Varicocele Induced Rats By Immunohistochemical and Electron Microscopic Methods

Although varicocele has been known for centuries, its pathophysiology is the most important cause of the male infertility which is still not clear today. Varicocele is determined about %30, 40 rates of the applicants who come with the complaint of infertility. Changeable testicular blood flow, testes-interstitial liquid relation, hyperthermia, secondary venous pressure increase, renal-adrenal reflux, hormonal disfunction, autoimmunity, acrosome relation, oxidative stress and apoptosis have been taken place in its pathophysiology. Especially it is predicted that reactive oxygen species gave rise to the damage of sperm DNA. Although Poly ADP-Ribose Polymerase is essential in the restoration of DNA damage, the duration of varicocele oxidative stress increase dependent on the ischemical environment and excessive activation of the enzyme can cause the apoptotic cell death. The effect of PARP inhibitors hasn't been tested yet, although the efficiency of the anti-oxidants has been tested in varicocele. In this study, the aim is to search the effect of intraperitoneal 3-aminobenzamide injection on testes histology and apoptosis in experimentally induced varicocele adult rats.

It was involved 26 adult Wistar type male rats to the study. They were separated into four groups. There was no process on 6 animals in first group. Sham operation was implemented to 6 animals in second group. Varicocele was formed to the 5 animal in third group as a result of partial ligation. Varicocele was formed to the 9 animal in fourth group and intraperitoneal 3-aminobenzamide injection was made twice a day during 30 days. After 30 days, orchietomy was applied to all of the animals in first three groups, their testes tissues were separated into three parts and they were prepared for the histopathological, ultrastructural and biochemical investigation. After the end of 3-AB treatment, the testes tissues of the fourth group animals were extracted. All of the testes tissues were evaluated with respect of Johnsen scores. For the apoptosis evaluation polyclonal anti-active caspase 3 antibody was used.

It was predicted that the values of tissue MDA of the varicocele group was significantly greater than control, sham and varicocele+3-AB group (respectively $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$), with respect of anti-oxidant enzyme values, no significant statistical difference could be found among the groups. When the average Johnsen scores of the groups were compared, a significant difference was predicted between varicocele group and control, sham, varicocele+3-AB groups (respectively $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$). In the varicocele group, apoptotic index was found clearly increased comparing with control and sham group, but this increase wasn't statistically significant (respectively $p=0,445$ and $p=0,175$). In the group in which varicocele was formed and intraperitoneal 3-AB was treated during 30 days, apoptotic index was increased statistically comparing with control and sham group (respectively $p=0,007$, $p=0,001$) while no statistically significant difference was found comparing with varicocele group ($p=1,000$). At the electron microscobic investigation, in the varicocele group, irregular, laminated, folded basal lamina has shown invaginations towards the cytoplasm of seminifer tubule cells and it was predicted that smooth endoplasmic reticulum (SER) sistrans have shown dilatations in different sizes at some Sertoli cell cytoplasm. This findings were also observed in varicocele+3-AB group.

The results of our study have shown that varicocele effects spermatogenesis and causes a decrease in average Johnsen scores and an increase in apoptotic indexes. It has been observed that 3-aminobenzamide increased average Johnsen scores to control and sham groups' levels, but average apoptotic indexes are not different from varicocele group. There can be a positive effect of 3 aminobenzamide on testes damage dependent on ischemic and oxidative stress which are developed as a result of varicocele.

Key Words: Apoptosis, Electron Microscopy, Testes, Varicocele, 3-aminobenzamide

GİRİŞ VE AMAÇ

Varikosel, en sık saptanan erkek infertilite sebebidir. Etyolojisi ve infertiliteye sebep oluş mekanizması halen tam olarak aydınlatılamamıştır. Günümüzde bu hastalığın en sık uygulanan tedavisi, cerrahi ve perkütan embolizasyondur^{1, 2, 4, 6}.

Varikoselin, erkek germ hücreleri üretim sürecini (spermatogenez) nasıl bozduğuna dair çok sayıda teori olmasına rağmen, henüz bunların hiçbirisi üzerinde fikir birliğine varılmamıştır. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda varikoselin germ hücre apoptozisine sebep olduğu, artan germ hücre apoptozunun da sperm konsantrasyonunu azaltarak infertiliteye yol açtığı öne sürülmüştür^{81, 84}.

Bu nedenle, sunulan çalışmada ratlar üzerinde deneysel varikosel oluşturulup histopatolojik ve apoptotik süreç üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi ve varikoselin cerrahi tedavisine alternatif olabilecek bir medikal tedavi uygulanarak histolojik ve elektron mikroskopik olarak sonuçların değerlendirilmesi planlandı. Testislerdeki germ hücrelerindeki apoptoz düzeylerini değerlendirmede aktif kaspaz 3 antikoruna ile indirek immünperoksidaz metodu uygulandı.

Böylece, varikosel sonrası germ hücrelerindeki apoptoz ne kadar artar, varikosel sonrası artmış olan apoptoz, 3-aminobenzamid uygulaması sonrası beklendiği gibi azalır mı, varikosel sonrası uygulanan 3-aminobenzamidin ışık ve elektron mikroskopik olarak ne gibi etkileri olur sorularına yanıt bulunması amaçlandı.

GENEL BİLGİLER

Varikosel Epidemiyolojisi

Varikosel, pleksus pampiniformisin patolojik dilatasyonu şeklinde tanımlanmaktadır. Varikosel sözcüğü, ilk kez 1843'de Curling tarafından "pampiniform pleksus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu" tanımına karşılık olarak kullanılmaya başlanmıştır¹. Hastalık yüzyıllardır bilinmesine karşın patofizyolojisi günümüze kadar tam olarak aydınlatılamamıştır.

Varikosel, erişkin erkek popülasyonunun %15-22'sini etkileyen fiziksel bir anomalidir^{2,3}. İnfertilite nedeniyle başvuruların ortalama %30-40'ında varikosel saptanmaktadır^{4,5}. Anormal semen analizi olan infertil erkeklerin de %25'inde varikosel bulunduğu bildirilmektedir⁶. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 78923 numaralı ve 9043 hastanın değerlendirildiği projesinde, anormal semen parametrelerine sahip erkeklerin %25,4, normal semen parametrelerine sahip erkeklerin %11,7'sinde varikoselin bulunduğu bildirilmiştir⁷. Sekonder infertilite nedeniyle başvuran olgularda, varikosel görülme sıklığı artarak %69-81 oranına ulaşmaktadır^{8,9,10}. Bununla birlikte, varikosele sahip olguların %80'inde infertilite bulunmamaktadır¹¹. Her ne kadar varikoselin 10 yaş altı çocuklarda görülmediği ve 10-14 yaş arasında sıklığının arttığını ortaya koyan çalışmanın verilerine dayanarak varikoselin yalnızca pubertede geliştiği ileri sürülse de¹², Akbay ve arkadaşlarının 2-19 yaş arası 4052 çocukta yaptıkları kapsamlı prevalans çalışmasından elde edilen bulgular hastalığın erken yaşlarda da başlayabileceğini göstermektedir¹³. Bu çalışmaya göre, 2-10 yaşları arasında prevalans %0,92 iken, 11-19 yaşları arasında %11 düzeyine ulaşmaktadır. Varikoselin kalıtımla ilişkisini araştıran başka bir çalışma ise, varikoseli olan erkeklerin birinci derece akrabalarında hastalığın görülme sıklığı %53 gibi genel popülasyondan önemli derecede yüksek oranda saptanmaktadır¹⁴.

Varikoselin Etiyolojisi

Varikoselin etiyolojisi tartışmalı olmasına karşın, kabul gören 3 teori bulunmaktadır¹⁵. *Birincisi*, sağ ve sol testiküler venler arası anatomik farklılıklardır. Sağ testiküler venin vena kava inferiora oblik, buna karşılık sol testiküler venin sol renal vene dik açıyla açılması ile solda hidrostatik basınç artışı sonucu panpiniform pleksusa iletilen basıncın venlerde dilatasyon ve

kıvrılmaya yol açmasıdır. *İkincisi*, venöz kanın reflüsü ile sonuçlanan kompetan venöz valflerin olmayışıdır. Varikoselli erkeklerde yapılan anatomik diseksiyon çalışmaları, sol renal ven ve internal spermatic ven birleşim düzeyinde valf bulunmadığını göstermiştir¹⁶. Bir başka çalışmada, varikoseli olan 659 erkeğin venografileri incelendiğinde %73'ünde venöz valflerin yokluğu gösterilmiştir¹⁷. Ancak yeterli valf sistemine sahip olan hastalarda da %26,2 oranında varikosel görülebilmektedir. Bazı yazarlara göre valflerin yokluğu varikosel gelişimine, artan hidrostatik basınç artışı, uzamış staz ve testis içinde artan ısıya neden olarak katkıda bulunmaktadır. Sonuç olarak artan ısı, spermatozoid ve spermatozoid kaybına yol açar¹⁸. Ancak, altta yatan sebep hala netleşmemiştir^{17, 19} T1-21, 22. *Üçüncüsü* ise, sol renal venin aorta ve superior mezenterik arter arasında kompresyonuna bağlı olarak testiküler venin parsiyel obstrüksiyonudur (nutcracker fenomeni). Sonuçta, kollateral drenaj gelişimi, venöz basınç artışı ve staz oluşmaktadır. Ayrıca varikosel gelişiminde embriyolojik faktörlerin de rol oynadığı (ontojenik temel) ileri sürülmektedir. Buna göre, gelişim sırasında sol taraftaki vasküler yapılar daha plastik özelliğe sahiptir¹⁷. Sağ ve solun drenajında farklılığa yol açan bu durum, sol tarafın daha zayıf drenajına ve dolayısıyla embriyogenez sırasında kollateral damarların açık kalmasını sağlayarak yüksek oranda venöz anomaliye yol açmaktadır. Bu ontojenik potansiyel, sklerozisten hemen sonra, daha önce düşünülmeyen anastomozların yeniden açılmasına yol açarak varikoselin tekrarlamasına yol açmaktadır. Ontojeni konusunda bir başka bulgu ise primer sağ varikoselli olgulardır. Situs inversusta yalnız sağda görülen varikosel bu embriyolojik temel ile açıklanabilir^{20,21,22}. Sağ varikoselin, internal spermatic venin vena kava inferior yerine sağ renal vene drene olması nedeniyle geliştiği, venografik çalışmalar dayanılarak ileri sürülmüştür^{23,24}.

Varikoselin Patofizyolojisi

Varikoselin hem hayvanlarda^{25,26} hem insanlarda²⁷ progresif ve zamanla artan testis hasarına yol açtığı bilinmektedir. Varikoselin fertilité üzerine etkilerini irdeleyen Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 78923 numaralı projesinde, hastalığın semen anomalileri (sayı ve motilitede bozulma), testiküler hacimde azalma ve Leydig hücre fonksiyonunda azalmayla ilintili olduğunu açıkça vurgulanmaktadır⁷. Ayrıca bu çalışmada, varikosel boyutu ile sperm sayısında

azalma oranı arasında direkt bir ilişki olduğu bildirilmektedir. Varikosel patofizyolojisinde şu hipotezler kabul görmektedir:

1. Testiküler Kan Akımı; Deneysel hayvan çalışmalarında, varikosel ve testiküler kan akımı değişiklikleri konusunda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Tek taraflı varikosel varlığında iki taraflı testiküler kan akımı artışını gösteren Turner ve arkadaşlarının çalışmaları yanında²⁸, erişkin ratlarda aynı bulguları saptayan ve varikosektomiye izleyen kısa ve uzun dönemlerde kan akımının normale döndüğünü bildiren çalışmalar da vardır^{29, 30}. Tek taraflı patolojinin neden iki taraflı etki yaptığı henüz tam olarak bilinmemesine karşın, nöral veya hormonal faktörlerin rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu bulguların tam aksine, varikoselin testiküler kan akımında azalmaya yol açtığını bildiren çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. Nitekim Li ve arkadaşları, sol renal venin parsiyel ligasyonu ile oluşturdukları deneysel varikosel modelinde kan akımının azaldığını göstermişlerdir³¹.
2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi; Varikosele bağlı internal spermatik venede gelişen hidrostatik basınç artışı, testiküler kapiller ve vasküler geçirgenlikte değişiklik dolayısıyla testiküler interstisyel sıvı oluşumunda değişikliğe yol açar. Yapılan çalışmalarda, deneysel varikosel oluşumundan sonra 30 gün içerisinde interstisyel sıvı oluşumunda artış olduğu gösterilmiştir³². Seminifer tübülü ve interstisyel dokudaki hücreleri saran bu sıvı, testis ve testis vaskülaritesi ile bağlantılıdır. Testiküler interstisyel sıvı oluşumunu kontrol eden faktörler ve bu faktörlerdeki değişiklikler, testis işlevinde önemli rol oynamaktadır. Bu faktörlerden birisi de testis kapillerlerinin vasküler geçirgenliği olabilir³³. Bu görüşü destekleyen bir bulgu, varikosel oluşturulan ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı oranda fazla polimorfonükleer hücre birikiminin olmasıdır. Ayrıca bu birikim, sol tarafta sağa göre daha fazla gerçekleşmiştir²⁶. Kan damarlarında polimorfonükleer hücre birikiminin, venöz hidrostatik basınç artışı ile gelişen vasküler geçirgenliğe ikincil ödeme bağlı olduğu düşünülmektedir.
3. Hipertermi; Varikosele ikincil gelişen testiküler işlev değişikliği için en yaygın kabul gören mekanizmadır. Skrotal ısıyı iki termoregülatör sistem düzenlemektedir. Birincisi skrotumun kendisidir ki bu bölgedeki ince ciltte

subkutan yağ doku bulunmaz ve dartos kası tarafından kontrol edilen yüzey alanı değişken olarak kalır. İkincisi 'zıt akımlı' (countercurrent) ısı sistemidir. İlk kez 1959 da tanımlanmıştır³⁴. Spermatik kordon içindeki pampiniform pleksus, arteryel ve venöz kan arasında zıt akımlı ısı değişim sistemini sağlamaktadır. Testise girecek olan spermatik arter kanının ısı testisten çıkan ve pleksus pampiniformisi oluşturan venöz kan tarafından soğutulmaktadır. Varikoselin bu normal mekanizmayı bozduğuna inanılmaktadır. Skrotal ısının değerlendirildiği çalışmalarda farklı sonuçlara ulaşılmaktadır^{35,36,37,38,39,40,41}. Ölçümün daha objektif olarak yapıldığı çalışmada, tek taraflı varikoselin intraskrotal ısıda bilateral olarak kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunması, testis içine saplanan iğne şeklinde ince bir ısı ölçer kullanılmasına bağlı olabilir³⁶. Ayrıca bu çalışmada, intraskrotal ve intratestiküler ısı ayrı ayrı ölçülmüş ve her ikisinin de korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Sıçanlarda ve tavşanlarda deneysel olarak oluşturulan varikozel ile intraskrotal ısı artışı arasında nedensel bir ilişki saptanmış ve varikozel onarımı ile ısı normal hale dönmüştür^{29,42}. Ayrıca, artmış intraskrotal ısının testiküler histolojide de anormalliklere neden olduğu ve ejakülattaki sperm kalitesini düşürdüğü bildirilmiştir^{10,42,43}. Artmış intratestiküler ısının hangi mekanizma ile spermatogenez bozduğu tam olarak bilinmemektedir. Ancak semifer tübül ve/veya Leydig hücre düzeyinde nükleer DNA ve RNA bağlayıcı proteinlerde direkt termal hasar olabileceğinden^{44,45}, Sertoli hücrelerinden inhibin ve androjen bağlayıcı proteininin salınımının azaldığından^{46,47} ve DNA polimeraz aktivitesindeki azalmadan kuşkulmaktadır⁴⁴.

4. Venöz Basınç; Varikozele ikincil gelişen venöz basınç artışı testis kan akımını etkileyebilmektedir^{48,49}. Hamster testisinin subkapsüler yüzeyinde bulunan mikrodamarlardaki intravasküler basınçların direk ölçümü, testiküler kapiller basıncın çok düşük olduğunu ve vasküler ağın arteryel tarafınca düzenlendiğini ortaya koymuştur. Bu vasküler direncin dağılımı, hamster modelindeki venöz basınç artışına kapiller basıncın oldukça duyarlı olabileceğine işaret edebilir⁴⁸. Ayrıca artmış venöz basınç, intratestiküler onkotik ve hidrostatik basınçlarda değişikliğe neden olabilir; önemli hormonlar için parakrin ve taşınma ortamını değiştirebilir;

mikrovasküler sıvı değişimini bozabilir. Yapılan çalışmalarda, bu sebeple, varikosel oluşturulmuş testiste, enerji metabolizması ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda defekt olduğunu gstermektedir^{50,51}. Varikoseli olan 60 olguya varikoselektomi uygulanan bir çalışmada, olguların %88'inde cerrahi sonrasında venöz basıncı değerlerinde azalma saptamıřlardır⁵². Bu seride, 42 hastanın % 70'inde hem venöz basıncıta azalma hem de semen parametrelerinde iyileşme gözlenirken, bu grup için gebelik oranı %32 düzeyinde gerçekleşmiştir. Ayrıca venöz basıncıta varikosel onarımı ile azalma sağlanan olgularda, sağlanmayanlara göre sperm motilitesinde düzelme daha fazla bulunmuştur.

5. Renal-Adrenal Reflü; Erkeklerin yaklaşık %50'sinde sol spermatik vende retrograd akımın olduğu bildirilmektedir^{53,54}. Bu durum, varikoselli hastalarda, böbrek ve adrenalenden katekolaminler, prostoglandin E ve F gibi metabolitlerin yüksek konsantrasyonda reflüsüne yol açmaktadır.
6. Hormonal Disfonksiyon; Varikoseli olan infertil olgularda, serum testesteron konsantrasyonunda azalma olduğu düşüncesi, varikoselin Leydig hücre fonksiyonunu bozduğu ve buna bağlı olarak testesteron üretiminde azalmaya yol açtığı varsayımına yol amıştır^{55,56}. WHO'nun varikoselin hormon parametrelerzerine etkisini değerlendirdiği çok merkezli çalışmada, varikoseli olan 30 yaş üstü erkeklerde 30 yaş altındakilere göre serum serbest testesteron düzeyi anlamlı derecede düşük bulunmuřtur⁷. Çayan ve arkadaşlarının, mikrocerrahi varikoselektominin hormonal parametrelere etkisini değerlendirdikleri çalışmaları da bu bulguları destekler niteliktedir⁵⁷. Tüm bu bulgulara karşın, varikoseli olan hastalardaki folikül uyarıcı hormon (FSH), lüteinizan hormon (LH), testesteron vestradiol gibi hormon düzeylerinin normal sınırlarda kaldığını bildiren çalışma sayısı da azımsanmayacakldedir^{58, 59, 60, 61}.
7. Otoimmünite; Kan-testis bariyerinin bozulmasının antisperm antikor (ASA) üretimini sağladığına inanılır. Olası etyolojiler arasında varikosel de bulunmaktadır⁶². Varikoselin hangi mekanizmayla kan-testis bariyerini bozmadan⁶³, ASA'ları uyardığı bilinmemektedir⁶⁴. Yapılan bir çalışmada, sham ve opere edilmeyen ratlara göre varikosel oluşturulan ratlarda daha yüksek düzeyde ASA birikimi olduğu gsterilmiřtir⁶⁵.

8. Akrozom Reaksiyonu; Varikoselde, sperm sayı ve morfolojisinden daha çok sperm fonksiyonunda bir defekt olduğu ve bunun da daha çok zona pellusidaya bağlanma sırasındaki akrozom reaksiyonunda olduğunu düşünen araştırmacılar bulunmaktadır^{66,67}. İnsanlarda yapılan bir çalışmada, varikozel onarımının akrozom reaksiyonunda iyileşme sağlayamadığı da ileri sürülmektedir⁶⁸. Ayrıca, varikoseli olan hastalarda akrozom reaksiyonunu olumsuz etkileyen önemli sperm plazma proteinlerinin ekspresyonundaki farklılıklar, fertilité üzerine değişken etkilere neden olabilir.
9. Oksidatif Stres; Reaktif oksijen radikalleri (ROS) arasında, süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, nitröz oksit, hipoklorik asit ve hidrojen peroksit bulunmaktadır. Aerobik koşullar altında inkübe edildiğinde, insan spermatozoası ROS geliştirme kapasitesine sahiptir⁶⁹. Spermatozoanın ROS üretimi, sinyal iletim mekanizmaları, sperm hiperaktivasyonu ve kapasitasyonu, akrozom reaksiyonunu kolaylaştırma ve sperm-oosit birleşmesi için önemli bir aracı olarak görev yapan fizyolojik bir işlemdir^{70,71}. Normal sağlıklı bireylerde seminal plazma, aşırı ROS üretiminin etkisini nötralize eden doğal temizleyici veya antioksidanlar içerir. Ancak patolojik koşullarda ROS üretimi antioksidan kapasiteyi aşan artmış oksidatif strese neden olur^{70,72,73,74}. ROS, sperm baş ve orta parça kısmındaki poliansatüre yağ asitlerin de lipid peroksidasyonu yaparak defektif sperm fonksiyonuna neden olabilir, sperm morfolojisini bozabilir, sperm motilitesinde azalmaya yol açabilir ve yetersiz sperm-oosit birleşmesine yol açabilir^{75,76}. Ayrıca, sperm DNA hasarına neden olabilir. Varikoseli olan fertil veya infertil erkeklerin semen örneklerinin değerlendirilmesinde, varikoseli olmayanlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda ROS bulunduğu bildirilmiştir⁷⁷. İnfertil varikoselli olguların %80'inde artmış ROS konsantrasyonu saptanmasına karşın, bu durum varikoseli olan fertil hastaların %77'sinde, varikoseli olmayan fertil bireylerin %20'sinde bulunmaktadır. Ayrıca, normal bireylerin toplam antioksidan kapasitesi de varikoselli olanlardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur⁷⁸. Oksidatif strese karşı duyarlılığın, sperm plazma membranında bulunan yağ asit içeriğinin belirgin şekilde azalması nedeniyle artmış olduğunu gösteren bir çalışma da mevcuttur⁷⁹. Yine

varikoseli olan hastaların testis biyopsileri değerlendirildiğinde, varikoseli olmayanlara göre, ROS'un indüklediği lipid peroksidasyonunun indirek bir belirteci olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonları anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu durum, varikosel patofizyolojisi için potansiyel mekanizmada ROS'un katkısını desteklemektedir⁸⁰.

10. Apoptoz; spermatogonyum, spermatozoid ve spermatid olmak üzere her 3 tip germ hücresi de apoptoz tarafından olumsuz şekilde etkilenebilmektedir⁸¹. Ratlarda yapılan çalışmalarda, normal spermatogenez sırasında tüm preleptoten spermatozoidlerin %75'inin apoptoz tarafından ortadan kaldırılabileceği ileri sürülmektedir⁸². Ayrıca, normal hücrelerde bulunmayan endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS), apoptotik germ hücrelerinde varlığı bildirilmektedir⁸³. Son zamanlarda, varikoseli olan hastalarda, oligospermi gelişiminde apoptozun önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Barqawi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, rat modelinde varikosel oluşturulduktan 14 gün sonra, seminifer tübül kesiti başına 0,23 apoptotik hücre bulunmuş ve kontrol grubundaki apoptotik hücre sayısı ile kıyaslandığında anlamlı şekilde artış saptanmıştır⁸⁴. Fakat varikosel grubunun kontralateral testisleriyle kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. Benzer durum insanlarda da ortaya konmuş ve apoptotik hücre yüzdesi, varikosel için % 14,7, kontrol grubu için %2 oranı verilmiştir⁸⁵. Varikoseli olan hastaların ejaküle edilen spermalarının değerlendirildiği bir başka çalışmada, sperm hücreleri %10'a kadar apoptotik iken kontrol grubunda bu oran %0,1 bulunmuştur⁸⁶. Varikosel ve apoptoz arasındaki ilişki 3 olay nedeniyle birliktelik göstermektedir⁸⁷. Isı stresi, androjen yoksunluğu ve toksik uyarıcı. Varikoseldeki ısı artışı ile apoptoz arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Lue ve arkadaşlarının çalışmasında varikoselin neden olduğu ısı artışının, hücreye ve evreye özgül olarak apoptoze neden olduğu ileri sürülmektedir⁸⁸. Kriptorşidi modelinde de benzer durumun gözlenmesi, ısı etkili medyatörleri gündeme getirmiştir. Bunlardan en bilineni "heat shock protein"ler (HSP70-2) olup, sperm hücreleri üzerinde dağılım göstermekte ve ısı ile upregule olmaktadır⁸⁹. Ancak, varikosel patofizyolojisinde "heat shock protein"lerin rolü henüz bilinmemektedir. Androjen eksikliğinde,

azoospermik ya da oligospermik hastalarda ve deneysel olarak kriptorşidizm oluşturulmuş ratlarda, testiküler ısı artışının olduğu olgularda testiküler hücrelerde apoptozte artma gözlenebilmektedir. Rat modelinde, hipofizektomiden 4 gün sonra immatür ratlarda apoptoz indüklenirken, matür ratlarda ancak gonadotropin salıcı hormon (GnRH) antagonistleriyle apoptoz indüklenmektedir^{83,90}. Bu ratlara, rekombinant LH (rLH) ve rekombinant FSH (rFSH) verildiğinde, rLH grubunda apoptozte % 67, rFSH grubunda % 79'luk azalma ortaya çıkmakta ve intratestiküler testosteron düzeyi normale inmektedir. Apoptozle ilgili son durum ise toksik ajanlardır. Toksik bir madde olan 2-metoksi etanol, etilen glikol eter ve bunların yan ürünü 2-metoksiasetik asit gibi toksik maddelerin hayvan deneylerinde apoptoze yol açarak spermatosit ölümüne neden olduğu bilinmektedir^{91,92,93}. Ayrıca varikoselde toksik adrenal metabolitlerin internal spermatik vene reflüsü söz konusudur. Buna ek olarak, varikoseli olan erkeklerde oligospermi, sigara içenlerde içmeyenlere göre 10 kat daha fazla görülmektedir⁹⁴. Spermatogenezle ilgili bir diğer toksik ajan olarak kadmiyum suçlanmaktadır. Varikoseli olan erkeklerde, ağır sigara içicilerindekine benzer şekilde seminal plazma ve testiküler kadmiyum düzeyi yüksek bulunmuştur^{95,96}. Varikoseli olan erkeklerin testis biyopsilerinde de, seminifer tübül başına apoptotik hücre oranıyla kadmiyum birikimi arasında korelasyon gösterilmiştir⁹⁵. Normal spermatogenez olan varikoselli hastalarla karşılaştırıldığında, hipospermatogenez olan varikoselli hastaların testis biyopsisinde kadmiyum düzeyleri ve apoptotik hücreler belirgin olarak daha yüksek çıkmaktadır.

Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumdan olgun spermiyumun geliştiği bir süreçtir^{97,98,99,100}. Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerde meydana gelir. Bu bölgede, Sertoli hücresi ve spermatogonyumlar olmak üzere iki tip hücre vardır^{100,101,102}. Vitellus kesesi duvarında gelişen endodermal kökenli germ hücreleri, embriyonik hayatta testise göç ederek seminifer tübüllere yerleşir ve spermatogonyum adını alırlar¹⁰³. Puberte öncesinde seminifer epitelin çok

büyük bir kısmını Sertoli hücresi oluşturur¹⁰¹. Spermatogonyumların gelişimi, puberteden hemen önce başlar, yaşam boyu devam eder ve seminifer epiteldeki çoğunluğu ele geçirir^{97,100,101,103}. Spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan bazal kompartmanda; primer ve sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiyumlar ise adluminal kompartmanda yer alır¹⁰². Spermatogenez; spermatogonyal, spermatosit ve spermatid olmak üzere 3 ayrı fazda incelenir.

Spermatogonyal faz (Spermatositogenez);

Tübül bazal membranlarına oturan spermatogonyumlar, küçük diploid hücrelerdir, puberteye kadar bölünmezler^{98,102}. Puberteyle birlikte, spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle çoğalarak yeni spermatogonyumları ve nihayetinde primer spermatositleri oluşturur^{97,98,100,102}.

İnsan spermatogonyumları, rutin histolojik preparatlardaki görünümeleri temel alınarak 3 tipe ayrılmıştır: Koyu Tip A Spermatogonyumlar; koyu bazofilik boyanan, oval heterokromatik nükleuslu küçük (12µm çapında) hücrelerdir^{97,102}. Seminifer epitelin kök veya rezerv hücreleri olarak değerlendirilirler^{97,100,102}. Düzensiz aralıklarla bölünerek, hem yeni koyu Tip A spermatogonyumları, hem de açık Tip A hücreleri meydana getirirler^{97,98,100,102,104}. Açık Tip A Spermatogonyumlar; Ökromatik nükleuslarının soluk görüntüleri dışında, koyu Tip A hücrelerle aynı özelliklere sahiptirler. Bunlar, testesteron etkisiyle mitoz bölünmeyle çoğalırlar ve yeni açık Tip A hücreleri ve Tip B hücreleri meydana getirirler^{97,102}. Tip B Spermatogonyumlar; oval yerine yuvarlak olan nükleusları dışında açık Tip A spermatogonyumlara benzerler^{97,102}. Mitozla bölünerek primer spermatositleri meydana getirirler^{97,102}. Bir koyu Tip A spermatogonyumun iki açık Tip A spermatogonyuma bölünmesi sırasında, oluşan yeni hücreler ince sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı olarak kalırlar, yani sitoplazmalar tam olarak ayrılmazlar^{97,98,102,104,105}. Bu sitoplazmik bağlantılar, spermatid olgunlaşmasının son dönemlerine kadar devam eder.

Spermatosit Fazı (Mayoz);

Seminifer epitelin en büyük hücresi olan primer spermatositin değişik yoğunlaşma aşamalarındaki kromozomları içeren büyük bir nükleusu vardır^{97,102}.

Primer spermatositler oluştuktan kısa bir süre sonra (preleptoten aşamasında) bazal kompartmandan adluminal kompartmana göç eder. Bu hücreler mayoz başlamadan önce DNA'larını replike ederler^{98,102,103}. İlk mayoz bölünme ile diploid (2n) miktarda DNA'ya ve haploid kromozom sayısına sahip 2 adet sekonder spermatosit, ikinci mayoz bölünme ile de haploid (1n) miktarda DNA'ya ve aynı miktarda kromozoma sahip ve aynı miktarda kromozoma sahip iki adet spermatid oluşur^{97,98,100,101,102}.

Oldukça kısa süre kalan sekonder spermatositler, seminifer epitelde kolayca izlenemez^{102,103}. Bu hücreler 2n DNA miktarına sahiptir ve kromozomlarını replike etmeden hemen ikinci mayoz bölünmeye girer^{97,98,101,102,103,106}. İkinci mayoz bölünme tamamlandığında, nükleer membranlar yeniden oluşur ve bir sekonder spermatositten her biri 22 adet tek zincirli kromozoma ve 1n DNA miktarına sahip iki haploid spermatid meydana gelir⁹⁷.

Spermatid Fazı (Spermiyogenez);

Spermatidler 8 µm çapında, küçük, yuvarlak haploid hücrelerdir. Bir spermatid oluştuktan sonra bir daha bölünme olmaz^{97,102}. Haploid spermatidler, olgun spermiyumu meydana getirecek olan ve spermiyogenez olarak adlandırılan bir farklanma sürecine girerler⁹⁷. Bu süreç, dört bölümden oluşur^{97,102}. Bu aşamalar, spermatidler, Sertoli hücresinin plazma membranına özelleşmiş bağlantılarla bağıyken gerçekleşir.

Golgi dönemi; Spermatid granüllü endoplazmik retikulumunda hidrolitik enzimler oluşur. Bunlar Golgi komplekslerinde modifiye olur ve küçük preakrozomal granüller olarak paketlenir^{97,101,102}. Glikoproteinden zengin bu granüller birleşerek akrozomal vezikülü oluşturur^{97,102}. Bu vezikülün konumu gelişen spermiyumun ön kutbunu belirlerken, sentrioller de zıt kutba göç ederler^{97,98,102}. Sentriollerin biri, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan dokuz

periferik ve iki santral (9+2) mikrotübül oluşumunu başlatırken, diğeri nükleus ile kuyruğu birleştiren bağlantı parçasını meydana getirir^{97,98,102,105}.

Kep dönemi; Akrozom vezikülünün boyutu büyür ve nükleusun ön yarısı üzerine yayılarak akrozomal kep adını alır. Akrozomal kepin altındaki nükleer membran kısmı normalde varolan nükleer porlarını kaybeder^{97,98}.

Akrozom dönemi; Spermatid morfolojisinde birçok değişiklik meydana gelir. Nükleus kromatini yoğunlaşır, nükleus yassılaştır ve spesifik şeklini alır^{97,98,102}. Sitoplazma, posterior tarafa doğru yer değiştirir. Mitokondriyonlar, sitoplazmanın arka tarafına doğru hareket ederek, heliks şeklinde fibrilleri sarar ve orta parçayı oluşturur^{97,102,105}. Mitokondriyal kılıfın oluşumu sırasında, nükleusla birlikte spermiyumun bağlantı parçasını meydana getirecek olan sentrioiden, aksonemin etrafında yerleşen dokuz adet dış koyu fibril meydana gelir^{97,102}. Orta parçanın distalinde, iki longitudinal piramit ve çok sayıda bağlantı biriminden oluşan fibröz bir kılıf, esas parçanın dokuz longitudinal fibrilini sarar ve hemen hemen kuyruğun sonuna kadar uzanarak esas parçayı oluşturur^{97,102,105}. Onun distalindeki kısa parça ise son parça adını alır⁹⁷.

Olgunlaşma dönemi; Bu aşama fazla sitoplazmayı azaltmaya yönelik bir dönemdir. Sertoli hücreleri, artık cisim olarak adlandırılan bu fazla sitoplazmayı fagosite eder. Hücrelerarası köprüler de bu fagosite edilen cisimlerde kalırlar^{97,98,102}. Farklılaşma işlemi sona eren spermiyumun tübül lümenine salınması işlemine spermiyasyon adı verilir. Yeni oluşan bu spermiyum immotildir ve fertilize etme yeteneğine sahip değildir¹⁰².

Sıçanlarda, her bir tübülün uzunluğu boyunca farklı aşamalar bir düzen içerisinde ardarda izlenebilir, yani tübül duvarından geçecek transvers bir kesitte, sadece tek bir aşamaya ait hücreler izlenir. Ancak insanlarda alınacak enine bir kesitte aynı tübül içinde değişik aşamalara rastlamak mümkündür^{97,103,105}.

Varikoseledeki Histolojik Değişiklikler

Makroskobik olarak, varikosele, bulunduğu evreye ve etki süresine bağlı olarak testis büyüklüğünde belirgin azalmaya, hatta atrofiye sebep olmaktadır¹⁰⁷. Erişkinlerde, sol taraf varikoselin, karşı taraf testiküler hacim kaybıyla ilişkili olduğu da bildirilmiştir²⁷.

Varikosel için, dokuda patognomonik histolojik değişiklikler bulunmamaktadır. Değişiklikler, varikoseli olmayan düşük spermatogeneze sahip olgular ile benzer olup çok değişken özellik göstermektedir¹⁰⁸.

Histolojik değişiklikler arasında; Leydig hücre hiperplazisi, tübül başına düşen Sertoli hücresi sayısında azalma ve Sertoli hücre endoplazma retikulumlarında vakuolizasyon¹⁰⁹ ve muhtemelen buna bağlı germinal epitelde dökülme, maturasyon arresti, seminifer tübül bazal membranında kalınlaşma bulunmaktadır¹¹⁰.

Varikoselli insanlardan alınan testis biyopsi örnekleri çok değişkenlik gösterebilirler, öyle ki, Sertoli cell-only¹¹¹, spermatojenik arrest¹¹², hipospermatogenez ve normal spermatogenez¹¹³ tabloları izlenebilir. Sol taraf varikoselli erkeklerde, bilateral testiküler biyopsi yapıldığında, her iki testis de benzer histoloji ve benzer Johnsen skorları göstermişlerdir. Bu da hem bir sol taraf varikoselinin, bilateral etki gösterebileceğini hem de varikoselin tüm seminiferöz dokuyu etkileyen altta yatan diğer patolojik faktörlerle beraber ortaya çıkabileceğini işaret edebilir¹¹⁴. Varikoselli olgularda, spermatozoonda, akrozom gelişmemesi, immatürite ve amorf baş anomalisine sık rastlanır¹¹⁵. Reaktif oksijen radikalleriyle ilişkili bir morfolojik özellik olarak da, sitoplazmik droplet varlığından ve bunun da sperm DNA hasarı ile korele olduğundan söz edilmiştir¹¹⁶.

Varikosel düzeyi ile spermatik ven duvar kalınlığı ve damar duvarındaki düz kas miktarı arasında doğrusal bir ilişkiden söz edilmektedir. Varikoselli olguların spermatik venleri üzerinde yapılan bir çalışma, dilate bir lümenle birlikte düz kas lif sayısının ve damar duvarı kalınlığının arttığını ve kas tabakasında normalde varolan sirküler tabakaya ilave olarak longitudinal bir tabakanın daha oluştuğunu göstermiştir¹¹⁷. Buna ek olarak, sağdaki kontrol grubu, internal spermatik ven ile karşılaştırıldığında varikosel venleri; biyomekanik özellikleri, artmış fibrozis ve çap artışına meyilli olması nedeniyle farklılık göstermektedir^{118,119}. Genel olarak ven, venül ve kapillerlerdeki vasküler değişiklikler arasında; intimal fibrozis ve media tabakasında kollajen artışı sayılabilir¹²⁰.

Elektron mikroskopi ve immunohistokimya çalışmaları, varikoselde, peritübüler lamina propria sklerozisi, laminin ve kollajen tip IV kaybını ortaya koymuştur^{121,122}. Kan-testis bariyerinin ultrastrüktürel çalışmalarında, "Sertoli-

Sertoli bağlantı komplekslerinin” normal görüldüğü ve bazal kompartmanının korunduğu gösterilmiştir⁶³. Bu bulgular hayvanlardaki fonksiyonel çalışmalarla da doğrulanmıştır⁶⁴. Ancak bunun aksine, Pelletier ve arkadaşları, germ hücrelerinin azaldığı tübüler alanlarda Sertoli hücreleri arası bağlantılarda ve peritübüler bazal laminada değişiklikler rapor etmişlerdir¹²³. Spermatojenik hücreler, elektron mikroskopik olarak çeşitli değişiklikler gösterse de, esas kayda değer değişiklikler bazı tübüllerdeki spermatidlerde gözlenmiştir. Bu hücrelerin, nükleuslarında, anormal kromatin dağılımı, sitoplazmalarında küçük vakuoller, membranöz cisimler ve akrozomlarında ise düzensizlikler içerdiği gözlemlenmiştir. Ortak bir akrozoma sahip binükleer spermatidler sıkça görülmüştür¹²⁴. Erişkin varikosel olgularında, özellikle en iç tabakalardaki ekstrasellüler elemanların artışı yüzünden oluşan ilerleyici tarzda bir lamina propria kalınlaşması ve germinal epitele doğru derin girintiler defalarca gösterilmiştir^{121,124,125}. Romeo ve arkadaşları, varikoselli hastaların bazılarında, myoid hücrelerin normal bir ultrastrüktüre sahip olmakla birlikte artmış bir ekstrasellüler matriks içinde yer aldıklarını ve bu artan matriksin germinal epitele doğru derin girintiler gösterdiğini saptamışlardır. Yine çok nadir de olsa bazı hastalarda, bu myoid hücrelerin membranlarında düzensizleşme ve sitoplazmik uzantılarında, mikrofilamanlarda ve elektron yoğun cisimlerde azalma gözlenmiştir¹²⁶. Buna ek olarak, desmin açısından immünopozitif olan hücrelerde (miyofibroblastlar) azalma, vimentin açısından immünopozitif olan hücrelerde (fibroblastlar) artma belirlenen bir çalışma ile desteklenmiştir¹²¹.

Apopitozun Işık, Elektron Mikroskopik ve Biyokimyasal Özellikleri

Morfolojik olarak birbirinden ayrı iki tip hücre ölümünün varlığının ilk bulguları, Avustralyalı patolojist, John Kerr'den gelmiştir. Sonrasında yapılan EM çalışmalarında, Kerr, bu fenomeni “büzüşme nekrozu” olarak tanımladı. 1972’de Andrew Wyllie ve Alistair R. Currie ile birlikte, British Journal of Cancer’ de bir makale yayınlarak, bu aktif süreci nekrozdan ayırt etmek için “apoptosis” terimini kullandılar¹²⁷. “Apoptosis” terimi, yunan kökenlidir ve yaprak dökülmesi anlamına gelmektedir.

Elektron Mikroskopik Morfolojik Özellikler;

Apoptozis, hücreleri, asenkron ve tipik olarak inflamatuvar değişiklik olmaksızın etkiler. En erken gözlenen olay, keskin sınırlı, yoğun, ince granüler hilal şeklinde çekirdek zarına bitişik kütle oluşturmak üzere *kromatinin kondensasyonudur*. Kondanse kromatinin nükleusa oranı, hücre tipine göre değişir; örneğin lenfoid hücrelerde yüksek, az heterokromatinli hücrelerde düşüktür. Nükleer porlar, kondanse kitlelerin yakınında nadiren gözlenirken, nükleer zarın geri kalan kısımlarında belirgin bir şekilde gözlenirler. Nükleolar değişiklikler de oluşur, ancak bunlar sadece kesitlerin bazı seviyelerinde görülmektedir^{128,129}.

Bu nükleer değişimlerle apoptotik hücreler, komşu hücrelerden ayrılır; desmozomları ayrılır. Hücre yüzey özelleşmeleri (mikrovilluslar gibi) kaybolur. Hücre hacmi azalır, yoğunluğu artar, sitoplazmik organeller kompakt hale geçer, hücrenin ve nükleus taslağının kıvrımları görünür. Nükleus, çoğu çift membranla sınırlı birçok ayrı fragmana parçalanabilir ve hala kromatin ayrımı yapılabilir. Bunlar, kondanse kromatin içerir ve yüzey kabarıntılarının oluşması (blebing) esnasında ayrılırlar. Her fragmanda kromatin içeriği ve ebatı değişir; kondanse kromatin tüm enine kesiti kaplayabilir veya periferde hilal şeklinde kalabilir. Nükleer kıvrımlanma ve fragmentasyon, timositler gibi yüksek nükleer/sitoplazma oranına sahip hücrelerde sınırlanır. Bu esnada, sitoplazmada, hücre yüzeyine paralel ışınlar halinde sitoskeletal filamanlar toplanır; ribozomal partiküller semikristalin yapılar şeklinde kümelenir; kaba endoplazmik retikulumlar, konsantrik sarmallar oluşturacak şekilde tekrar düzenlenir; düz endoplazmik retikulumdan gelişen ve plazmalemma'nın altında yerleşen sayısız vakuoller, plazma membranı ile birleşip tarayıcı elektron mikroskop (SEM) ile gözlenebilen krater tarzında yapılar oluşur. Bol sitoplazmalı hücreler, geniş yüzey kabarıntıları (bleb) ve çıkıntılar oluştururlar ve en iyi SEM ile demonstre edilebilirler^{128,129,130,131,132}.

İn vivo, apoptotik cisimler, komşu epitel hücrelerince, mononükleer fagositlerce veya tümör hücrelerince oluştuktan hemen sonra fagosite edilirler. İnterapitelial makrofajlar, kısmen, glanduler epitelde oluşan apoptotik cisimlerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar ve sayıları, glandular atrofi ve involüsyonda, mononükleer fagosit göçü ve mitoz ile artar^{130,131}. BALB/c fare

timositlerinin, isolog peritoneal makrofajlarla koinkübasyon çalışması, apoptotik hücre yüzey karbonhidratlarındaki değişimleri tanıyan makrofajın, yüzeyindeki, lektin-benzeri moleküllerin varlığını ortaya çıkartmıştır ¹³².

Işık Mikroskopik Morfolojik Özellikler;

En erken ışık mikroskopik belirti olan ani hücre büzüşmesi, nükleer değişimlere bağlı simultane oluşur. Bu arada, kültüre hücrelerde komşu hücreler arası bağlantı kaybı da bunun delilidir. Büzüşme, muhtemelen, sodyum (Na⁺)-potasyum (K⁺)- klorür (Cl⁻) kotransporter sistemin inhibisyonundan dolayı net bir dışa sıvı akışından oluşur ^{128,133}.

Histolojik olarak, apoptotik cisimler, bazofilik nükleer materyalli veya materyalsiz, yuvarlak, oval sitoplazmik kitleler halinde görünürler. Çoğu apoptotik cisimler eozinofilik olsa da, pankreatik asiner hücreler gibi fazla ribozom içeren hücrelerden türeyenler bazofilik olabilir. Tomurcuklanmanın sınırlandığı hücrelerden oluşan apoptotik cisimler, orijinal hücre boyutundan hafif küçüktürler. Yaygın tomurcuklanmanın mümkün olduğu hücrelerde, ebat olarak apoptotik cisimler epeyce değişiktir, en küçüğü bile en az bir bazofilik nükleer fragman içerdiği takdirde ışık mikroskobu ile görülebilir. Yüksek nükleus/sitoplazma oranlı hücrelerden köken alanlarda, dar bir sitoplazma ile çevrelenen piknotik kromatin kitlesi şeklinde görülür. Diğer apoptotik cisimler ise, daha çok, değişik miktarda daha küçük nükleer fragmanların bulunduğu sitoplazma içerirler. Ultrastrüktürel olarak karakteristik hilal şekilli görülen kromatin kümeleri, 5µm'lik parafin kesitlerde nadiren görünür; bunun yerine kromatin, yoğun bazofilik kitleler olarak görülür. Kesitlerde, apoptotik cisimler, sıkça belirgin açık boşluklarda yer alırlar. Bunların bir kısmı, soluk boyalı makrofajlardaki cisimleri gösterir; diğerleri ekstrasellüler, doku hazırlanması esnasında büzüşme artefaktı sonucunda oluşan boşluk olabilir. Daha büyük, normal ve patolojik durumlarda uzun süredir bilinen ayrı apoptotik cisimler, farklı isimler alabilir. Bunlar, karaciğerdeki Councilman cisimleri, barsak kriptalarındaki karyolitik cisimler, lenf nodlarının germinal merkezindeki makrofajların tingible cisimleri, liken planusta Civatte cisimleri, ultraviyole radyasyon sonrası güneş yanığı hücrelerini kapsar ¹²⁸.

Apoptotik cisimler, dokuda, dağınık kümeler halinde olabilir. Bunlar, tek tek hücrelerin fragmantasyonu sonucu oluşabilir veya tek bir fagositte, tipik olarak makrofajda, birkaç hücreden oluşan apoptotik cisimlerin toplanıp oluşturduğu daha büyük agregatlar şeklinde olabilir. Apoptotik cisimlerin sayıları yüksekse, makrofajlarda degradasyon, lipofuskin pigment oluşumuyla sonuçlanır. İlgili çekici şekilde, apoptotik cisimlerin fagositozunda, makrofajlar, inflamatuvar mediatör salınımıyla cevap vermezler^{128,134}.

Apoptotik cisimlerin küçük ebatları ve kısa yarı ömürleri, inflamasyonun yokluğu, apoptotik hücreler uzaklaştırıldığında kalan hücrelerin, hücre sıralarını kapatması, apoptozisi, hücre delesyon oranının yüksek olduğu zamanda bile, göreceli olarak histolojik açıdan az göze çarpar hale getirir. Apoptozis oranında küçük artışlar bile epeyce artmış hücre kaybıyla ortaya çıkar. Örneğin; intravenöz bolus anti-CD4 antikoru uygulanması apoptotik indeksi, sıçan lenf nodlarında, %0,06'dan %1,33'e yükseltir, bu da lenf nodundaki toplam hücre sayısını 48 saatte yarıya indirmek için yeterlidir¹³⁵. Rezidüel hücrelerce hücre sıralarının kapatılması, makul bir doku büzüşmesi ve sıkça normal yapının çok az bozulması ile sonuçlanır. Böylece indüklenen atrofinin tamamlanması sırasında, karaciğer ve adrenal bezler, yapısal olarak normal görünümündedir^{136,137}.

Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri;

Apoptozis işlemi, enerji gereksinimi olan bir süreçtir. Fizyolojik hücre ölümünü, belli fazlara bölmek uygun olur. En erken faz, apoptotik cevabı başlatan stimulus fazıdır. Bu, yüzey reseptörleri aracılığıyla yayılan bir eksternal sinyal olabilir veya bir ilaç, toksin veya radyasyon etkisiyle hücre içinden orijin alabilir. İkinci faz, sinyalin veya metabolik durumun saptanması ve sinyal iletimini içerir. Sinyal iletim yolları, bu mesajı, hücre ölümü efektör mekanizmasına iletir. Effektör faz ise, hücre ölüm mekanizmasının üçüncü kısmıdır ve pozitif ve negatif regülatörleri ile beraber proteazların aktivasyonunu içerir. Dördüncü faz, hücre kromatininin kondanse olduğu ve DNA'sının degrade edildiği postmortem fazdır¹³⁸.

Hızlı nükleer DNA yarıklanmasına, uzun zamandır apoptozisin en önemli biyokimyasal göstergesi olarak bakıldı¹³⁹. Bu DNA degradasyonu, iki aşamada

oluşur. İlki, 200-300 kilobaz çiftlik fragmanlara ve/veya 50 kilobaz çiftlik fragmanlara yarıklanır¹⁴⁰. Nükleer zarfa doğru kromatin marjınasyonu, muhtemel morfolojik görünümdür¹⁴¹. İkincisi, apoptoza giden hücrelerin tamamını olmasa da çoğunu etkileyen, internukleozomal (nükleozomlar arası bağlayıcı bölgelerden) çift iplikli DNA yarıklanmasıdır, böylece oligonukleozomal ebatlı fragmanlar oluşur¹⁴².

Apoptotik hücre debrisleri, in vivo hemen fagosite edilirler. Bu yüzden, hücre rüptüre olmadan önce, apoptotik hücrelerin, fagositlerce tanınabilmeleri için plazma membran değişimlerini tamamlamaları gerekir. Gerçekten, plazma membran değişimlerinin, programlanmış hücre ölümünde çok erken oluştukları gösterilmiş^{143,144}. Son çalışmalar, canlı hücrelerde, plazma membranının iç yaprağında lokalize olan fosfotidilserinin kritik bir rol üstlendiği bilinmektedir. Apoptoza giden lenfositlerde, fosfotidilserinin dış yaprağa translokasyonunun, makrofajlar tarafından fagositik tanınmaya aracılık ettiği gösterilmiştir¹⁴³. Martin tarafından yapılan çalışmalarda, sıçangillerde ve birçok insan hücre tipinde, başlangıç stimulusu ne olursa olsun, fosfotidilserin eksternalizasyonu en erken olay olarak saptanmıştır¹⁴⁵. Önemli olan bir not da, fosfotidilserinin yanısıra diğer yüzey molekülleri de, fagositik tanınma ve apoptotik hücrelerin alınmasında şüphesiz çok önemlidir.

Apoptozise giden hücrelerde oluşan dramatik morfolojik değişikliklerden, sitoskeletal elemanlardaki değişimler ve yaygın sitoplazmik proteinaz aktiviteleri sorumludur. Cotter ve arkadaşları, mikrofilament topluluğunun, hücre fragmentasyonu ve apoptotik cisimlerin oluşumu için gerekli olduğunu göstermişlerdir. HL-60, Molt-4 veya U937 hücre dizilerinin, aktin polimerizasyonunda etkili cytochalasin B ile ön muamelesi, hücre tomurcuklanma ve apoptotik cisim oluşumunu engellemiş, ama nükleusu veya nükleer DNA'sının fragmentasyonunu bloke etmemiştir¹⁴⁶.

In vivo, apoptotik cisimlerin, lizis olmaması ve böylece inflamasyona yol açmadığı gerçeği, apoptotik hücrelerde, iki önemli olayı vurgular; membran integrasyonunun korunması ve ani tanınma ve fagositoz. Sitoplazmik proteinlerle, geniş çapraz bağlar kuran doku transglutaminazının (tTG) aktivasyonu, yüzey kabarıntılarının (bleb) oluşumunda ve intrasellüler içeriğin hücrede tutulmasında anahtar bir rol oynamaktadır¹⁴⁷. tTG, apoptotik cisimlerde, en yüksek konsantrasyondadır¹⁴⁸.

Apopitozis Mediyatörleri ve Hücre İçi Metabolik Değişiklikler;

Apopitozis çok sayıda ve çeşitte mediyatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında genler (c-myc)¹⁴⁹, bazı iyonlar (kalsiyum), proteinler (p53)¹⁵⁰ ve hatta organeller (mitokondri)¹⁵¹ bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum (Ca⁺⁺) girişi olur¹⁵². Sitoplazmada artan Ca⁺⁺, inaktif durumdaki Ca⁺⁺ bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptoze özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur¹⁵³. Ca⁺⁺ iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regulasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye Ca⁺⁺ girişi, apoptozun gerçekleşmesi için esansiyel değildir.

Kaspaz Ailesi ve Apoptozdaki Rollerini;

Kaspazlar (caspase-cysteine aspartate spesifik proteases), zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından, sistein proteazlar olarak adlandırılan bir enzim grubudur ve çok az rastlanan bir substrat alanı olan aspartik asitten, sonraki peptid bağına kırarlar^{154,155}. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır^{154,155,156,157,158}. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskata (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10), başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da (3, 6, 7), efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan PARP'ı parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim interlökin 1-β dönüştürücü enzimdir (ICE) ve prokaspaz 1 olarak bilinir¹⁵⁶.

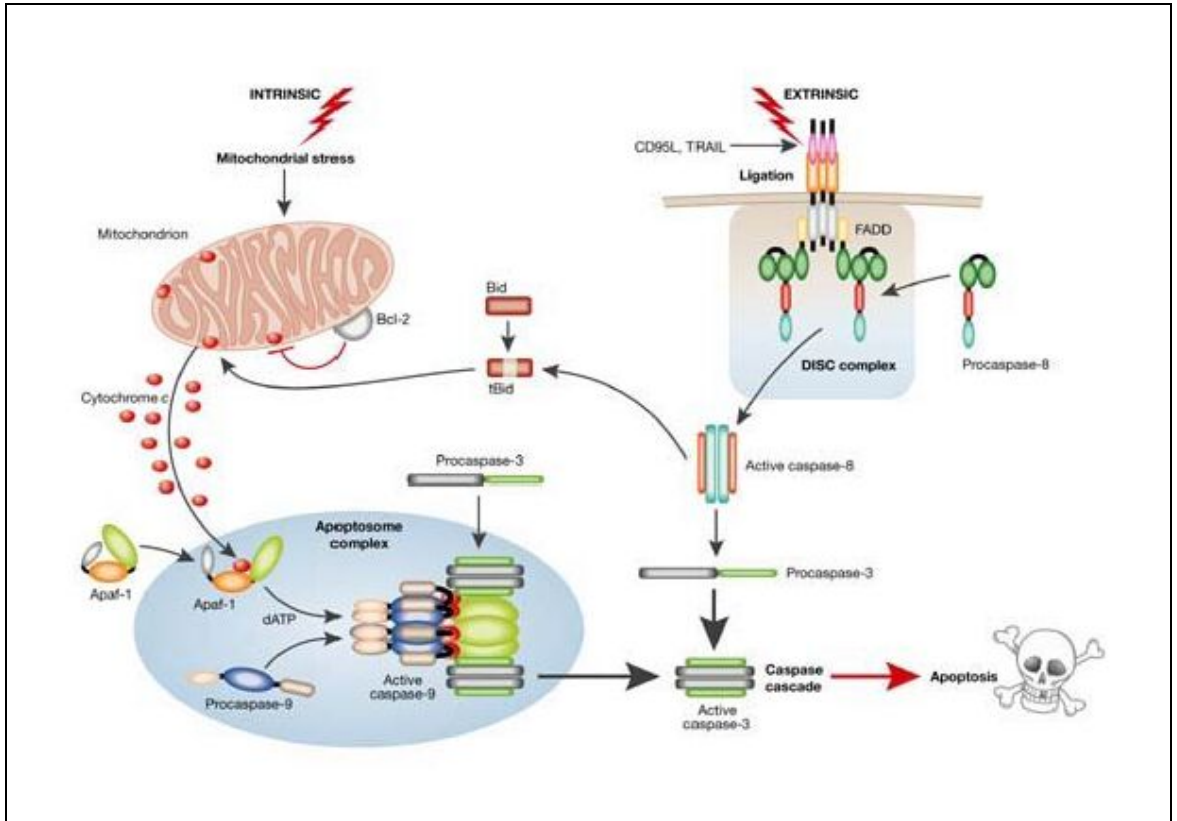
Kaspaz kaskadı, *mitokondri aracılı intrinsik yolla* sitokrom c'nin sitoplazmaya saliverilmesi sayesinde prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla

aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c'nin saliverilmesine neden olabilirler. Sitokrom C ile birlikte apopitoz indükleyici faktör (AIF) de sitoplazmaya salınır. Bu yolda, apopitotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) de görev almaktadır. Sitkrom C, ve Apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktive ederler. Aktif kaspaz 9 da kaspaz-3'ü aktive eder. Proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır. Ya da *ekstrinsik yolla* ölüm aktivatörlerinin (fas ligand-FasL- ve Tümör nekroz faktör-TNF-) hücre yüzeyindeki reseptörlerine [Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)] bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır. Bu bağlanmalar, ölüm domain proteinleri aracılığıyla olur. Kaspaz 8 de diğer kaspazları uyararak hücrenin fagositozuna yol açar (**Şekil 1**). Son mekanizma ise *endoplazmik retikulum aracılı apopitoz*dur. Kaspaz-12, endoplazmik retikulum membranında lokalizedir. Hücre içi Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin etkisiyle prokaspaz 12 aktifleşir ve sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Terminal uç olan aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir, böylece, ICAD'ın bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, caspase-activated deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apopitozisin karakteristik bulgularından biri olan, kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadarki mekanizma, kaspaz-bağımlı apopitozisi gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apopitozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apopitozis, yine mitokondriden saliverilen bir faktör olan AIF'ün etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat, AIF'ün etkilediği nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan apopitozun inhibitörleri (IAPs), kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. IAP'ler tarafından caspase-3, -7, ve -9'un inhibisyonunun yapısal temeli, son zamanlarda rapor edilmiştir^{154,155,157,158,159,160,161}. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP'ler, ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apopitozisi durdurabilirler.

Kaspazların sınıflandırılması¹⁶²:

- Kaspaz-1 (ICE)

- Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)
- Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)
- Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICEREII)
- Kaspaz-5 (ICEREIII, TY)
- Kaspaz-6 (Mch2)
- Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)
- Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)
- Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)
- Kaspaz-10 (Mch4)
- Kaspaz-11 (ICH-3)
- Kaspaz-12
- Kaspaz-13 (ERICE)
- Kaspaz-14 (MICE)



Şekil 1. Apoptoz / Kaspaz yolu

Kaspazların çoğu sitoplazmada bulunuyorsa da bazı üyeleri, örneğin kaspaz 12, Golgi apparatusunda, kaspaz 2, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mitokondri ile

ilişkide bulunabilir¹⁶³. En önemli başlatıcı kaspazlar, *tip I apopitoz (mitokondri aracılı, intrinsik)* için kaspaz 8, *tip II apopitoz (ekstrinsik)* için kaspaz 9, *tip III apopitoz (endoplazmik retikulum aracılı)* için kaspaz 12'dir. Kaspaz 3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönmüşsüz noktanın en önemli göstergesidir¹⁶⁴.

Varikoselde Apopitoz

Programlanmış hücre ölümü, memelilerde normal spermatogenez için gereklidir ve hücrel homeostazı sağlamlaştırdığına ve germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasındaki ince dengeyi koruduğuna inanılır¹⁶⁵. Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir¹⁶⁷. Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apopitozis gerçekleştiği bildirilmiştir¹⁶⁸. Apopitozis, spermatogenezde genellikle evre I, XII-XIV tübüllerde, spermatozoidler ve spermatogonyumlarda gerçekleşir^{166,168}.

Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir^{90,167,169,170,171,172}. Varikozel nedeni ile incelenen hastaların testislerinde oluşan hasarda apopitozun rolünü inceleyen bir çalışmada, testis histopatolojik incelemesinde olguların üçte birinde testiküler dokuda programlı hücre ölümünde anlamlı oranda artış saptanmıştır⁸⁵. Aynı şekilde, deneysel olarak varikozel oluşturulan erişkin tip ratlarda testis kan akımındaki artışa paralel olarak testiküler apopitoziste artma bildirilmiştir^{84,171}. Apopitozisin varikoselde azaldığına dair tek çalışma Fujisawa ve arkadaşlarıdır¹⁷⁴. Caruso ve Walsh ise deneysel varikozel modeli ile ipsilateral testis dokusunda gözlenen apopitozun operasyon sonrası 14. günde istatistiksel olarak artış göstermeye başladığını saptamışlardır¹⁷⁵.

Tesiküler apopitoza yol açan birçok mekanizma 3 noktada regüle edilebilir görünmektedir¹⁷⁶. *Hücrel membranda*, membran reseptörleri ile iletilen ölüm sinyalleri, Fas ligandı ile Fas bağlanması, kaspaz 8'in aktivasyonunu tetikler. Bir kere aktive oldu mu kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7 gibi efektör kaspazlara sinyal yollar. İmmünohistokimya ile Fas'ın germ hücreleri, Fas ligandın Sertoli hücreleri üzerinde lokalize olduğu tespit

edilmiş¹⁷⁷. *Sitoplazmada* ise, kaspazlar denilen sistein proteazları içeren sinyal iletim yolları bulunur¹⁵⁷. *Nükleer seviyede*, proapoptotik Bax genleri ve anti-apoptotik Bcl-2 genlerini içeren Bcl-2 ve p53'ü kapsayan spesifik apoptoz düzenleyici genler bulunur¹⁷³. Tüm kaspazlar birlikte, insan seminiferöz epiteline apoptozun regülasyonunda merkezi bir rol oynarlar¹⁶⁵.

Reaktif Oksijen Radikalleri ve Apoptoz

Apoptoz, reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir. Fisher ve arkadaşları, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) uygulanması ile spermatozoada ROS seviyelerinde artış gözlendiğini, bunun da mitokondriyal membran potansiyelindeki kayba aracılık ettiğini öne sürmüşlerdir¹⁷⁸. Moleküler seviyede, ROS, DNA'yı direk etkiler ve apoptozu indüklemenin en etkili yöntemlerinden biri olduğu bilinen intrasellüler kalsiyum seviyelerini değiştirir¹⁷⁹.

Hidrojen peroksidin apoptozu tetiklemede intrasellüler mekanizması tartışma konusudur. Bu molekülün kendisi reaktif olmayan bir yapıya sahiptir; peroksidatif hücresele toksik etkisinden, metal ile katalizlenen Fenton veya Harber-Weiss reaksiyonu sonucu üretilen oldukça reaktif hidroksil radikalının sorumlu olduğu düşünülmektedir¹⁸⁰. Bununla birlikte, Kasahara ve arkadaşlarının çalışmasında ise, hidroksil radikalının etkisizleştirilmesi için dimetil sülfoksit veya bir demir şelatörü kullanılmış ancak etkin bir koruma gözlenmemiştir¹⁸¹. Bu da apoptotik yolun peroksidatif hasarla bir bağlantısının olmadığını gösterir.

Diğer bir apoptozdan sorumlu olabilecek serbest radikal olan peroksinitrit, nitrik oksit ve süperoksidin etkileşimi ile oluşur ve birkaç hücre serilerinde apoptozu indüklediği görülmüştür^{182,183}. Varikoselli hastalarda, peroksinitrit üretimi için ksantin oksidazın nitrik oksit sentaz ile birlikte çalıştığı düşünülmektedir¹⁸⁴ ve normalde germ hücrelerinde saptanmayan endotelial nitrik oksit sentaz, insan testisinde, dejenere olan veya apoptotik germ hücrelerinde saptanmıştır⁸³.

Apoptozu açan nükleer düzenleyici proteininin (NFkB) aktivasyonu, Fas reseptörünün çapraz bağlanması ve kaspaz aktivasyonu gibi farklı

intraselüler sinyaller, intraselüler ROS üretimindeki artışla ilişkilidirler^{185,186}. Fas sisteminin, testisteki germ hücre apoptozunda anahtar bir düzenleyici olduğu bilinmektedir¹⁷⁷.

PARP (Poli ADP-Riboz Polimeraz)

DNA tamir enzimi, Poli (ADP-Riboz) Polimeraz (PARP), aynı zamanda Poli (ADP-Riboz) Sentaz (PARS) veya Poli (ADP-Riboz) Transferaz (PART) olarak da bilinir ve hücre canlılığının devamında önemli bir rol üstlenir. Hem apoptozda kaspaz-3 tarafından yarıklanması ile, hem de klasik nekrozda da önemli roller üstlenir¹⁸⁷. Nükleer PARP, uzun dallı Poli (ADP-Riboz) (PAR) zincirlerinin, substratı olan nikotinamid adenin dinükleotitten (NAD) alınarak özellikle PARP'ın kendine olmak üzere çeşitli nükleer proteinlere eklenmesinin katalizlenmesi için, DNA iplik kırıkları tarafından selektif olarak aktive edilir. Reaktif oksijen radikalleri gibi DNA hasarına yol açan stimulusların yoğunluğu, hücrenin canlılığını devam ettireceğini ya da apoptoza mı nekroza mı gideceğini belirler. Birinci yolda, hafif DNA hasarı sonucunda poli ADP-Ribozilasyon ile DNA tamiri gerçekleşir ve hücre canlılığını korur. Orta şiddetli genotoksik uyarılar hücreyi apoptoza sürükler. Masif DNA hasarı, PARP aktivitesinin aşırı artışına neden olur ki bu durum da hücrenin NAD seviyelerinin hızla tükenmesine yol açar. Enerji metabolizmasında önemli bir koenzim olan NAD'ın tükenmesi, daha az adenozin trifosfat (ATP) üretimiyle sonuçlanır. Dahası, hücre, NAD'ı tekrar sentezlemek amacıyla ATP'yi daha da tüketecektir ve bu enerji krizi hücre ölümüyle sonuçlanacaktır. Aşırı DNA hasarını takiben oluşan PARP aracılı hücre ölümü genel görüşü, selektif PARP inhibitörlerinden faydalanarak hücre ölümünün engellendiği ve hedef PARP geni delesyonu ile hücre ölümünden korunduğu çalışmalarla desteklenmektedir¹⁸⁷.

Poli ADP-Ribozilasyonu, kromatin kondensasyonu, DNA replikasyonu, DNA tamiri, gen ekspresyonu, malign transformasyon, hücrenin diferansiasyon ve apoptoz gibi çeşitli fizyolojik olaylarda yer alır. Nükleer PARP aktivitesi, tüm vücutta özellikle immün sistem ve germ hücrelerinde çoktur¹⁸⁷.

PARP'ın apoptozun ana özelliklerinden birisi olarak karakteristik fragmanlara proteolitik yarıklanması ise ilk kez Kaufmann ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır¹⁸⁸. Apoptotik hücre ölümü sırasında, gelişmiş ve

geçici PARP-1 stimülasyonu, erken apoptotik hücrelerde, poli ADP-Riboz birikimine neden olur¹⁸⁷. PARP, programlanmış hücre ölümünde, etkin şekilde yarıklanır ve N-terminal DNA bağlayıcı bölgeyi içeren 24 kDa'luk ve merkezi otomodifikasyon bölgesi, C-terminal NAD bağlayıcı ve katalitik bölgeleri içeren 89 kDa'luk fragmanlara ayrılarak inaktive edilir¹⁸⁹. N-terminal p24 fragman DNA uçlarına dönüşümsüz bağlanabilir ve düşük afinitede de olsa sağlam PARP-1 gibi hem DNA kırıkları hem de RNA bağlayabilir^{190,191}. Apoptotik DNA bağlayıcı bölge fragmanı, NAD hidrolizini inhibe etmek ve hücrenin enerji seviyesini korumak amacıyla proteolitik yarıklanma ile işbirliği yapar. Bu açıdan, PARP-1 yarıklanması, DNA tamiri ile indüklenen hücre canlılığını önleyerek ve enerji yokluğu sonucu oluşan nekrozu bloke ederek apoptozu destekler. P24 fragmanı nükleolar lokalizasyonu korurken p89 fragmanı nukleoplazmaya doğru yer değiştirir¹⁹². P89, sağlam PARP ile etkileşime girer ve enzim aktivitesi için esansiyel olan PARP homodimerizasyonunu bloke eder¹⁹³.

PARP İnhibisyonu ve Apoptoza Etkisi

PARP'ın aktivasyonu, günümüzde oksidatif stresi kapsayan değişik doku hasar tiplerinde bir ortak nihai efektör mekanizma olarak tanımlanmaktadır^{194,195,196}. Apoptotik süreçte PARP'ın yarıklanması, indirek olarak beraberinde devam eden PARP aktivasyonuna karşı enerji deposunu koruyarak yine apoptozun gerçekleşmesini kolaylaştırır. Dolayısıyla PARP'ın yarıklanması apoptozun gerçekleşmesi için çok önemlidir.

PARP, DNA tamirinde esansiyel olsa da aşırı aktivasyonu hücre ölümüne yol açabilir. Bu konuda iki yönde de çalışmalar bildirilmektedir. Mizutani ve arkadaşlarının çalışması, doksorubisin verilmesi sonucu indüklenen apoptozun, PARP aktivasyonu, hem NAD⁺ hem NADP⁺ düşüşü ve sonrasında NAD(P)H Oksidaz aktivasyonu sayesinde olduğu göstermiştir. Kullandıkları PARP inhibitörü ile bu apoptozun azalması da bu görüşlerini destekler niteliktedir¹⁹⁷. NADPH oksidaz, redoks potansiyelini dengelemek için görev alırken bu arada mitokondriyal membran potansiyeli değişimi artmaktadır ve sonuçta kaspaz-3 aktivasyonu ile apoptoz meydana gelmektedir. PARP-/- hayvan çalışmalarında, DNA alkilleyici ajanlara maruz bırakılan hücrelerin normal hücrelere oranla daha fazla ve hızlı apoptoza girdikleri görülmüştür¹⁹⁸.

Orta derecelerde DNA hasarı sonrası PARP inhibitörleri uygulandığında, baz eksizyon tamir işlemi gerçekleşmez. DNA kırıkları ortamda birikir, hücre siklusu duraklar ve replikasyon azalır. Sonuçta apoptosis gözlenir¹⁹⁹. Nükleer proteinlerin PARP-1 aracılı poli ADP-Ribozilasyonu apoptoz için gerekli olabilir.

Yine son zamanlarda, masif DNA hasarına cevaben PARP-1'in aktivasyonunun, apoptoz indükleyici faktör bağımlı apoptoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir²⁰⁰. Bu yol muhtemelen kaspazdan bağımsızdır ve apoptoz indükleyici faktörün mitokondriden nükleusa translokasyonu ile karakterizedir. Nükleusta, apoptoz indükleyici faktör, yüksek molekül ağırlıklı DNA fragmentasyonunu indükler²⁰¹. Apoptoz indükleyici faktörün, kaspaz bağımsız apoptozun erken bir efektörü olduğu tespit edilmiştir. Kaspaz bağımlı sürece paralel veya ondan daha önce fonksiyon gösterebilmektedir. Nöronal hücrelerde, N-methyl-N'-nitro-N'-nitrosoguanidine (MNNG) ile indüklenen apoptozun PARP-1 bağımlı ancak kaspazdan bağımsız olduğu bulunmuştur²⁰⁰. PARP-1 kimyasal inhibitörlerinin, apoptoz indükleyici faktörün nükleusa translokasyonunu engellediği gözlenmiştir. Bu sebeple, bu çalışma, PARP-1'in apoptozun başlangıcında rol oynadığını öngörmektedir.

Bu konuda hücre tipi farklılıklarına ve apoptozu indükleyen koşulların farklılığına bağlı olarak zıt yönde çalışmalar yayınlanmıştır. Bu çalışmaların ışığında, sunulan çalışmada, varikoselde artan reaktif oksijen radikallerin yol açtığı DNA hasarının ve artan apoptotik sürecin, PARP inhibitörü olan 3-aminobenzamid ile azaltması hedeflendi.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

DeneY Grularının Oluşturulması

Deneysel sũrece başlamadan önce planlanan çalışmaya dair, Mersin Üniversitesi Tıp Fakũltesi Etik Kurul'undan onay alındı. Çalışma, Mersin Üniversitesi Tıp Fakũltesi Deneysel Hayvan Laboratuvarında gerçekleştirildi ve çalışmada 26 adet erişkin erkek rat (ortalama 60 gũnlük) kullanıldı. Ratların ağırlıkları 250-350 gr. arasında değişmekte olup ortalama ağırlıkları 300 gramdı. Hayvanlar, sabit sıcaklık ve nem oranında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olan standart laboratuvar ortamında barındırıldı. Barınma sũresince deney hayvanları, standart beslenme, barınma ve bakım koşullarına tabi tutuldu.

Ratlar toplam 4 gruba ayrıldı (şekil 2). Cerrahi sırasında mikro cerrahi setler kullanıldı.

Grup 1: Kontrol grubu (n=6). Herhangi bir işleme tabi tutulmadı. 30. gũnde sakrifiye edildi.

Grup 2: Sham grubu (n=6). Sol renal ven etrafı ipek sutur ile dönüldü, ancak ligasyon yapılmadan bırakıldı. 30. gũnde sakrifiye edildi.

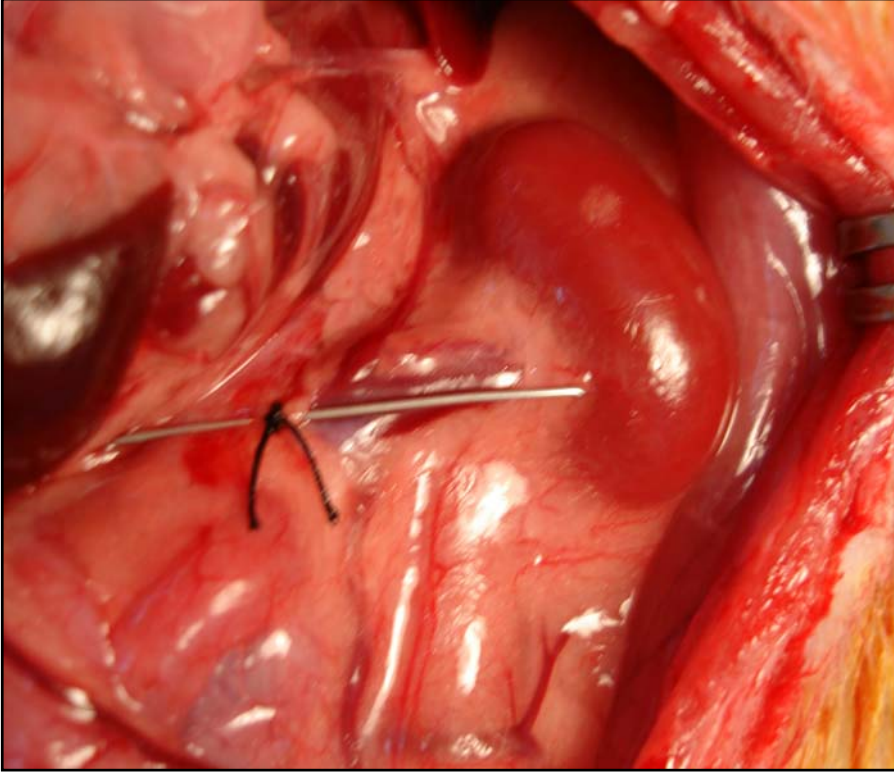
Grup 3: Varikozel grubu (n=5). Anestezi sonrası sol renal ven parsiyel ligasyonu ile sol varikozel oluşturuldu. 30. gũnde sakrifiye edildi.

Grup 4: Varikozel + 3-aminobenzamid grubu (n=9). Varikozel oluşturulup 30. gũnden itibaren gũnde iki kez intraperitoneal 3-aminobenzamid (10 mg/kg) injeksiyonu yapıldı²⁰². İlaç zeltisi için steril distile su çözücü olarak kullanıldı.

Deneysel Varikozel Protokolü ve Testis Eksizyonu:

Ratlara, anestezi uygulaması olarak intraperitoneal % 5 ketamin hidroklorür (50-100 mg/kg) verildi. Deneysel varikozel etkisi, sol renal venin ve/veya sol testiküler venin kısmi obstrüksiyonu ile oluřturuldu²⁰³. Bu işlem, testisin vasküler yapısının ve plexus pampiniformisin dilatasyonu ve konjesyon ile kısmi tıkanıklığın devamını sağlamaktadır. Median abdominal insizyon ile batin açıldıktan sonra sol renal ven diseke edildi. Varikozel modeli oluşturulacak ratlarda (grup 3 ve 4'te toplam 14 rat), renal venin etrafı bir right angle yardımı ile dnldkten sonra 4/0 ipek geçildi. 22 Gauge anjiyoket (0,85 mm çap) renal

ven üzerine paralel olacak şekilde yerleştirildikten sonra sol internal spermatic venin renal vene döküldüğü noktanın proksimalinden 4/0 ipek sutur ile renal ven anjiyoketi saracak şekilde daraltıldı (**Resim 1**). Daha sonra anjiyoket çıkartıldı, bu sayede parsiyel ligasyon (yaklaşık %50 oranında daralma) sağlanmış oldu. Daha sonra 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sütürler ile batın 2 tabaka halinde kapatıldı.

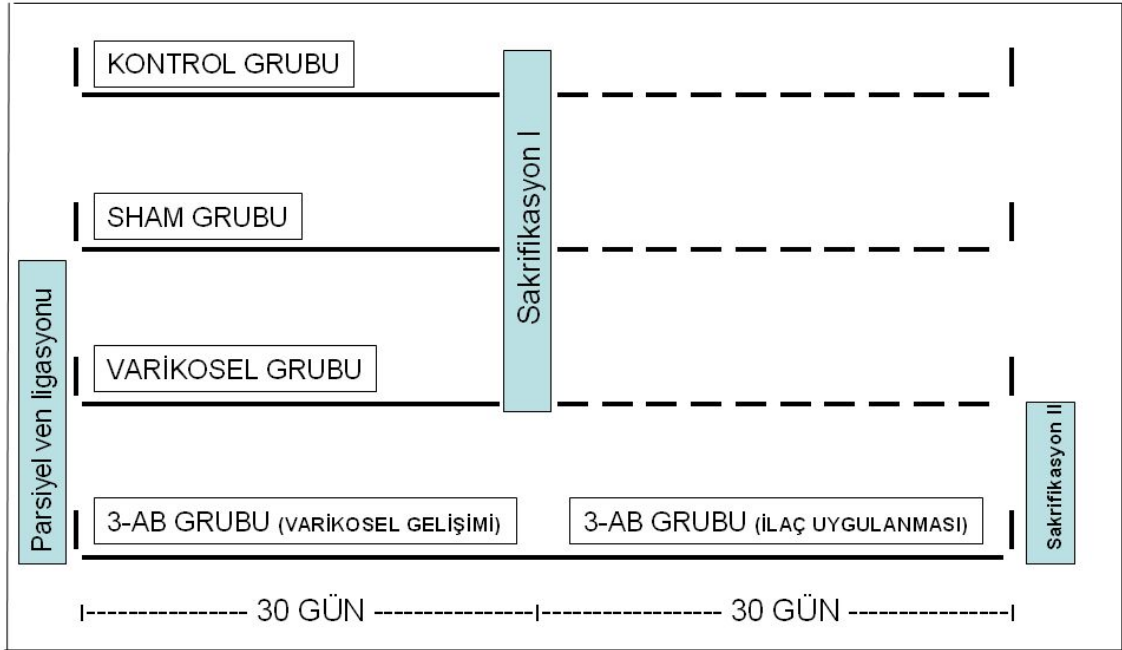


Resim 1. Varikozel modeli oluşturulması.(Renal venin daraltılarak varikozel modeli oluşturulması)

Deney modelleri oluşturulduktan sonra varikozel oluşumu için 30 gün beklendi. Bu sürenin bitiminde grup 1, 2 ve 3'deki ratlar sakrifiye edildi. Grup 4'deki ratlara ise, 30 günlük deneysel varikozel gelişim sürecinin ardından yaklaşık 4 hafta süreyle intraperitoneal 3-AB (10 mg/kg) uygulandı, ardından sakrifiye edildi (**Şekil 2**).

Sham grubundaki (grup 2) 6 hayvana ise, abdominal orta hat insizyon yapıldı. Sol renal ven serbestleştirilerek renal venin etrafı bir right angle yardımı ile döndürüldükten sonra 20 G anjiyoket (0,85 mm) renal ven üzerine paralel olacak şekilde yerleştirilerek sol internal spermatic venin renal vene girdiği yerin proksimalinden 4/0 ipek sütür ile renal venin etrafı döndürüldü ancak bağlanmadan

(daraltma işlemi yapılmadan) işlem sonlandırıldı. Daha sonra 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sütürler ile batın 2 tabaka halinde kapatıldı.



Şekil 2. Çalışma grupları

Sakrifikasyon işlemleri, İntrakardiyak yüksek doz ketamin enjeksiyonu yapılarak gerçekleştirildi. Çıkarılan testis dokuları, elektron mikroskopik inceleme için %2,5 gluteraldehit, ışık mikroskopik inceleme için ise %10'luk Bouin solüsyonu içine alınarak takip edildi. Ayrıca, dokudan enzim analizi için her deneğin testis dokusundan bir parça alınarak 2 ml'lik ependorflar içinde -20°C'ye konuldu.

Biyokimya Protokolü:

Ependorflarda -20°C'de saklanan dokular tartıldı ve ağırlıklarına uygun oranlarda hazırlanan fosfat tamponu ile homojenize edilerek (homojenizat) santrifüj tüpü içerisine konuldu ve buz içerisinde muhafaza edildi. Daha sonra, fosfat tamponu ile 1/10 oranında seyreltilen homojenizatlarda katalaz, süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) tayinleri yapıldı²⁰⁴.

MDA Metodu: MDA biyolojik sistemlerde serbest radikal aktivitesi ve lipid peroksidasyonunun göstergesidir. Ölçüm lipid peroksidasyonunun ürünlerinden MDA'nın, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonuna dayanır. Numune asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile 95°C'de ısıtıldı ve oluşan pembe renkli MDA-tiyobarbitürik asit kompleksi 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Katalaz Aktivitesi Tayini: Hidrojen peroksit (H_2O_2), ultraviyole spektrumu aralığında absorpsiyon verir. Absorbanstaki dakikalık azalma, enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. Deney ortamında, katalaz enziminin kataliziyle H_2O_2 'nin parçalanması, 240 nm dalga boyunda absorbanstaki azalma 1 dakika boyunca takip edildi.

SOD Aktivitesi Tayini: Ksantin- ksantin oksidaz sistemi ile süperoksit radikali üretilir. Ortamda SOD yoksa süperoksit radikali nitroblue tetrazoliumu (NBT) redükler ve mavi renk oluşur. Ortamdaki SOD miktarına göre süperoksit radikalinin ortadan kalkması ve nitroblue tetrazolium redüksiyonunun inhibe olması mavi rengin şiddetindeki azalmaya neden olur. Bu azalma 560 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Glutatyon Peroksidaz Aktivitesi Tayini: Hidrojen peroksitin ortamda bulunan Glutatyon Peroksidaz enziminin katalizi ile su ve singlet oksijene çevrilmesi ve bunun da redükte glutatyonu okside glutatyonla çevirme hızına dayanır. Okside glutatyonun oluşum hızı ortamdaki NADPH'nin NADP'ye çevrilmesi sonucu optik dansitenin 340 nm'de azalmasının takibi ile hesaplandı.

Işık Mikroskopik Doku Takip ve İnceleme Protokolü:

Doku Takip Protokolü²⁰⁵:

Testis dokuları, Bouin solüsyonu²⁰⁶ [%75 Pikrik Asit + %25 Formaldehit (%37'lik stok solüsyon) + % 5 Glasiyal Asetik Asit] içine alınarak 4–6 saat fikse edildi. Daha sonra dokular, Bouin solüsyonunu uzaklaştırmak amacıyla defalarca %70 Alkol ile yıkandı. Bu işlemin ardından, aşağıdaki protokole göre dokular parafine gömüldü (**Tablo 1**):

Tablo 1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Etil Alkol (%80)	45 dakika
Etil Alkol (%90)	45 dakika
Etil Alkol (%96)	45 dakika
Etil Alkol (%96)	45 dakika
Etil Alkol (%96)	45 dakika
Etil Alkol (%96)	45 dakika
Xylol	15 dakika
Xylol	15 dakika
Parafin (Etüvde 60°C'de)	1 saat
Parafin	1 saat
Parafin	3 saat
Bloklama	

Parafin bloklardan alınan 3 µm'lik kesitler, hematoksilin eozin ile boyandı. Tüm incelemeler, Olympus BX50 marka ışık mikroskobu ile yapıldı ve Nikon Coolpix 5000 dijital kamera ile resimleri çekildi.

Testiküler Histolojinin Değerlendirilmesi İçin Modifiye Johnsen Skorlaması:

Her hayvanın sol testisinden alınan enine kesitinde, 20 adet yuvarlak tübüler enine kesit, seminiferöz epitelin kalitesi açısından değerlendirildi. Aşağıda görüldüğü gibi, spermatojenik hücre tiplerinin varlığına veya yokluğuna göre 1–12 arası skor veren modifiye Johnsen metodu kullanıldı²⁰⁷.

1. Tübüler kesitte hiç hücrenin olmaması (tübüler skleroz),
2. Tübüler kesitlerde germ hücrelerinin olmaması, sadece sertoli hücrelerin gözlenmesi (sertoli cell-only).

3. Germ hücre olarak sadece spermatogonyum gözlenmesi.
4. Spermatozoa, spermatid, sekonder spermatositlerin olmaması, fakat çok sayıda spermatogonyum gözlenmesi.
5. Spermatozoa, spermatidlerin olmaması, fakat birkaç adet primer spermatosit gözlenmesi.
6. Spermatozoa ve geç spermatidlerin olmaması, fakat birçok primer spermatosit gözlenmesi.
7. Spermatozoa ve geç spermatidlerin olmaması, fakat birkaç sekonder spermatosit gözlenmesi.
8. Spermatozoa ve geç spermatidlerin olmaması, fakat birçok sekonder spermatosit gözlenmesi
9. Geç spermatidlerin olmaması, birkaç adet round spermatid gözlenmesi.
10. Geç spermatidlerin olmaması, çok sayıda round spermatid gözlenmesi.
11. Birkaç adet geç spermatid ve/veya spermatozoa gözlenmesi.
12. Çok sayıda geç spermatid ve/veya spermatozoa gözlenmesi

İmmünohistokimyasal Çalışma Protokolü²⁰⁸:

1. 3 µm kalınlığında alınan kesitler adheziv poli-L-lizin kaplı lamlara alındı.
2. Kesitlerin lamlara daha iyi tutunmasını sağlamak amacıyla, lamlar, oda ısısında bir gece bırakıldı.
3. Daha önce 60^olik etüve konmuş sıcak ksilol içinde 15 dakika bekletildi.
4. Ek olarak, oda ısısında 5'er dakikadan 3 kez ksilolde bekletildi.
5. Rehidratasyon aşaması için, derecesi giderek düşen alkollerde (sırasıyla %96, %90, %80) oda ısısında, 3'er dakika bekletildi.
6. Distile su ile yıkama aşamasından sonra kesitlerin kurumamasına dikkat edildi. Kesitlerin çevresi kurularak hidrofobik bir bariyer oluşturmak amacıyla pap-pen ile çizildi.
7. Dokular, antijen geri kazanımı amacıyla, 0,01 M Sitrat Tamponunda 10 dakika 700 Watt' da ısıtıldı.

8. Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) 5'er dakikadan 3 kez yıkandı.
9. Kesitler, distile su içerisinde hazırlanmış %3'lük H₂O₂ ile oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
10. PBS'de 5'er dakikadan 3 kez yıkandı. Kesitlerin çevresi kurulandı.
11. Sekonder antikorun hazırlandığı hayvanın türüne ait, PBS içerisinde hazırlanmış %2'lik normal serum ile blok solüsyonu hazırlandı ve kesitler, bu solüsyonda 1 saat inkübasyona bırakıldı.
12. Bu aşama ile primer antikorun konulması arasında PBS ile yıkama yapılmadı.
13. Daha önceden 100 cc PBS içinde 0,5 gram sığır serum albumini (BSA) çözülerek PBS-BSA hazırlandı. Dokular, bu PBS-BSA içerisinde, Kaspaz-3 poliklonal primer antikor (Biovision Inc.) için 1:20, PARP (Labvision Corporation – Neomarkers) poliklonal primer antikor için 1:200 oranında dilüe edilen primer antikorlarda oda ısısında 1 saat inkübe edildi. Negatif kontrol için ayrılan kesitler üzerine bu aşamada sadece PBS-BSA konuldu.
14. PBS'de 5'er dakikadan 3 kez yıkandı. Kesitlerin çevresi kurulandı.
15. PBS-BSA içinde 1:50 oranında dilüe edilmiş olan biyotinle bağlanmış olan sekonder antikorla 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
16. PBS'de 5'er dakikadan 3 kez yıkandı. Kesitlerin çevresi kurulandı.
17. Streptavidin peroksidaz solüsyonu dokular üzerine damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi.
18. PBS'de 5'er dakikadan 3 kez yıkandı. Kesitlerin çevresi kurulandı.
19. Diaminobenzidine (DAB) kromojeni kesitler üzerine damlatılır; 3-10 dakika arasında inkübe edilir. Renk tayin işlemi, mikroskop ile takip edildi.
20. Distile su ile 3-5 dakika yıkama yapıldı.
21. Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı (5 sn).
22. Kesitler, akarsuda, su berraklaşana kadar yıkandı.
23. Dehidratasyon aşaması için, derecesi giderek artan oranlarda alkollerde (sırasıyla %80, %90, %96) oda ısısında, 3'er dakika bekletildi.
24. Kesitler havada kurutulduktan sonra 2 kez 5'er dakika süreyle ksilolde tutuldu.
25. Lamlar entellan kullanılarak kapatıldı.

Apoptotik İndekslerin Hesaplanması

Apoptotik hücre sayım işlemi, kesit üzerinde X400'lük büyültmede, her testiste, seminifer tübüldeki pozitif işaretlenmiş germ hücreleri sayılarak yapıldı. Apoptotik germ hücresi sayıları, kesit başına düşen toplam seminifer tübül sayısına bölünerek apoptotik indeksler oluşturuldu.

Johnsen skorları ve apoptotik indeksleri çıkartılan kesitler, x400 büyültmede Olympus BX50 mikroskoba bağlı Nikon Coolpix5000 fotoğraf ataşmanı ile fotoğraflandı.

Elektron Mikroskopik Doku Takip Protokolü:

Dokular, fosfatlı tuz tamponu ile hazırlanmış %2,5'luk gluteraldehit solüsyonu ile 4–6 saat tespit edildi. Fosfatlı tuz tamponu ile 5 kez yıkanan dokular, ardından %1'lik Osmium Tetraoksit (OsO_4) ile 1 saat süreyle $+4^{\circ}C$ 'de ikinci kez fikse edildi. Dokular, modifiye edilen doku takip protokolünün²⁰⁹ (**Tablo 2**), dehidratasyon aşamasında, son %100'lük alkol değişimine kadar $+4^{\circ}C$ 'de işlem gördü. Sonraki işlemler oda ısısında gerçekleştirildi.

Tablo 2. Elektron Mikroskopik Doku Takip Protokolü

Fosfatlı tuz tamponu	10 dakika	+4°C
Fosfatlı tuz tamponu	10 dakika	+4°C
Etil Alkol (%50)	10 dakika	+4°C
Etil Alkol (%60)	10 dakika	+4°C
Etil Alkol (%70)	10 dakika	+4°C
Etil Alkol (%80)	10 dakika	+4°C
Etil Alkol (%90)	10 dakika	+4°C
Etil Alkol (%96)	10 dakika	+4°C
Etil Alkol (%96)	10 dakika	+4°C
Etil Alkol (%100)	15 dakika	+4°C
Etil Alkol (%100)	15 dakika	Oda ısısı
Propilen Oksit	15 dakika	Oda ısısı
Propilen Oksit	15 dakika	Oda ısısı
Propilen Oksit (3 birim) + Araldit (1 birim)	1 saat	Oda ısısı
Propilen Oksit (1 birim) + Araldit (1 birim)	1 saat	Oda ısısı
Propilen Oksit (1 birim) + Araldit (3 birim)	1 saat	Oda ısısı
Araldit	1 gece	Oda ısısı
Bloklama		

Gömme materyali:

Araldite	CY 212 (M)	20 ml
Sertleştirici	DDSA	22 ml
Hızlandırıcı	BDMA (C.3%)	1,1 ml
Plastikleştirici	Dibutul fitalat	1 ml

Gömmе materyali olarak kullanılan maddeler, belirtilen ölçülerde cam kaba aktarılarak 1 saat karıştırıcıda döndürüldü ve hava kabarcıklarının çıkması için bekletildi.

Aralditte 1 gece bırakılan doku parçaları, ertesi sabah yeni hazırlanan gömmе materyali kullanılarak 'size 3' beem kapsüllere gömüldü ve 18 saat boyunca 60°C'de etüvde polimerize edildi. Bloklardan, Leica UCT ultramikrotom ile 300 gözenekli bakır gridler üzerine alınan 70 nanometrelik kesitler, uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandı. Tüm incelemeler, JEOL JEM 1011 marka elektron mikroskobu ile yapıldı ve iTEM dijital görüntüleme programı ile fotoğraflandı.

İstatistiksel Analiz

Gruplar arasında apoptotik indeks değerleri açısından yapılan karşılaştırmalarda, endeks değerlerinin normal dağılım göstermemesi (normal dağılım testi = Shapiro Wilk) nedeniyle Kruskal Wallis metodu uygulanmıştır. Kruskal Wallis testi sonucu en az iki grup arasında farklılık görülmüş ve bu farklılığın hangi gruplar arasında anlamlı olduğunu tespit etmek için Dunn testi uygulanmış ve sonuçlar tabloya yansıtılmıştır.

Gruplar arasında biyokimya değerleri ve Johnsen skorlamaları açısından yapılan karşılaştırmalarda, ortalamaların normal dağılım göstermesi (normal dağılım testi = Shapiro Wilk) nedeniyle One-way ANOVA metodu uygulandı. One-way ANOVA testi sonucu en az iki grup arasında farklılık görüldü ve bu farklılığın hangi gruplar arasında anlamlı olduğunu tespit etmek için Tukey HSD testi uygulandı ve sonuçlar tabloya yansıtıldı.

BULGULAR

Biyokimyasal Sonuçların Değerlendirilmesi

Her grup için doku MDA ve antioksidan enzim aktivitelerinin [katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz (GPx)] spektrofotometrik olarak ölçülen değerlerinin ortalamaları alındı (**Tablo 3**). Bu ortalamalar, istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; MDA değerlerinin, varikozel grubunda, kontrol, sham ve varikozel + 3-AB grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu saptandı (sırasıyla p=,000, p=,000, p=,000). Antioksidan enzim değerleri açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**Tablo 4**).

Tablo 3. Gruplar arasında biyokimyasal değerlerine ait tanıtıcı istatistikler

GRUPLAR	MDA DEĞERLERİ (nmol/ml)X±SD	KATALAZ DEĞERLERİ (ü/gprotein)X±SD	GPx DEĞERLERİ (ü/gprotein)X±SD	SOD DEĞERLERİ (ü/gprotein)X±SD
KONTROL GRUBU	19,007±8,38	1554,681±521,83	2,914±3,84	98,963±55,93
SHAM GRUBU	16,765±11,12	955,114±556,17	2,463±1,95	68,043±82,28
VARİKOSEL GRUBU	59,306±19,43	1045,191±804,24	4,218±3,35	35,929±14,41
VARİKOSEL + 3-AB GRUBU	11,283±6,67	705,341±430,18	4,315±3,31	26,035±22,66

Tablo 4. Gruplar arasında MDA ve antioksidan enzim değerleri açısından varikozel grubu ile diğer gruplar arasında yapılan ortalama karşılaştırmaları

GRUPLAR		MDA 'P' değerleri	KATALAZ 'P' değerleri	GSHPx 'P' değerleri	SOD 'P' değerleri
VARİKOSSEL VS	KONTROL GRUBU	0,000	0,459	0,936	0,186
	SHAM GRUBU	0,000	0,994	0,842	0,713
	VARİKOSSEL + 3-AB GRUBU	0,000	0,704	0,999	0,984

Johnsen Skorlarının Değerlendirilmesi

Her hayvanın sol testisinden alınan enine kesitinde, 20 adet yuvarlak túbüler enine kesit seminiferöz epitelin kalitesi açısından değerlendirildi. Değerlendirme sonrası Johnsen Skoru ortalamaları, kontrol grubunda 11,87 (**Resim 2**), sham grubunda 11,91 (**Resim 3**), varikozel grubunda 9,65 (**Resim 4**) ve varikozel sonrası + 3-AB injeksiyonu yapılan grupta 11,86 (**Resim 5**) olarak saptandı (**Tablo 5**).

Tablo 5. Grupların Johnsen skorlarının ortalamaları

GRUPLAR	ORTALAMA JOHNSEN SKORLARI
KONTROL GRUBU	11,87
SHAM GRUBU	11,91
VARİKOSSEL GRUBU	9,65
VARİKOSSEL + 3-AB	11,86

Grupların ortalama Johnsen skorları karşılaştırıldığında, varikozel grubu ile kontrol, sham ve varikozel + 3-AB grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sırasıyla $p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,000$) (**Tablo 6**).

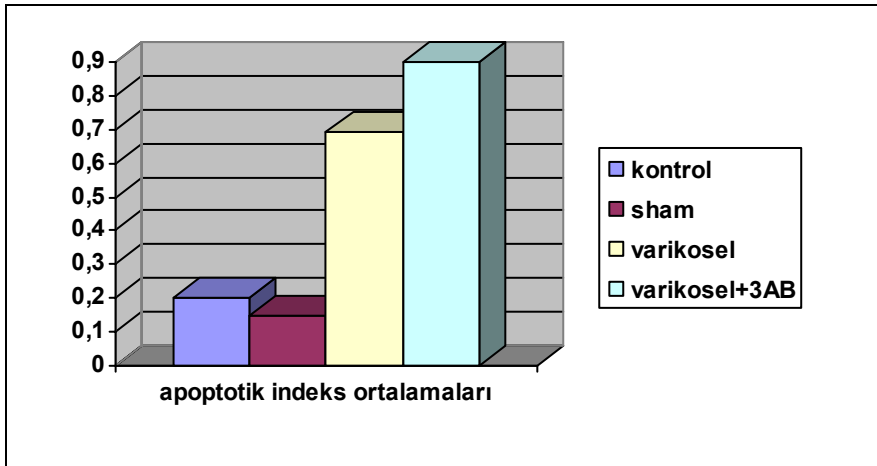
Tablo 6. Grupların Johnsen skoru ortalamalarının varikozel grubu (9,65) ile karşılaştırılması

GRUPLAR	ORTALAMA JOHNSEN SKORLARI	'P' DEĞERİ
KONTROL GRUBU	11,87	0,000
SHAM GRUBU	11,91	0,000
VARİKOSEL + 3-AB GRUBU	11,86	0,000

Apoptozun Değerlendirilmesi

Alınan doku örnekleri, Caspase 3 Poliklonal Antikoru ile işaretlenerek değerlendirildi. Değerlendirme sonrası ortalama apoptotik indeksler, kontrol grubunda $0,206\pm0,281$, sham grubunda $0,146\pm0,145$, varikozel grubunda $0,693\pm0,148$, varikozel+3-AB grubunda $0,902\pm0,176$ olarak bulundu (**Şekil 3**).

Şekil 3. Grupların apoptotik indeks ortalamaları.



Varikozel grubunda (**Resim 8**) ortalama apoptotik indeks, kontrol (**Resim 6**) ve sham (**Resim 7**) grubu ile karşılaştırıldığında belirgin şekilde artmış bulundu, ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla $p=,445$ ve $p=,175$) (**Tablo 7**). Varikozel oluşturulup ardından 30 gün süreyle intraperitoneal 3-AB uygulanan grupta (**Resim 9**) apoptotik indeks, kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış bulunurken (sırasıyla $p=0,007$, $p=0,001$), varikozel grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değişikliğe rastlanmadı ($p= 1,000$) (**Tablo 8**).

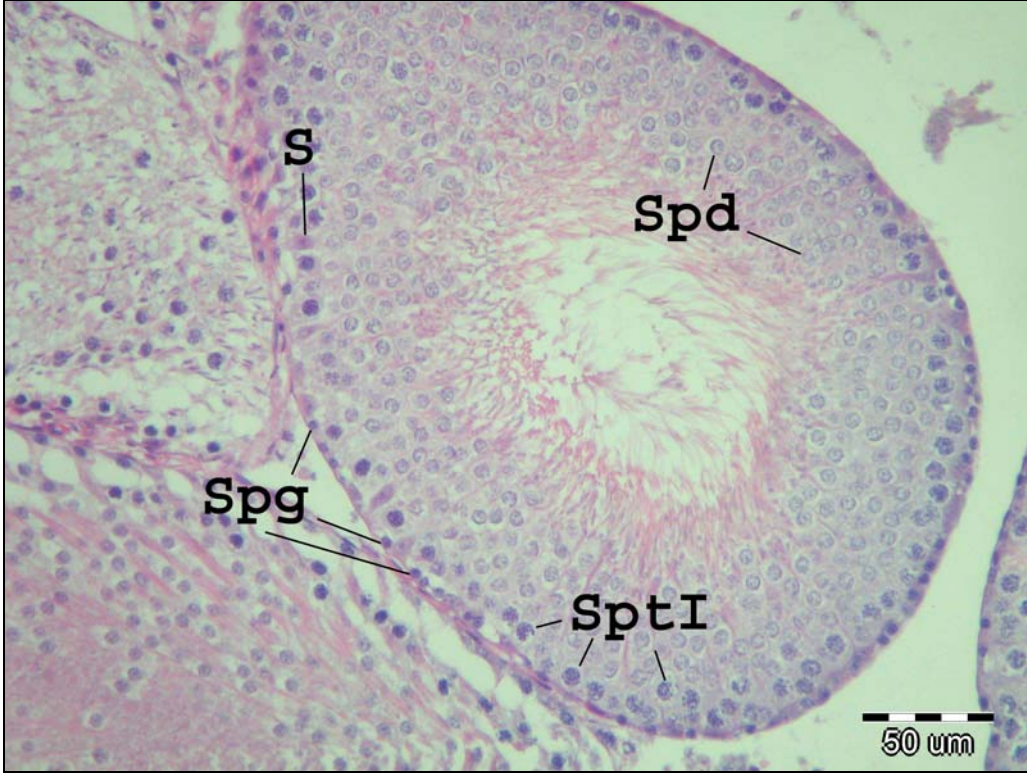
Tablo 7. Grupların apoptotik indeks ortalamalarının varikozel grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	APOPTOTİK İNDEKS ORTALAMASI	'P' DEĞERİ
KONTROL GRUBU	0,206	0,445
SHAM GRUBU	0,146	0,175
VARİKOSEL+3-AB GRUBU	0,902	1,000

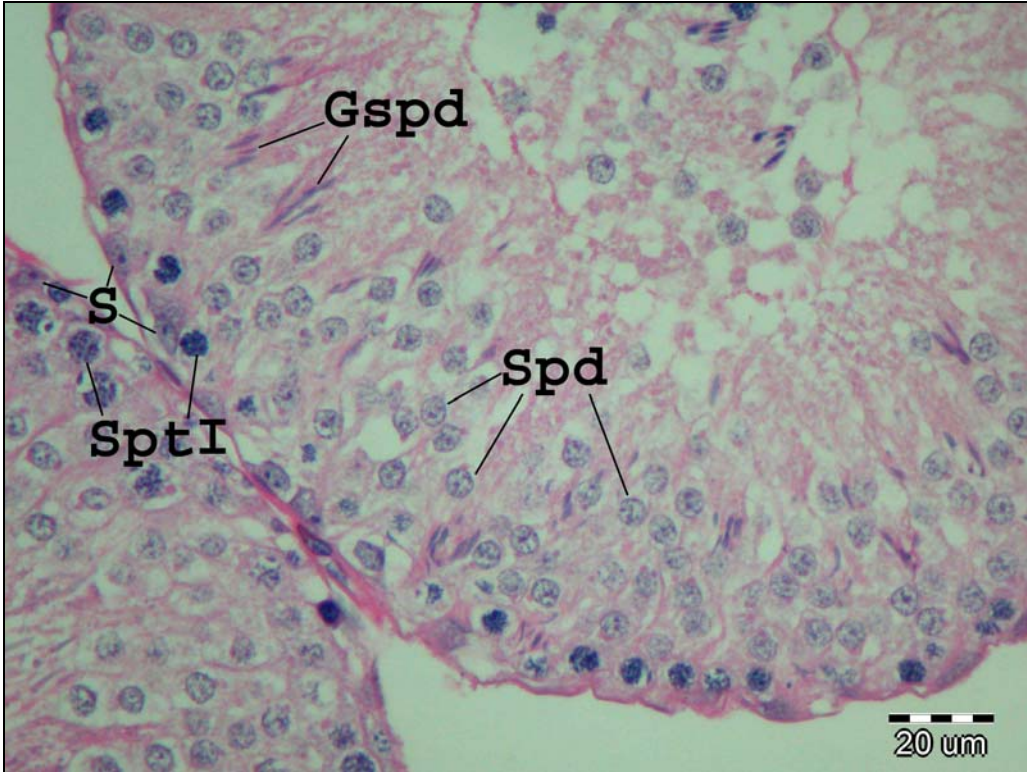
Tablo 8. Grupların apoptotik indeks ortalamalarının varikozel + 3-AB grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	APOPTOTİK İNDEKS ORTALAMASI	'P' DEĞERİ
KONTROL GRUBU	0,206	0,007
SHAM GRUBU	0,146	0,001
VARİKOSEL GRUBU	0,693	1,000

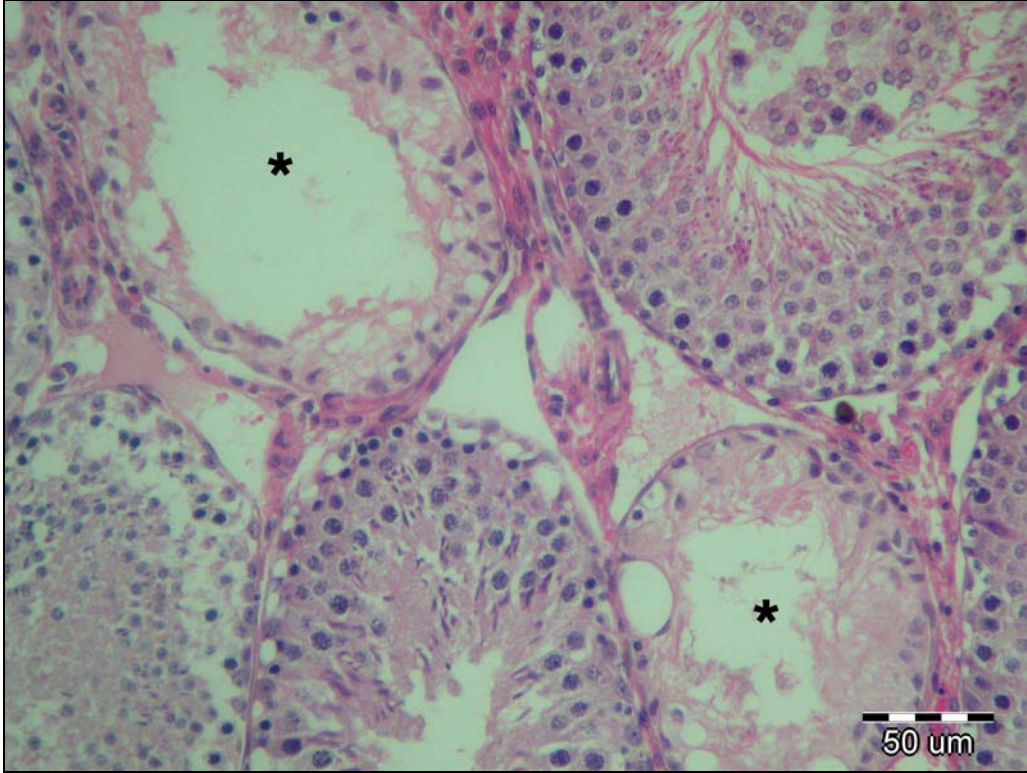
Kontrol ve sham grubunda, özellikle evre XIII tübüllerde apoptotik hücelere rastlandı (**Resim 6, 7**). Varikozel ve varikozel + 3-AB grubunda, apoptotik hücelerin özellikle evre VIII, IX ve XIII tübüllerde gözlemlendi (**Resim 8, 9**).



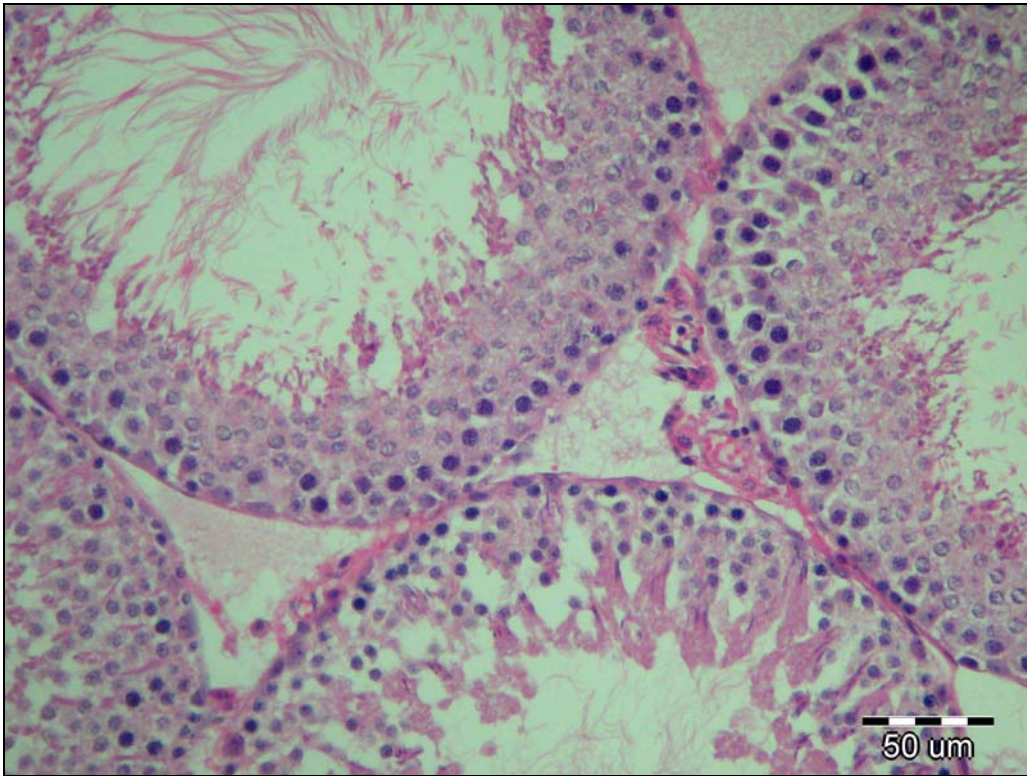
Resim 2. Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesitleri. Seminifer tübüllerin en büyük hücreleri, primer spermatositlerin (SptI) yanı sıra bazale en yakında bulunan spermatogonyumlar (Spg), onların da aralarında yerleşmiş Sertoli hücreleri (S), lümeneye yakın oldukça yoğun gözlenen erken spermatidler (Spd) gözlenmektedir X600 H&E.



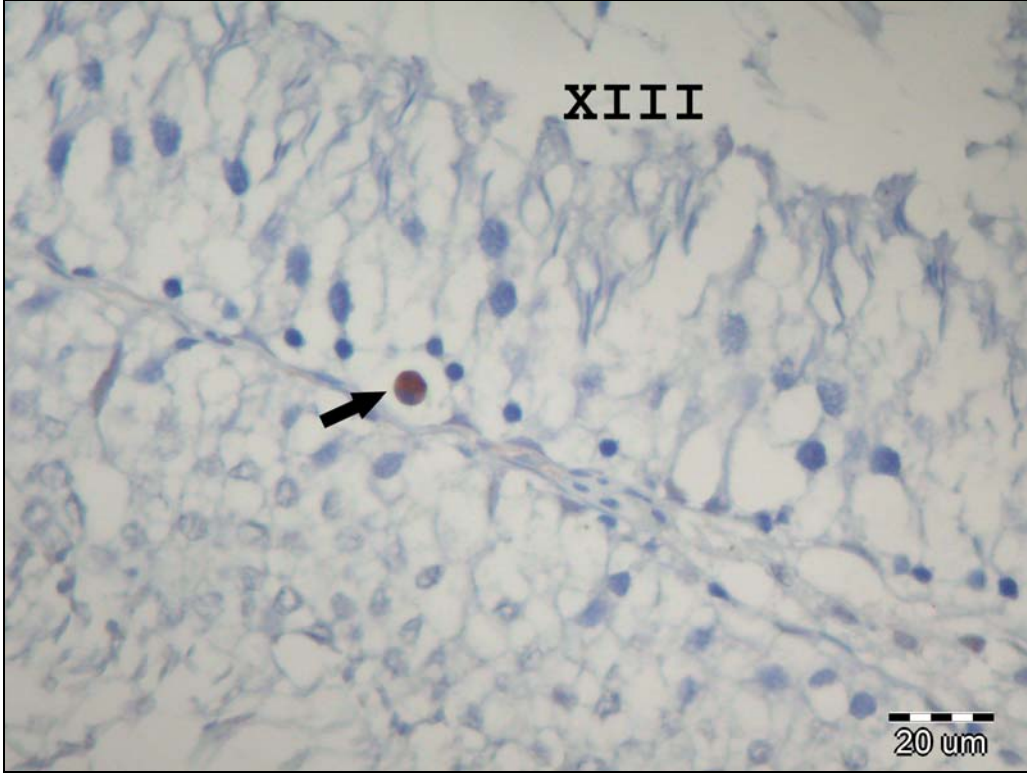
Resim 3. Sham grubuna ait seminifer tübül kesitleri. Profazın farklı evrelerindeki primer spermatositler (SptI), nükleolusları çok net izlenen Sertoli hücreleri (S), lümeneye yakın erken spermatidler (Spd) ve geç spermatidlerin (Gspd) kondanse nükleusları gözlenmektedir X1200 H&E.



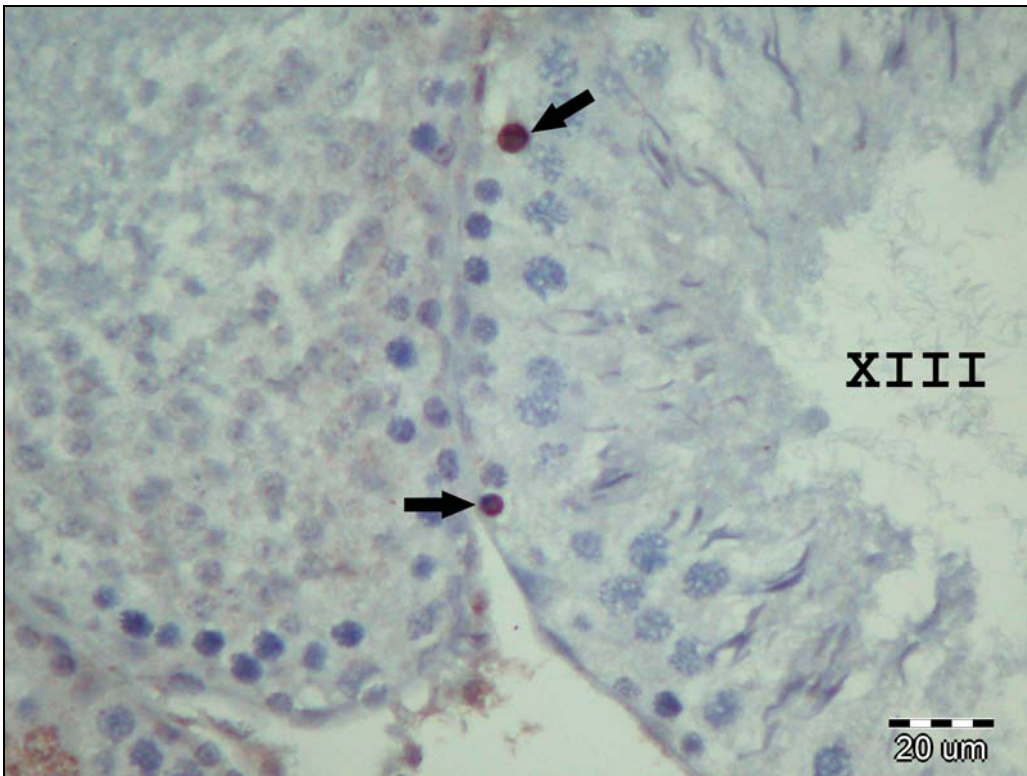
Resim 4. Varikosel grubuna ait seminifer tübül kesitleri. Varikoselin karakteristik özelliği olarak epitel morfolojisi bozuk tübüller yanında iyi morfolojiye sahip epitelli tübüller gözlenmektedir (yıldız) X600 H&E.



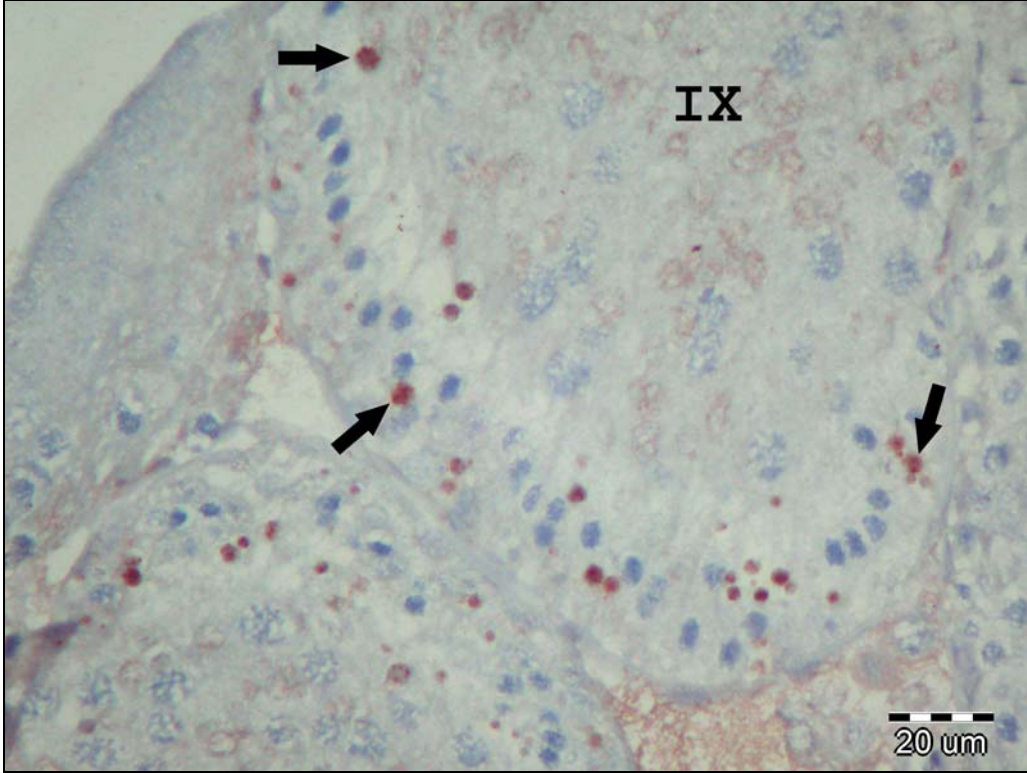
Resim 5. Varikosel + 3-AB grubuna ait seminifer tübül kesitleri. Seminifer tübül epitel morfolojisinin düzeldiği gözlenmektedir X600 H&E.



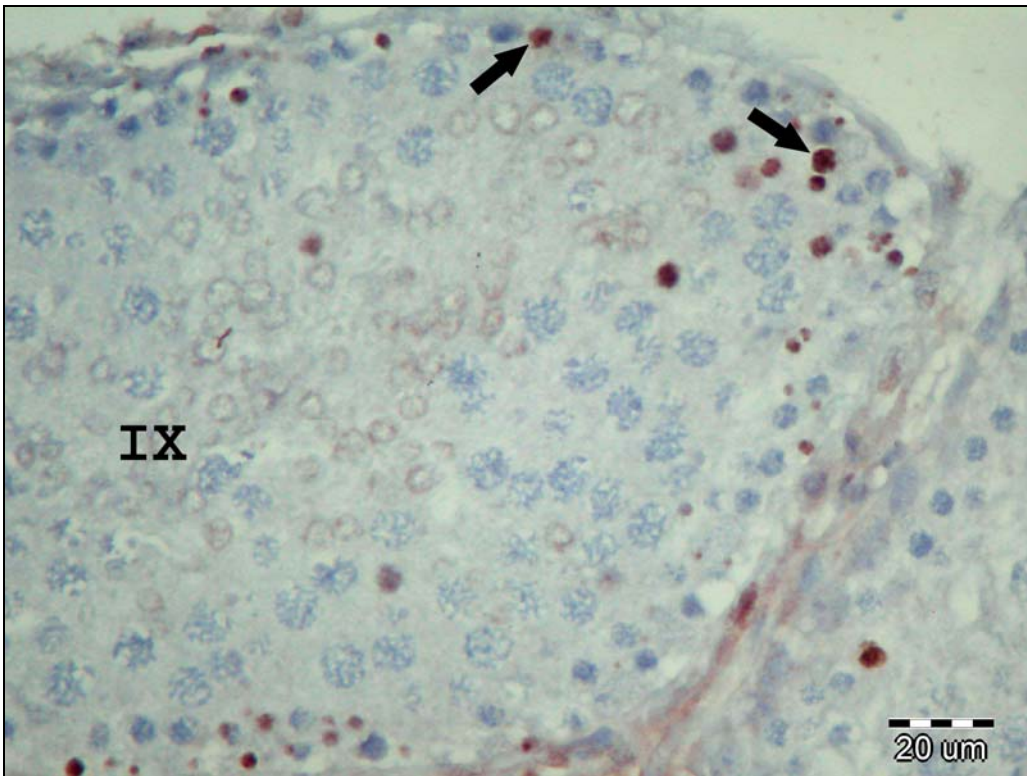
Resim 6. Kontrol grubu: evre XIII tübülde gözlenen kaspaz-3 (+) apoptotik hücre X1200 indirekt İmmünperoksidaz Metodu.



Resim 7. Sham grubu: evre XIII tübülde gözlenen kaspaz-3 (+) apoptotik hücreler X1200 indirekt İmmünperoksidaz Metodu.



Resim 8. Varikosel grubu: evre IX tübülde gözlenen kaspaz-3 (+) apoptotik hücreler X1200 İndirekt İmmünperoksidaz Metodu.



Resim 9. Varikosel+3-AB grubu: evre IX tübülde gözlenen kaspaz-3 (+) apoptotik hücreler X1200 İndirekt İmmünperoksidaz Metodu.

Elektron Mikroskopik Bulguların Değerlendirilmesi

Kontrol ve Sham grubunda:

Seminiferöz tübüleri çevreleyen membrana propria tabakası incelendiğinde düzenli bir bazal lamina yapısı gözlenmekteydi (**Resim10, 11**). Dış kısımda, normal görünüme sahip kollajen lif tabakası ve elektron dens nükleusa sahip tek sıralı myoid hücre tabakası (**Resim 10**) izlenmekteydi.

Bazal lamina üzerine oturan Sertoli hücrelerinde, karakteristik olarak çentikli, genellikle ovoid veya triangüler şekle sahip, ökromatik nükleus, belirgin nükleolus gözlemlendi. Sertoli hücre sitoplazmaları, geniş DER sisternaları ve birçok sferik ya da uzamış mitokondriler, iyi gelişmiş Golgi aparatı ve değişik miktarlarda mikrotübüller, lizozomlar, lipid dropletleri, veziküller, glikojen granülleri ve filamanlar içermekteydi. Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kompleksleri normal görünümde izlenmekteydi (**Resim 10**).

Ovoid nükleusa sahip, granüler kromatin dağılımlı tip A spermatogonyumlar ve sferik nükleusa, kondanse kromatine sahip tip B spermatogonyumlar gözlemlendi (**Resim 11**).

Primer spermatositlerin, değişik yoğunlaşma aşamalarındaki kromozomları içeren büyük nükleusları, aralarında bağlantılar bulunan kümeler halinde mitokondrileri vardı. Elektron dens, az sayıda mitokondriyonların bir kısmı hücre periferinde, bir kısmı da sitoplazmada gruplar halinde toplanmışlardı. (**Resim 10**).

Sertoli hücresi apikal sitoplazmasına gömülü, spermiyogenez sürecinin farklı aşamalarındaki spermatidler izlendi (**Resim 12**).

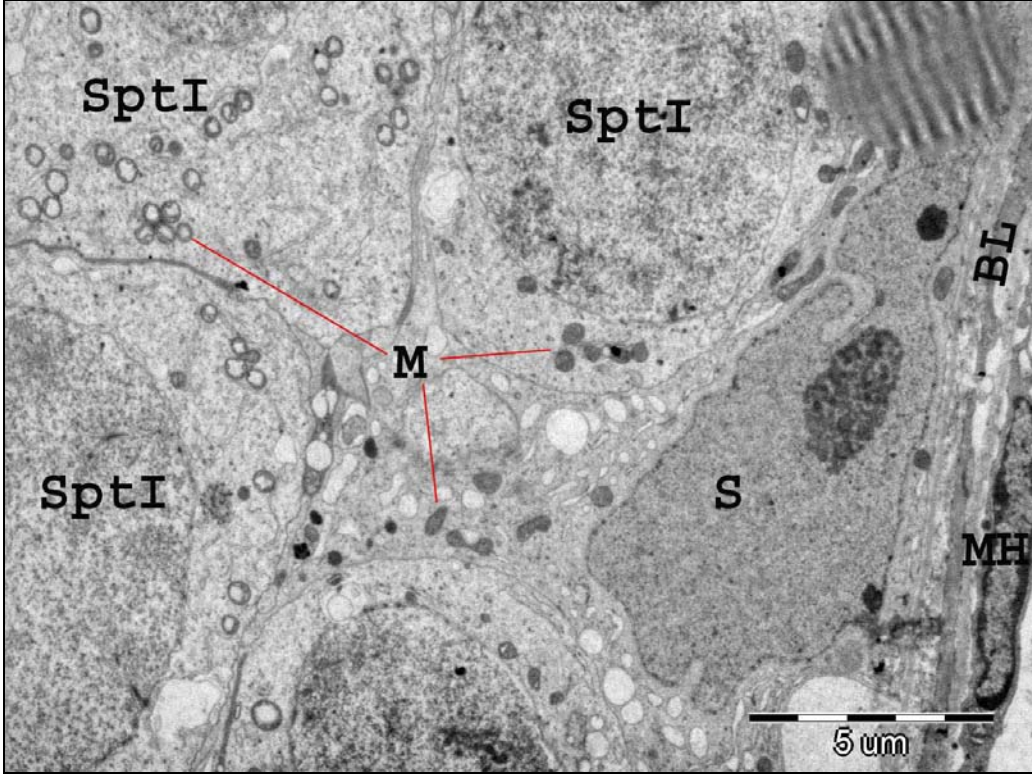
Varikozel ve Varikozel+3-AB Grubunda:

Varikozel grubunda, düzensiz, laminasyon gösteren, katlantılı ve minimal kalınlaşmış bazal lamina seminiferöz tübül hücrelerinin sitoplazmalarına doğru invajinasyonlar göstermekteydi (**Resim 13**). Bu invajinasyonlar, 3-aminobenzamid grubunda da gözlenmekteydi (**Resim 14**). İç hücresel olmayan tabakada kollajen lif miktarında bir artış gözlenmedi. Elektron yoğunluğu artan şişkin myoid hücreler yer yer 2 tabakalı halde gözlemlendi.

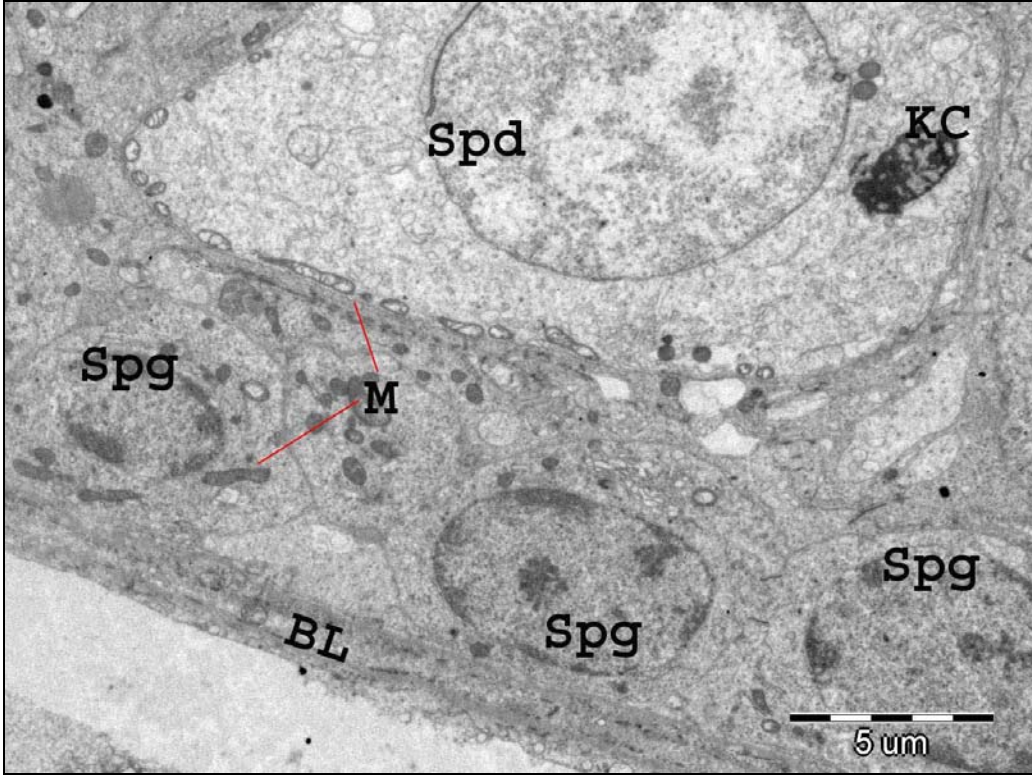
Tipik görünüme sahip Sertoli hücrelerinin yanı sıra, varikozel grubunda daha şiddetli olmak üzere bazı Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında, yer yer

vakuolizasyonlar ve DER sisternalarının farklı büyüklüklerde genişlemeleri (**Resim 13, 14**) gözlemlendi. Bu tür Sertoli hücre çekirdeklerinin, daha elektron dens hale geldiği, mitokondrilerin ise normal görünümde olduğu görüldü. Sertoli hücreleri arası bağlantı kompleksleri yine normal görünümdeydi.

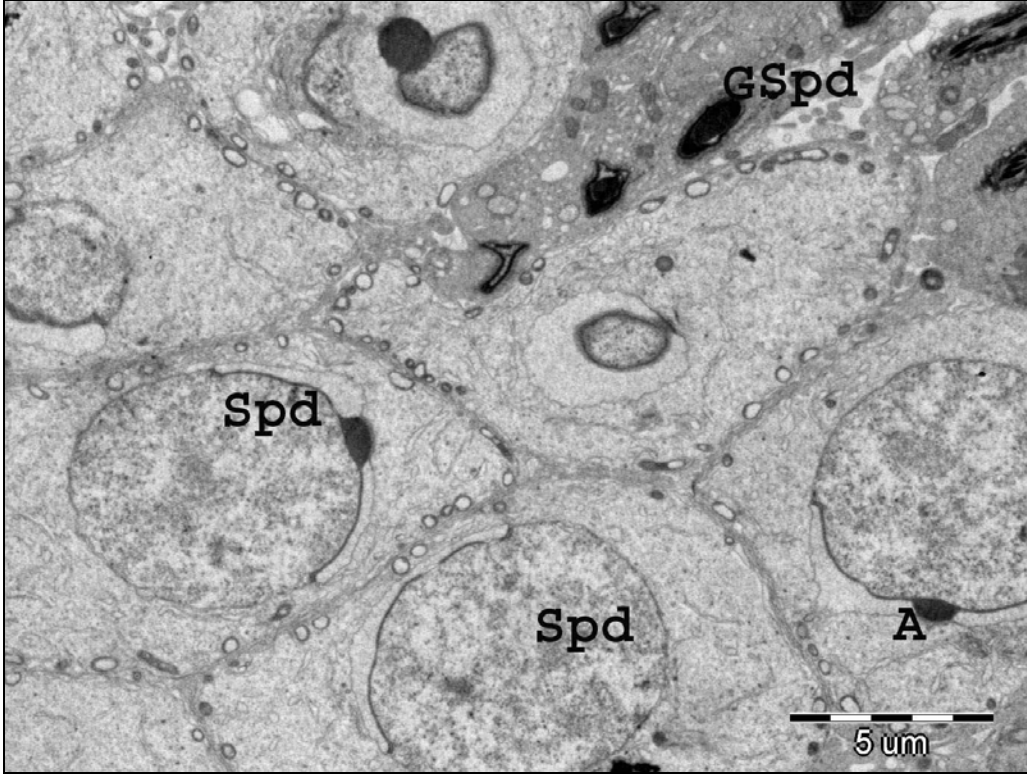
Her iki grupta, immünohistokimyasal sonuçları doğrulayan, özellikle Sertoli hücre sitoplazmaları içerisinde degrade halde apoptotik cisimler dikkati çekmekteydi (**Resim 15**).



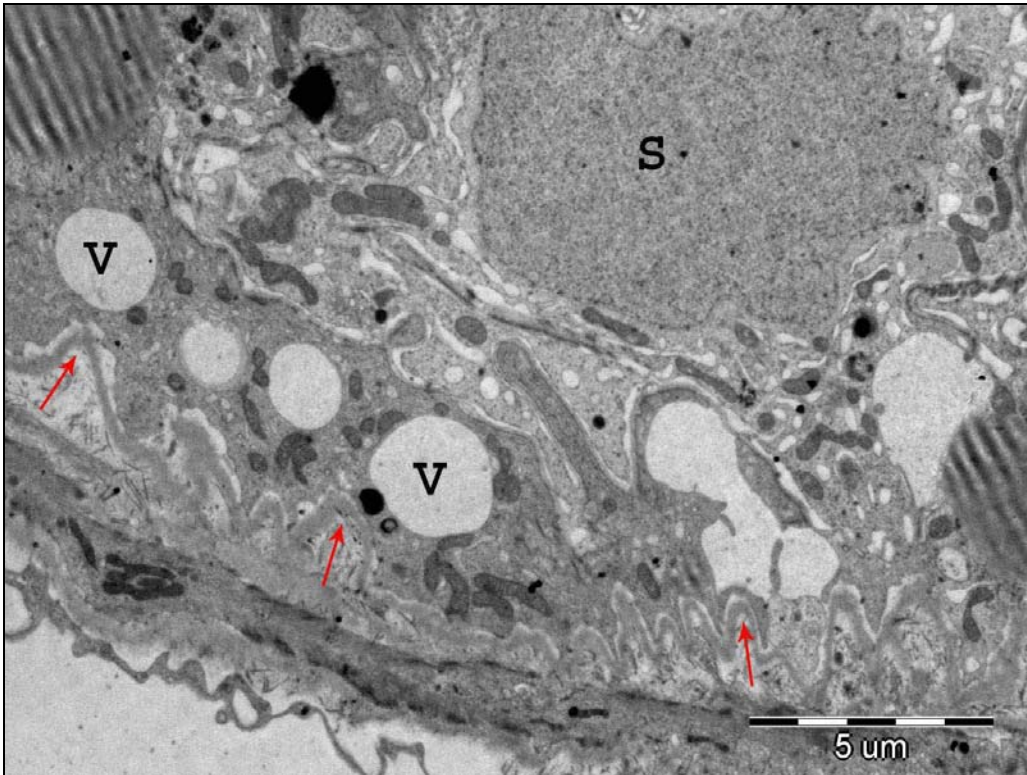
Resim 10. Kontrol grubu: düzenli bir bazal lamina yapısı (BL), elektron dens nükleuslu belirgin bir myoid hücre (MH), çentikli nükleusa sahip belirgin nükleoluslu bir Sertoli hücresi (S) ve mitokondriyonları (M) gruplar halinde gözlenen profazın farklı evrelerinde yer alan primer spermatositler (SptI) gözlenmektedir X6000.



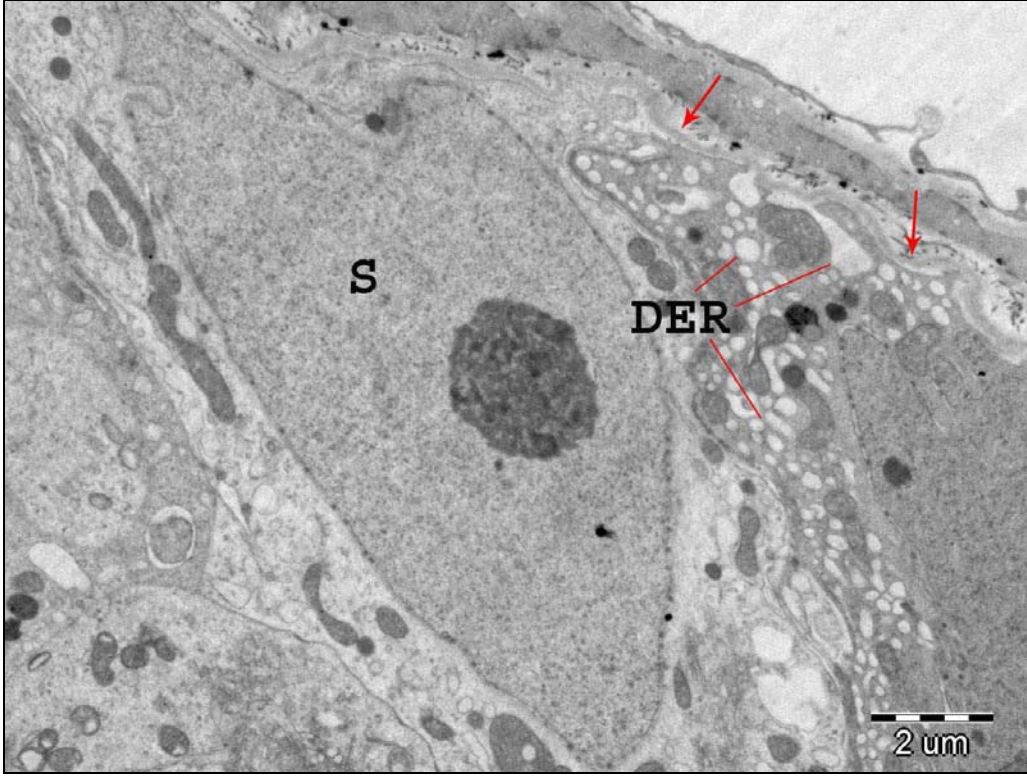
Resim 11. Kontrol grubu: bazal lamina (BL) üzerine oturmuş kondanse periferik yerleşimli kromatine sahip tip B spermatogonyumlar (Spg), spermiyogenezin kep döneminde yer alan mitokondriyonları (M) periferik yerleşimli bir erken spermatid (Spd) gözlenmektedir, kromatoid cisim (KC) X5000.



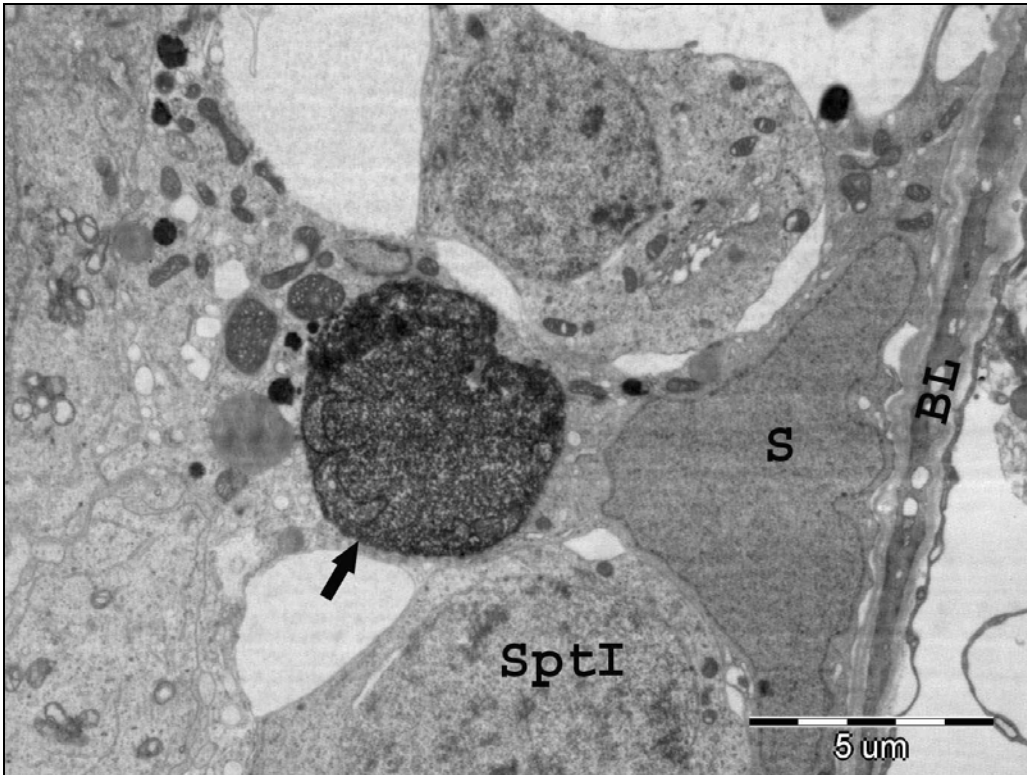
Resim 12. Kontrol grubu: erken spermatidler (Spd) ve geç spermatid (GSpd) evreleri. Akrozomal kep (A) döneminde bir spermatid izlenmektedir X5000.



Resim 13. Varikozel Grubu: komşu Sertoli hücresi (S) sitoplazmaları görünmektedir. Belirgin derecede invajine olmuş bazal membran kıvrıntıları (kırmızı oklar) ve Sertoli sitoplazmalarındaki vakuolizasyonlar (V) dikkati çekmektedir X6000.



Resim 14. Varikosel+3-AB grubu: DER genişlemeleri ve bazal membran kıvrıntıları (kırmızı oklar) azalsa da hala gözlenebilmektedir X7500.



Resim 15. Varikosel+3-AB grubu: Sertoli hücre sitoplazmaları arasında gözlenen apoptotik hücre X6000.

TARTIŞMA

Zamanla testis fonksiyonlarında (spermatogenez, steroidogenez) azalmaya yol açabilen varikoselin tedavisinde amaç, testisin fonksiyonunu ve semen parametrelerini iyileştirmek ve böylelikle gebelik oranını arttırmaktır^{7, 8, 9}. Varikozel tedavisinde iki yaklaşım bulunmaktadır: cerrahi ve perkütan venöz embolizasyon. Tedavi yaklaşımlarının sonuçlarını, varikozel derecesi, testis boyutu, endokrin faktörler, seminal parametreler gibi birtakım klinik parametreler etkilemektedir²¹⁰. Varikozektominin semen kalitesi ve gebelik oranlarında iyileşme sağladığı yönünde giderek artan sayıda çalışmalar bildirilmektedir. WHO'nun desteği ile yapılan Madgar ve arkadaşlarının çalışmasında, 45 çiftte gebelik oranları, varikozektomi grubunda (%60) tedavisiz izlenen hastalara (%10) göre 6 kat daha fazla olarak saptanmıştır²¹¹. Farklı teknik kullanan Çayan ve arkadaşları, 540 hastadan oluşan çalışmalarında, varikozektomiye pozitif yanıtı (spermatogenezde %50'den fazla artma) %50 hastada saptamışlar ve spontan gebelik oranını ortalama 7 aylık sürede %36,6 olarak bildirmişlerdir²¹². Varikozele yol açan mekanizmaların tam aydınlatılmamış olmasına bağlı olarak tedavi sonrasında bile, bazı hastalarda, subfertilite ya da infertilitenin devam ettiği görülmektedir. Varikozel patofizyolojisinde kabul gören teorilerin arasında günümüzde en çok çalışılanlar, hipertermi, oksidatif stres ve apoptozdur²¹³. Hiperterminin²¹⁴ ve oksidatif stresin¹⁸¹ apoptozu arttırdığını bildiren çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda bu faktörlerin iç içe olduğu görülmektedir.

Varikozelli hastaların da içinde bulunduğu infertil popülasyonlarda, reaktif oksijen radikallerinin varikozel ile bağlantılı olduğu ileri sürülmüştür^{79,219}. Çalışma sonuçlarında, kontrol, sham ve ilaç grubuna göre, varikozel grubundaki istatistiksel olarak anlamlı MDA artışı, bunu destekler niteliktedir. Ölçülen antioksidan enzim değerlerinin gruplar arasında anlamlı fark göstermemesi daha önce de karşılaşılmış durumlardır²¹⁵, kaldı ki testiküler SOD gibi enzimlerin oldukça labil olduğu unutulmamalıdır²¹⁶.

Apoptoz, ATP gereksinimi olan fizyolojik bir süreçtir^{217,218}. Programlanmış hücre ölümü, memelilerde, normal spermatogenezde gereklidir. Apoptozun, hücrel homeostazı devam ettirdiği ve Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki ince dengeyi koruduğuna inanılmaktadır¹⁶⁵. Kaspaz ailesi

üyeleri de seminifer epitelde, apopitozun regülasyonunda merkezi bir role sahiptirler²¹⁹. Fujisawa ve arkadaşlarının çalışması¹⁷⁴ dışında varikozelde apopitozun arttığı gösteren birçok çalışma bulunmaktadır^{84,85,220}. Apopitozun da reaktif oksijen radikallerini içeren birçok stres faktörü ile tetiklendiği bilinmektedir¹⁷⁹.

Öncelikle, uygulanan deneysel varikozel modeli sonucunda reaktif oksijen radikallerinin etkisi, biyokimyasal bulgularla desteklendi. Buna bağlı olarak, varikozel grubunda, kontrol ve sham grubuna göre apopitotik indeks artmış bulundu. Beklenenin aksine, 3-aminobenzamid uygulanan grupta da kontrol ve sham grubuna göre belirgin bir artış mevcuttu. Bu artıştan, ilacın, aşırı DNA hasarına ikincil gelişebilecek nekrozu engellediği ve ek olarak apopitoza yani fizyolojik hücre ölümüne doğru artan bir yönelim oluşturabileceği sonucuna varılabilir. Bu varsayım, yine de 3-aminobenzamid grubunda gözlenen Johnsen skorlarındaki anlamlı düzelmeyi tam olarak açıklayamamaktadır. Ama apoptotik hücreler uzaklaştırıldığında kalan hücrelerin hücre sıralarını kapattığını, apopitoz etkisini, hücre delesyon oranının yüksek olduğu zamanda bile, göreceli olarak histolojik açıdan az göze çarpar hale getirdiklerini unutmamak gerekir.

Ratlarda, seminiferöz epitelde her tübül kesitinde, farklı spermatid gelişim evrelerine göre tanımlanmış 14 alt evre bulunmaktadır²²¹. Varolan biyokimyasal bulgular, erken (I-VI) ve geç (XII-XIV) evrelerin FSH bağımlı olduğunu gösterirken, testesteron, evre VII, VIII üzerinde bir etkiye sahiptir^{222,223}. Bu hormonlar, uyarıcı etkilerini Sertoli hücreleri üzerine gösterirler, Sertoli hücreleri de parakrin mekanizma ile bunu germ hücrelerine iletmektedirler²²². Varikozel ve varikozel+3-AB grubunda saptanan apopitotik hücre artışları özellikle evre VIII, IX ve XIII' de gözlenmiştir. Varikozelin patofizyolojisinde yer alan hormonal disfonksiyon bu dağılımı açıklayabilir. Ancak, 3-aminobenzamid'in hormonal fonksiyon üzerinde direk etkileri araştırılmalıdır.

Varikozel, bazı Sertoli hücre sitoplazmalarında rastlanan DER sisternalarının genişlemeleri, vakuolizasyonlar ve bazal laminanın lümene doğru yaptığı invajinasyonlar ile birliktelik göstermekteydi. Bazal lamina invajinasyonları, varikozel patofizyolojisinde yer alan intratestiküler onkotik ve hidrostatik basınç değişikliklerine ikincil, interstisyum ile seminifer tübül epiteli arasındaki iyon transportunu arttırmak için gelişmiş olabilir. Sertoli

sitoplazmalarında gözlenen vakuolizasyonlar, varikoselde rastlanan germ hücrelerinin lümene dökülmesinin temel mekanizması olarak görülmektedir¹²⁴. DER sisternalarının genişlemeleri ise daha önce de bazı çalışmalarda gösterildiği gibi spesifik olmayan bir değişim olarak yorumlanabilir^{224,225}. Öte yandan, Sertoli hücrelerinin, varikoselde meydana gelen hormonal disfonksiyona karşılık, kompansatuvar bir mekanizması olarak da öngörülebilir. Sertoli hücrelerinin testosteron ve östradiol dahil olmak üzere steroid sentezindeki görevi bilinmektedir²²⁶. Özellikle, 10 gün süreyle ekzojen östradiol uygulaması sonrası hem kanda hem de intratestiküler testosteron seviyeleri düşük bulunmuş, beraberinde oksidatif stresin ve apoptozun arttığı gözlenmiştir^{T20}. Bu negatif feedback etkinliği, Sertoli DER sisternalarındaki muhtemel aktif fonksiyon artışına işaret eden genişlemeler ile açıklanabilir. Hatta üzerinde çalışılması gereken muhtemel östradiol etkisi, elektron mikroskopik bulguları birbirine paralel olan varikozel ve varikozel+3-AB gruplarında gözlenen apoptotik hücre artışına zemin hazırlıyor olabilir²²⁷. Bu bulguların, varikozel+3-AB grubunda, azalarak da olsa devam ettiği gözlenmiştir. Bu sebeple, ilaç uygulama dozunun ve/veya süresinin, elektron mikroskopik düzeydeki değişikliklerin tam gerilemesi için yeterli olmadığı düşünülebilir.

Sonuç olarak, bir PARP inhibitörü olan 3-aminobenzamid'in oksidatif stresi azalttığı, Johnsen skorlarında artışa neden olduğu ve bunlara paralel olarak spermatogenez sürecini olumlu yönde etkileyebileceği düşünülmüştür. Ancak 3-aminobenzamid, nekrotik sürecin ve dolayısıyla inflamatuvar sürecin yerine apoptozu yani fizyolojik hücre ölümünü arttırmaktadır. Bu sebeple, 3-aminobenzamid'in, varikozel tedavisi için tam bir alternatif tedavi seçeneği olması yerine pan-kaspaz inhibitörleri ile kombine veya cerrahi tedavi sonrası kullanılabilmesi ve sperm kantitesine değilse de kalitesine pozitif etkilerinin olabileceği üzerinde durulmalıdır. Bu konuda, daha kapsamlı çalışmalar planlanmalıdır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada deneysel varikozel modeli oluşturulan ve 3-aminobenzamid uygulanan grupta sadece varikozel oluşturulan deney gruplarına ait ratların enzim değerleri (malondialdehit, katalaz, glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz), Johnsen skorlaması ortalamaları, apoptotik indeks değerleri ve elektron mikroskopik bulguları, kontrol ve sham grupları ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Varikozel oluşturulan grupta, malondialdehit seviyeleri anlamlı şekilde artmış bulunurken, 3-aminobenzamid uygulanan grupta değerlerin azaldığı ve kontrol değerlerinin seviyesine ulaştıkları gözlemlendi. Ancak antioksidan enzim değerleri açısından gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmadı.

Varikozel grubunun Johnsen skor ortalamaları, kontrol ve sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktü. Varikozel oluşturulması sonrası 3-aminobenzamid verilen grupta ise, ortalamaların tekrar kontrol ve sham grup ortalamaları düzeyine geldiği saptandı.

Hem varikozel hem de varikozel+3-aminobenzamid grubunda apoptotik indeks ortalamalarının, kontrol ve sham grubuna göre belirgin şekilde arttığı gözlemlendi.

Her iki deney grubunda da gözlenen elektron mikroskopik bulgular benzerdi. Varikozel grubunda gözlenen bazal lamina invajinasyonlarının, Sertoli sitoplazmalarındaki artmış vakuolizasyonların ve DER sisterna genişlemelerinin, 3-aminobenzamid uygulanan grupta düzeyi azalsa da hala görülmeye devam ettiği saptandı.

Sonuç olarak, 3-aminobenzamidin, MDA değerlerini ve Johnsen skor ortalamalarını düzelttiği, ancak, apoptotik indeks değerlerinde ve elektron mikroskopik bulgularda varikozel grubuna kıyasla herhangi bir değişikliğe yol açmadığı saptandı.

Bu sonuçların ışığında, 3-aminobenzamidin, pan-kaspaz inhibitörleri ile kombine veya cerrahi sonrası kullanıldığı durumlardaki etkinliği araştırılmalıdır, hatta daha potent PARP inhibitörlerinin kullanılması da kıyaslama açısından faydalı olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Noske HD and Weidner W. Varicocele - A historical perspective. *World J Urol* 1999; 17(3): 151-157.
2. Kursh ED. W is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril*;
3. Hargreave TB. Varicocele - a clinical enigma. *Br J Urol* 1993; 72(4): 401-408.
4. Hendry WF, Sommerville IF, Hall RR et al. Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol* 1973; 45: 684-692.
5. Cockett ATK, Takihara M and Cosentino MJ. The varicocele. *Fertil Steril* 1984; 41: 1-12.
6. Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Behre HM. Treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod* 1995; 10 (2): 347-353.
7. WHO. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting infertility clinics. *Fertil Steril* 1992; 57: 1289-1293.
8. Gorelick JI and Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* 1993; 59: 613-616.
9. Witt MA and Lipshultz LI. Varicocele: a progressive or static lesion? *Urology* 1993; 42: 541-543.
10. Saypol DC, Howards SS, Turner TT et al. The influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 1981; 68: 39-45.
11. Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP. Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. *J Urol* 1994; 152 (2 pt 2): 788-790.
12. Oster J. Varicoceles in children and adolescents. *Scan J Urol Nephrol* 1973; 5: 27-32.

13. Akbay E, Çayan S, Doruk E et al. The prevalence of varicocele and varicocele-related testicular atrophy in Turkish children and adolescents. *BJU Int* 2000; 86(4): 490-493.
14. Walmsley K, Coleman JA, Goldstein M. The inheritance of varicocele. *J Urol* 2001; 165(Suppl 5): 334-337.
15. Naughton CK, Nangia AK and Agarwal A. Varicocele and male infertility: part II. *Hum Reprod Update* 2001; 7(5): 473-481.
16. Kohler FP. On the etiology of varicocele. *J Urol* 1967; 97: 741-742.
17. Braedel HU, Steffens J, Ziegler M et al. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol* 1994; 151: 62-66.
18. Mieusset R and Bujan L. Testicular heating and its possible contribution to male infertility: a review. *Int J Androl* 1995; 18: 169-184.
19. Shafik A, Mofteh A, Oflat S et al. Testicular veins: anatomy and role in varicoceleogenesis and other pathologic conditions. *Urology* 1990; 35(2): 175-182.
20. Grillo-Lopez AJ. Primary right varicocele. *J Urol* 1971; 105(4): 540-541.
21. Dubin L, Amelar RD. Varicolectomy: 986 cases in a 12-year study. *Urology* 1977; 10: 446-449.
22. Hargreave TB. Debate on the pros and cons of varicocele treatment-in favour of varicocele treatment. *Hum Rep* 1995; 10(Suppl 1): 151-157.
23. Comhaire F, Zalata A, Schoonjans F. Varicocele: indications for treatments. *Int J Androl* 1995; 18 (Suppl 2): 67-71.
24. Etriby AA, Ibrahim AA, Mahmoud KZ et al. Subfertility and varicocele. I. Venogram demonstration of anastomosis sites in subfertile men. *Fertil Steril* 1975; 26 (10): 1013-1017.
25. Harrison RM, Lewis RW, Roberts JA. Pathophysiology of varicocele in nonhuman primates: long-term seminal and testicular changes. *Fertil Steril* 1986; 46: 500-509.
26. Salama N, Bergh A, Damber JE. The changes in testicular vascular permeability during progression of the experimental varicocele. *Eur Urol*. 2003; 43(1): 84-91.
27. Lipshultz LI and Corriere Jr JN. Progressive testicular atrophy in varicocele patient. *J Urol* 1977; 117 (2): 175-176.

28. Turner TT, Brown KJ and Spann CL. Testicular intravascular volume and microvessel mitotic activity: effect of experimental varicocele. *J Androl* 1993; 14: 180-186.
29. Green KF, Turner TT and Howard SS. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J Urol* 1984; 131: 1208-1211.
30. Hurt GS, Howards SS and Turner TT. Repair of experimental varicoceles in the rat. Long term effects on testicular blood flow and temperature and cauda epididymal sperm concentrations and motility. *J Androl* 1986; 7: 271-276.
31. Li H, Dubocq F, Jiang Y et al. Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology* 1999; 53: 1258-1262.
32. Turner TT, Miller DW. Protein synthesis and secretion by the rat seminiferous tubule in vivo not affected by experimental varicocele. *J Urol*. 1996; 156(5): 1881-1887.
33. Sharpe RM: Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 1984; 30(1): 29-49.
34. Dahl HV and Hendrick JF. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg Gynecol Obstet* 1959; 108: 697-705.
35. Zorngiotti AW and MacLeod J. Studies in the temperature, human semen quality and varicocele. *Fertil Steril* 1973; 24: 295-301.
36. Goldstein M and Eid JF. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicoceles. *J Urol* 1989; 142: 743-745.
37. Mieusset R, Biyan L, Mondinat C et al. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril* 1987; 48: 1006-1011.
38. Lund L and Nielsen KT. Varicocele, testis and testicular temperature. *Br J Urol* 1996; 78: 113-115.
39. Salisz JA, Kass EJ and Steinert BW. The significance of elevated scrotal temperature in an adolescent with a varicocele. *Adv Exp Med Biol* 1991; 286: 245-251.

40. Wright EJ, Young GP and Goldstein M. Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology* 1997; 50: 257-259.
41. Lerchl A, Keck C, Spiteri-Grech J et al. Diurnal variations in scrotal temperature of normal men and patients with varicocele before and after treatment. *Int J Androl* 1993; 16: 195-200.
42. Sofikidis N and Miyagawa I. Left adrenalectomy in varicocelectomized rats does not inhibit the development of varicocele-related physiologic alterations. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1993; 38: 250-255.
43. Shafik A, Wali MA, Abdel Azis YE et al. Experimental model of varicocele. *Eur Urol* 1989; 16: 298-303.
44. Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K et al. Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl* 1989; 22: 149-159.
45. Nishiyama H, Danno S, Kaneko Y et al. Decreased expression of cold-induced RNA-binding proteins (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am J Path* 1998; 152: 289-296.
46. Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O et al. Desoxyribonucleic acid polymerase activity in the testis of the infertile man with varicocele. *Fertil Steril* 1988; 50: 795-800.
47. Steinberger A. Effects of temperature on the biochemistry of testis in. In: Zorngiotti A (ed.) *Temperature and environmental effects on the testis*. Plenum Press New York 1991; 286: 33-47.
48. Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C et al. Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *Am J Physiol* 1991; 260: 1581-1589.
49. Sweeney TE, Rozum JS and Gore RW. Alteration of testicular microvascular pressure during venous pressure elevation. *Am J Physiol* 1995; 269: 37-45.
50. Hsu HS, Chang LS, Chen MT et al. Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *Eur Urol* 1994; 25: 71-75.
51. Hsu HS, Wei YH and Li AF. Defective mitochondrial oxidative phosphorylation in varicocele-bearing testicles. *Urology* 1995; 46: 545-549.

52. Shafik A. Venous tension patterns in cord veins II after varicocele correction. *J Urol* 1983; 129: 749-751.
53. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N et al. Plebography in varicocele scroti. *Acta Radiol Diag* 1966, Abstract 4, p517-528.
54. Comhaire F, Kannen M, Nahourn C. Radiological anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. *Int J Androl* 1981; 4: 379-387.
55. Rajfer J, Turner TT and Rivera F. Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. *Biol Reprod* 1987; Abstract 36: 933-937.
56. Turner TT and Lopez TJ: Testicular blood flow in peri-pubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to a unilateral lesion. *J Urol* 1990; 144: 1018-1021.
57. Çayan S, Kadioğlu A, Orhan I, Kandıralı E, Tefekli A, Tellaloğlu S: The effect of microsurgical varicolectomy on serum follicle stimulating hormone, testosterone and free testosterone levels in infertile men with varicocele. *BJU Int* 1999; 84(9): 1046-1049.
58. Swerdloff RS and Walsh PC. Pituitary and gonadal hormones in patients with varicoceles. *Fertil Steril* 1975; 26: 1006-1012.
59. Schiff I, Wilson E, Newton R et al. Serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone responses to gonadotrophin-releasing factor in males with varicoceles. *Fertil Steril* 1976; 27: 1059-1061.
60. Hudson RW and McKay DE. The gonadotropin release of men with varicoceles to gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 1980; 33: 427-432.
61. Hudson RW, Crawford VA and McKay DE. The gonadotropin response of men with varicoceles to a four-hour infusion of gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 1981; 36: 633-637.
62. Jarrow JP and Sanzone JJ. Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol* 1992; 148: 1805-1807.
63. Cameron DF and Snyder FE. The blood-testis barrier in men with varicocele: a Lanthanum tracer study. *Fertil Steril* 1980; 34: 255-258.

64. Turner TT, Jones CE and Roddy MS. Experimental varicocele does not affect the blood-testis barrier, epididymal electrolyte concentration or testicular blood gas concentration. *Biol Reprod* 1987; 36: 926-932.
65. Shook TE, Nyberg LM, Collins BS et al. Pathological and immunological effects of surgically induced varicocele in juvenile and adult rats. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988; 17: 141-144.
66. Rogers BJ, Mygatt GG, Soderdahl DW et al: Monitoring of suspected infertile men with varicocele by the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1985; 44: 800-805.
67. Virgil P, Wohler C, Bustos-Obregon E et al. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* 1994; 26: 55-60.
68. Benoff S, Barcia M, Hurley IR et al: Classification of male factor infertility relevant to in vitro fertilization insemination strategies using mannose ligands, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. *Hum Rep* 1996; 11: 1905-1918.
69. Holland MK, Alvarez JG and Storey BT. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1982; 27: 1109-1118.
70. De Lamirande E and Gagnon C. Human sperm hyperactivation in whole sperm and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* 1993; 59: 1291-1295.
71. Aitken RJ and Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefits and risk. *Bioassays* 1994; 16: 259-267.
72. Aitken RJ, Clarson JS, Hargreave TB et al. Analysis of the relationship between defective sperm function and generation of reactive oxygen species in cases of oligospermia. *J Androl* 1989; 10: 214-220.
73. Iwasaki A and Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile men. *Fertil Steril* 1992; 57: 409-416.
74. Alkan İ, Şimşek F, Haklar G et al: Reactive oxygen species production by spermatozoa of patients with idiopathic infertility. *J Urol* 1997; 157: 140-143.

75. Aitken RJ and Clarson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 459-465.
76. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco LD et al. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8: 338-348.
77. Weese DL, Peaster ML, Kyle KH et al. Stimulated reactive oxygen species generation by the spermatozoa of infertile men. *J Urol* 1993; 149: 64-67.
78. Hendin BN, Kolletis PN, Sharma RK et al. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 1999; 161: 1831-1834.
79. Lenzi A, Picardo M, Gandini L et al. Lipids of the sperm plasma membrane; from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger. *Hum Rep Update* 1996; 2: 246-256.
80. Köksal IT, Tefekli A, Usta M et al. The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. *BJU Int*. 2000 Sep; 86(4): 549-552.
81. Sinha-Hikim AP and Swerdloff RS. Temporal and stage-specific effect of recombinant human follicular stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis in gonadotropin releasing hormone antagonist treated rat. *Endocrinology* 1995; 136: 253-261.
82. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of germinal epithelium. *Anat Rec* 1998; Abstract 190: 905-926.
83. Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod* 1996; 55(5): 935-941.

84. Barqawi A, Caruso A, Meacham RB. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *J Urol* 2004; 171: 501–3.
85. Simsek F, Turkeri L, Cevik I et al. Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. *Arch Esp Urol* 1998; 51: 947–50.
86. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28: 587–96.
87. Marmar JL. Varicocele and male infertility: part II. *Hum Rep Update* 2001; 7(5): 461-472.
88. Lue YH, Sinha-Hikim AP, Swerdloff RS et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999; 140: 1709-1717.
89. Miller D, Brough S and Al-Harbi O: Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Hum Rep* 1992; 7: 637-645.
90. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 643-650.
91. Brinkworth MH, Weinbauer GF, Bergmann M, Nieschlag E. Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in elderly men. *Int J Androl.* 1997; 20(4): 222-228.
92. Ku WW, Wine RN, Chae BY et al. Spermatoocyte toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; Abstract 134: 100-110.
93. Li LH, Wine RN and Chapin RE. 2-Methoxyacetic acid (MAA)-induced spermatoocyte apoptosis in human and rat testis: an in vitro comparison. *J Androl* 1996; 17: 538-549.
94. Kleiber EL, Broverman DM, Pokoly TB et al. Interrelationships of cigarette smoking, testicular varicoceles and seminal fluid indexes. *Fertil Steril* 1987; 47: 481-486.
95. Benoff S, Hurley IR, Barcia M et al. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Fertil Steril* 1997; 67(2): 336-47.

96. Benoff S, Cooper GW, Centola GM et al. Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update* 2000; 6(2): 107-121.
97. Ross MH, Kaya GI, Pawlina W: *Histology: A Text and Atlas*, 4th edition, Lippincott Williams-Wilkins, Philadelphia, 2003; 689-696.
98. Barratt CLR. Spermatogenesis. In Grudzinskas JG, Yovich JL(eds): *gametes-The Spermatozoon*. Cambridge, Cambridge University Pres, 1995; 250-267.
99. Cooke HJ, Hargreave T, Eliot DJ. Understanding the genesinvolved in spermatogenesis: A progress report. *Fertil Steril*, 1998; 69: 989-995.
100. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology*, 2003; 59: 73-86.
101. Moore KL, Persaud TVN. *The developing human*. 6th edn, W.B. Saunders Company, Pennsylvania, 1998; 22-23.
102. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*. Pennsylvania, W.B. Saunders Company 1997; pp 406-412.
103. Trainer TD. Testis and excretory duct system. In Sternberg SS (ed). *Histology for Pathologists*, 2nd edn. Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1997: pp 1022-1024.
104. Syed V, Hecht NB. Disruption of germ cell- Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. *Mol Cell Endocrinol (MCE)* 2002; 186: 155-157.
105. Niederberger CS, Lamb DJ. Spermatogenesis in Adult. In Lipshultz LI, Howards SS (eds), *Infertility in the male*, 3rd edn. Mosby, St Louis, 1997, pp 106-122.
106. Martins MRFB, Silva JRCP. Ultrastructure of spermatogonia and primary spermatocytes of C57BL6J Mice. *Anat Histol Embryol* 2001; 30: 129-132.
107. Haans LCF, Laven JSE, Mail WPTM, te Velde ER, Wensing CJG. Testis volumes, semen quality, and hormonal patterns in adolescents with and without a varicocele. *Fertil Steril* 1991; 56: 731-6.
108. Wang YX, Lei C, Dong SG et al. Study of bilateral histology and meiotic analysis in men undergoing varicocele ligation. *Fertil Steril* 1991; 55(1): 152-155.

- 109.** Wang R, Chang JS, Zhou XM, Chen DY. Varicocele in the rat: a new experimental model. Effect on histology, ultrastructure and temperature of the testis and the epididymis. *Urol Res.* 1991;19(5): 319-22.
- 110.** Paduch DA, Skoog SJ. Current management of adolescent varicocele. *Rev Urol* 2001; 3(3): 120-133.
- 111.** Kim ED, Leibman BB, Grinblat DM et al. Varicocele repairs improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. *J Urol* 1999; 161: 737-740.
- 112.** Etriby A, Girgis SM, Hefnawy H et al. Testicular changes in subfertile males with varicoceles. *Fertil Steril* 1967; 18: 666-671.
- 113.** Dubin L and Hotchkiss RS. Testis biopsy in subfertile men with varicocele. *Fertil Steril* 1969; 20: 50-57.
- 114.** Aggar P and Johnsen SG. Quantitative evaluation of testicular biopsies in varicoceles. *Fertil Steril* 1978; 29: 52-57.
- 115.** Reichart M, Eltes F, Soffer Y et al. Sperm ultramorphology as a pathophysiological indicator of spermatogenesis in males suffering from varicocele. *Andrologia* 2000;32(3): 139-145.
- 116.** O'Brien J and Zini A. Sperm DNA integrity and male infertility. *Urology* 2005; 65: 16–22.
- 117.** Tanji N, Fujiwara T, Kaji H, Nishio S, Yokoyama M. Histologic evaluation of spermatic veins in men with varicoceles. *Int J Urol* 1999; 7: 355-360.
- 118.** Lund L, Hahn-Pedersen J, Hljihus J et al. Varicocele testis evaluated by CT scanning. *Scand J Urol Nephrol* 1997; 31(2): 179-182.
- 119.** Lund L, Ernst E, Sorensen HT et al. Biomechanical properties of normal and varicose internal spermatic veins. *Scand J Urol Nephrol* 1998; 32(1): 47-50.
- 120.** Agarwal S. Vascular morphology in testes of infertile males with varicocele. *Indian J Med Res* 1991; 94: 228-231.
- 121.** Santamaria L, Martin R, Nistal M, Paniagua R. The peritubular myoid cells in the testes from men with varicocele: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative study. *Histopathol* 1992; 21(5): 422-433.

- 122.** Santoro G, Romeo C, Impellizzeri P et al. Ultrastructural and immunohistochemical study of basal lamina of the testis in adolescent varicocele. *Fertil Steril* 2000; 73(4): 699-705.
- 123.** Pelletier RM, Byers SW. The blood-testis barrier and Sertoli cell junctions: structural considerations. *Microsc Res Tech*. 1992 Jan 1;20(1): 3-33.
- 124.** Ozgur H, Kaya M, Doran S, Solmaz S. Ultrastructure of the seminiferous tubules in human testes before and after varicocelectomy. *Anat Embryol* 2003; 207: 343-353.
- 125.** De Kretser DM, Kerr JB, Paulsen CA. The peritubular tissue in the normal and pathological human testis. An ultrastructural study. *Biol Reprod* 1975; 12: 317.
- 126.** Romeo C, Santoro G, Impellizzeri P. Myofibroblasts in adolescent varicocele: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Urol Res* 2000; 28: 24-28.
- 127.** Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*,1972; 26: 239-257.
- 128.** Cummings MC, Winterford MC, Walker NI. Apoptosis. In Sternberg SS. *Histology for Pathologists*. Lipincott-Raven Publishers Second Edition. 1997: pp 3-21.
- 129.** Wyllie AH. Cell Death. *Int Rev Cytol* 1987; Suppl 17: 755-785.
- 130.** Walker NI. Ultrastructure of rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. *Am J Pathol* 1987; 126: 439-451.
- 131.** Walker NI, Gobe GC. Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. *J Pathol* 1987; 153: 333-344.
- 132.** Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology*. 1985; 56(2): 351-8.
- 133.** Wilcock C, Hickman JA. Characterisation of a Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter in alkylating agent-sensitive L1210 murine leukemia cells. *Biochim Biophys Acta* 1988; 22: 946(2): 359-67.

- 134.** Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslett C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B₂. *J Leukoc Biol* 1992; 52:269-273.
- 135.** Howie SE, Sommerfield AJ, Gray E, Harrison DJ. Peripheral T lymphocyte depletion by apoptosis after CD4 ligation in vivo. Selective loss of CD44 and activating memory T cells. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 195-200.
- 136.** Kerr JFR. Shrinkage necrosis. A distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105: 13-20.
- 137.** Wyllie AH, Kerr JFR, Macaskill IAM, Currie AR. Adrenocortical cell deletion. The role of ACTH. *J Pathol* 1973; 111:85-94.
- 138.** Ulukaya E. Apoptosis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD 2003; 1-19.
- 139.** Wyllie AH. Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.
- 140.** Oberhammer F, Wilson JW, Dive C et al. Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993; 12: 3679-3684.
- 141.** Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 337-343.
- 142.** Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1992; 61: 451-453.
- 143.** Fadok VA, Savill JS, Haslett C et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol*. 1992; Dec 15: 149(12): 4029-35.
- 144.** Creutz CE. The annexins and exocytosis. *Science* 1992; Nov 6; 258(5084): 924-31.
- 145.** Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995;182(5):1545-56.

- 146.** Cotter TG, Lennon SV, Glynn JM, Green DR. Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.* 1992; 52(4):997-1005.
- 147.** Fesus L, Davies PJ, Piacentini M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol.* 1991; 56(2): 170-7.
- 148.** Piacentini M, Autuori F, Dini L. "Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor-stimulation. *Cell Tissue Res.* 1991; 263(2): 227-35.
- 149.** Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T et al. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995; 181(1): 71-7.
- 150.** Banasiak K J and Haddad G G. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res* 797: 295-304, 1998.
- 151.** Hu Y M, Benedict M A, Ding L Y. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 1999; 18: 3586- 3595.
- 152.** Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 15: 35-43, 1993.
- 153.** Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH Res* 3:75, 1991.
- 154.** Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *J Biochem* 1997; 326: 1-16.
- 155.** Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
- 156.** Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM and Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-652.
- 157.** Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- 158.** Slee EA, Adrain C and Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 1067-1074.

- 159.** Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM et al. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 2001; 104: 769-780.
- 160.** Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001; 104:791-800.
- 161.** Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276: 869-874, 2001.
- 162.** Creagh EM and Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochemical Society Transactions* 2001; 29 (6) :pp 696-702.
- 163.** Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87,171.
- 164.** Arama E, Agapite J and Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell* 2003; 4: 687-697.
- 165.** Said TM, Paasch U, Glander HJ and Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod* 2004; 10: 39-51.
- 166.** Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU et al. Apoptosis Regulation in the Testis:Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development*. 56: 353-359, 2000.
- 167.** Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol*. 86: 598-606, 2000.
- 168.** Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fertil*, 95: 825-830, 1992.
- 169.** Davis JR, Firlit CF. The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril*. 1986;17: 187-200.
- 170.** Heiskanen P, Billig H, Toppari J et al. Apoptotic Cell Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*. 1996; 40: 351-356.
- 171.** Ikeda M, Kodama H, Fukuda J et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr*. 1999; 61:393-399.

- 172.** Yin Y, Hawkins K L, Devvolf W C, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl.* 1997; 18: 159-165.
- 173.** Adams JM and Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
- 174.** Fujisawa M, Hiramine T and Kamidono S. Decrease of apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol* 1999; 17: 296-300.
- 175.** Caruso A, Walsh R, Ross L, Trummer H and Meacham R. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *J Urol* 1999; 161: 280 (A: 1083).
- 176.** Brill A, Torchinsky A, Carp H et al. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 512-519.
- 177.** Lee J, Richburg JH, Shipp EB et al. The fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis is differentially up-regulated in Sertoli versus germ cell injury of the testis. *Endocrinol* 1999; 140: 852-858.
- 178.** Fisher MT, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of loss of mitochondrial membrane potential in epididymal spermatozoa by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) *Toxicology Letters* 2005; 157: 99–107.
- 179.** Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456–1462.
- 180.** Grisham MB, McCord JM. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Taylor AE, Matalon S, Ward PA (eds.), *Physiology of Oxygen Radicals*. Bethesda, MD: American Physiological Society; 1986: 1–8.
- 181.** Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem. J.* 2002; 365: 849-856.
- 182.** Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with *N*-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7162–7166.

- 183.** Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1995; 270:16487–16490.
- 184.** Mitropoulos D, Deliconstantinos G, Zervas A et al. Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potential role for nitric oxide and peroxynitrite in sperm dysfunction. *J Urol* 1996; 156:1952–1958.
- 185.** Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; 10:2247–2258.
- 186.** Um HD, Orenstein JM, Wahl SM. Fas mediates apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway. *J Immunol* 1996; 156:3469–3477.
- 187.** Virag L and Szabo C. The Therapeutic Potential of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitors *Pharmacol Rev* 2002; 54: 375–429.
- 188.** Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, and Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 1993 53:3976–3985.
- 189.** Tewari M, Quan LT, O'Rourke K et al. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADPribose) polymerase. *Cell* 1995; 81: 801–809.
- 190.** Smulson ME, Pang D, Jung M et al. Irreversible binding of poly(ADP)ribose polymerase cleavage product to DNA ends revealed by atomic force microscopy: Possible role in apoptosis. *Cancer Res* 1998; 58: 3495–3498.
- 191.** Yung TMC, Satoh MS. Functional competition between poly(ADP-ribose) polymerase and its 24 kDa apoptotic fragment in DNA repair and transcription. *J Biol Chem* 2001; 276: 11279–11286.
- 192.** Alvarez-Gonzalez R, Spring H, Muller M, Burkle A. Selective loss of poly(ADP- Ribose) and the 85-kDa fragment of poly(ADP-ribose) polymerase in nucleoli during alkylation induced apoptosis in HeLa cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 32122–32126.

- 193.** Kim JW, Kim K, Kang K, Joe CO. Inhibition of homodimerization of poly(ADP- Ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 8121–8125.
- 194.** Szabo C, and Dawson VL: Role of poly (ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19: 287–298.
- 195.** Shall S, and de Murcia G: Poly (ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mut Res* 2000; 460: 1–15.
- 196.** Tentori L, Portarena I, and Graziani G: Potential clinical applications of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors. *Pharmacol Res* 2002; 45: 73–85.
- 197.** Mizutani H, Tada-Oikawa S, Hiraku Y, Kojimab M, Kawanishi S. Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide *Life Sci* 2005; 76: 1439–1453.
- 198.** De Murcia JM, Niedergang C, Trucco C et al. Requirement of poly(ADP-Ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997; 94: 7303–7307.
- 199.** Beneke S, Diefenbach J and Burkle A. Poly(ADP-Ribosyl)ation inhibitors: promising drug candidates for a wide variety of pathophysiologic conditions. *Int. J. Cancer* 2004; 111: 813–818.
- 200.** Yu SW, Wang H, Poitras MF, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* 2002;297:259–263.
- 201.** Daugas E, Susin SA, Zamzami N, et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *Faseb J.* 2000;14:729–739.
- 202.** Zingarelli B, O'Connor M, Hake PW. Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways in colitis. *Eur J Pharmacol* 2003; 469:183-194.
- 203.** Saypol D C, Howards S S, Turner T T. Influence of surgically induced varicocele in testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest,* 1981. 68: 39.

- 204.** Dogruer ZN, Unal M, Eskandari G. Malondialdehyde and antioxidant enzymes in children with obstructive adenotonsillar hypertrophy. *Clin Biochem* 2004; 37: 718– 721.
- 205.** Prophet EB. Tissue processing: dehydration, clearing and infiltration. In *Laboratory Methods in Histotechnology* Armed Forces Institute of Pathology Washington D.C. 1992: pp 29-33.
- 206.** Kiernan JA. Fixation. In *Histological and Histochemical methods*. Arnold 1999; pp 11-35.
- 207.** Yoshida A, Miura K, Shirai M. Evaluation of seminiferous tubule scores obtained through testicular biopsy examinations of nonobstructive azoospermic men. *Fertil Steril* 1997 Sep; 68(3): 514-518.
- 208.** Mills B. Immünohistochemistry. In *Laboratory Methods in Histotechnology* Armed Forces Institute of Pathology Washington D.C. 1992: pp 247-255.
- 209.** Hinchey FR. Transmission Electron Microscopy. In *Laboratory Methods in Histotechnology* Armed Forces Institute of Pathology Washington D.C. 1992: pp 257-263.
- 210.** Oktar T, Ahmedov İ, Kadioğlu A. Varikosel Tedavisi. “Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi”. Türk Androloji Derneği Yayını, İstanbul 2004; 37: 463-472.
- 211.** Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwasser B. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. *Fertil Steril* 1995; 63(1): 120-124.
- 212.** Çayan S, Erdemir F, Ozbey I et al. Can varicocelectomy significantly change the way couples use asisted reproductive techniques? *J Urol* 2002; 167(4): 1749-1752.
- 213.** Kendirci M, Miroğlu C. Varikosel patofizyolojisi. ‘Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi’ (Editörler: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B ve ark.). Türk Androloji Derneği yayını, İstanbul 2004; 429-437.
- 214.** Socher S A, Yin Y, Dewolf W C. and Morgentaler A. Temperature-mediated germ cell loss in the testis is associated with altered expression of the cell-cycle regulator p53. *J Urol*, 1997; 157: 1986.
- 215.** Koksall T, Erdogru T, Toptas B. Effect of experimental varicocele in rats on testicular oxidative stress status *Andrologia* 2002; 34: 242–247.

- 216.** Ahotupa M, Huhtaniemi I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biol Reprod* 1992; 46: 1114–1118.
- 217.** Resendes AR, Majo´ N, Segale´s J et al. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; 99: 203–213.
- 218.** Lifshitz S, Lamprechta SA, Benharroch D et al. Apoptosis (programmed cell death) in colonic cells: from normal to transformed stage. *Cancer Letters* 2001; 163: 229-238.
- 219.** Tres LL, Kierszenbaum AL. Cell death patterns of the rat spermatogonial cell progeny induced by Sertoli cell geometric changes and Fas (CD95) agonist. *Dev Dyn* 1999; 214:361-371.
- 220.** Cam K, Simsek F, Yuksel M et al. The role of reactive oxygen species and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vitamin E treatment *Int J Androl* 2004; 27:228–233.
- 221.** Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann NY Acad Sci* 1952; 55:548- 573.
- 222.** Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1994: 1363-1434.
- 223.** Parvinen M. Cyclic function of Sertoli cells. In: Russell LD, Griswold MD (eds.), *The Sertoli Cell*. Clearwater, FL: Cache River Press: 1993: 331-347.
- 224.** Bergh A. Early morphological changes in the abdominal testes in immature unilaterally cryptorchid rats. *Int J Androl*. 1983; 6(1): 73-90.
- 225.** Saraiva KLA, Silva Junior VA, Dias ESF, Peixoto CA. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reprod Toxicol* 2006; 22: 754–759.
- 226.** Schlegel PN, Hardy M: Male Reproductive Physiology. In Lipschultz LI, Howards SS (eds): *Infertility in the Male*, 3rd edn. Mosby, St. Louis, 1997, pp 1448–1452.

227. Chaki SP, Misro MM, Gautam DK et al. Estradiol treatment induces testicular oxidative stress and germ cell apoptosis in rats. *Apoptosis* 2006; 11:1427–1437.

SİMGELER VE KISALTMALAR

DNA	: Deoksiribonükleik Asit
PARP	: Poli ADP-Riboz Polimeraz
3-AB	: 3-aminobenzamid
MDA	: Malondialdehit
DER	: Düz yüzlü Endoplazmik Retikulum
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)
FSH	: Folikül Uyarıcı (stimüle edici) Hormon
LH	: Luteinizan Hormon
ASA	: Anti-Sperm Antikor
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
HSP	: Isı Şok Proteini (Heat Shock Protein)
GnRH	: Gonadotropin Releasing (salıcı)Hormon
rLH	: Rekombinant Luteinizan Hormon
rFSH	: Rekombinant Folikül Uyarıcı Hormon
µm	: Mikrometre
SEM	: Scanning Electron Microscopy (Tarayıcı elektron mikroskobu)
tTG	: Doku Transglutaminazı
Ca⁺⁺	: Kalsiyum
AIF	: Apoptosis Inducing Factor (Apoptoz İndükleyici Faktör)
IAP	: Inhibitors of Apoptosis (Apoptoz İnhibitörleri)
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
ATP	: Adenozin Trifosfat
NADP⁺	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
gr	: Gram
mg/kg	: Miligram/Kilogram
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
X	: Ortalama
SD	: Standart Sapma
ü/g	: Ünite/Gram

SOD	: Süperoksit Dismutaz
GPx	: Glutatyon Peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
nm	: Nanometre
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfatlı Tuz Tamponu)
BSA	: Sığır Serum Albümini
°C	: Santigrad Derece

ŞEKİLLER VE RESİMLER

<u>Şekiller</u>	Sayfa No
Şekil 1. Apoptoz / Kaspaz yolu.....	29
Şekil 2. Çalışma grupları.....	37
Şekil 3. Grupların apoptotik indeks ortalamaları.....	47

<u>Resimler</u>	Sayfa No
Resim 1. Varikozel modeli oluşturulması.....	36
Resim 2. Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesitleri H&E.....	49
Resim 3. Sham grubuna ait seminifer tübül kesitleri H&E.....	49
Resim 4. Varikozel grubuna ait seminifer tübül kesitleri H&E.....	50
Resim 5. Varikozel + 3-AB grubuna ait seminifer tübül kesitleri H&E.....	50
Resim 6. Kontrol grubu İndirekt İmmünperoksidaz Metodu.....	51
Resim 7. Sham grubu İndirekt İmmünperoksidaz Metodu.....	51
Resim 8. Varikozel grubu İndirekt İmmünperoksidaz Metodu.....	52
Resim 9. Varikozel+3-AB grubu İndirekt İmmünperoksidaz Metodu.....	52
Resim 10. Kontrol grubu elektron mikrofrafı I.....	55
Resim 11. Kontrol grubu elektron mikrofrafı II.....	55
Resim 12. Kontrol grubu elektron mikrofrafı III.....	56
Resim 13. Varikozel Grubu elektron mikrofrafı.....	56
Resim 14. Varikozel+3-AB grubu elektron mikrofrafı.....	57
Resim 15. Varikozel+3-AB grubu elektron mikrofrafı.....	57

TABLÖLAR

<u>Tablolar</u>	Sayfa No
Tablo 1. Işık Mikroskopik Doku Takip Protokolü.....	39
Tablo 2. Elektron Mikroskopik Doku Takip Protokolü.....	43
Tablo 3. Gruplar arasında biyokimyasal değerlerine ait tanıtıcı istatistikler.....	45
Tablo 4. Gruplar arasında MDA ve antioksidan enzim değerleri açısından varikösel grubu ile diğer gruplar arasında yapılan ortalama karşılaştırmaları.....	46
Tablo 5. Grupların Johnsen skorlarının ortalamaları.....	46
Tablo 6. Grupların Johnsen skoru ortalamalarının varikösel grubu ile karşılaştırılması.....	47
Tablo 7. Grupların apoptotik indeks ortalamalarının varikösel grubu ile karşılaştırılması.....	48
Tablo 8. Grupların apoptotik indeks ortalamalarının varikösel + 3-AB grubu ile karşılaştırılması.....	48