



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

# VARİKOSELLİ SIÇANLARDA SPERMATOJENİK KÖK HÜCRELERİN DURUMUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYA TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Semih TAN**

Temmuz 2015  
DENİZLİ

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VARİKOSELLİ SIÇANLARDA SPERMATOJENİK KÖK  
HÜCRELERİN DURUMUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYA  
TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ**

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Semih TAN**

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ  
İkinci Danışman: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Denizli, 2015

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Semih TAN tarafından Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ yönetiminde hazırlanan "Varikoselli Sıçanlarda Spermatojenik Kök Hücrelerin Durumunun İmmünohistokimya Teknikleri İle Belirlenmesi" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş olup, kapsamı ve niteliği açısından bir yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Ülker CANKURT .....  
Dokuz Eylül Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Recep KUTLUBAY .....  
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Prof. Dr. Gülçin METE .....  
Pamukkale Üniversitesi

Üye: Doç. Dr. Emin Oğuzhan OĞUZ .....  
Pamukkale Üniversitesi

Üye(DANİŞMAN) Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ .....  
Pamukkale Üniversitesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14/07/2015  
Tarih ve 12-8...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zekiye Melek BOR KÜÇÜKATAY  
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Semih TAN  
İmza :



**ÖZET****VARİKOSELLİ SIÇANLARDA SPERMATOJENİK KÖK HÜCRELERİN DURUMUNUN İMMÜNOHİSTOKİMYA TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ**

Semih TAN

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

İkinci Danışman: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Temmuz 2015, 106 sayfa

Varikozel bulgularında germ hücrelerinin apoptozu, oksidatif stres, testiküler kan akımında değişme, renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite gibi patolojilere rastlanmıştır. Fakat literatürde varikozel durumunda spermatojenik kök hücrelerin durumuna ilişkin sınırlı sayıda bilgi yer almaktadır. Çalışmamızda varikozelin spermatojenik kök hücreler üzerine etkisi THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA ve Stro-1 belirteçleri kullanılarak, immünohistokimyasal analizler ile kısa ve uzun süre varikozel etkisine maruz kalmış sıçan testislerinde ortaya konmuştur. Kısa süreli varikozel gruplarında C-Kit, Thy-1, Sox-3, VASA ve DAZL ekspresyonları kontrol grubuna kıyasla azalırken, PLZF ifadesinin deney gruplarında arttığı görülmüştür. Stro-1 ekspresyonu tüm gruplarda negatif izlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Varikozel, THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA, Stro-1, IHCp, immünohistokimya, Spermatojenik kök hücre (SKH), Johnson skoru

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2013SBE009).**

**ABSTRACT****Detection of Spermatogonial Stem Cells' Status by Immunohistochemical  
Methods on Varicocele Rats**

TAN, Semih

Master Thesis, Department of Histology and Embryology

Thesis Advisor: Ass. Prof. Erdoğan KOCAMAZ (MD, PhD)

Co-advisor: Prof. Gülçin ABBAN METE (MD, PhD)

July 2015, 106 Pages

We have come across apoptosis of germ cells, oxydative stres, change in testicular blood flow, renal adrenal reflux, hormonal dysfunction and pathologies like autoimmunities in varicocele discoveries. However, in cited literature there is a very limited information about the case of spermatogenic stem cells in varicocele conditions. In our study, the impact of varicocele on spermatogonial stem cells has been put forward using the THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA and Stro-1 markers with immunohistochemical analysis on rat testis which have been exposed for long and short time period to the effect of varicocele. It has been revealed that while C-Kit, Thy-1, Sox-3, VASA and DAZL expressions are decreasing when compared to the control group, PLZF expression is increasing in the experiment groups. Stro-1 expression has been observed as negative in all groups.

**Keywords** : Varicocele, THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA, Stro-1, IHCp, immunohistochemistry, Spermatogonial stem cells (SSCs), Johnson's score

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects  
Coordination Unit through project number 2013SBE009.**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yanımda olan, manevi yönden desteğini hissettiren, tezimin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında, tez çalışması için ortamın sağlanmasında ve tezin her aşamasında özverilerini, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanlarım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE' ye ve Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin yürütülmesi esnasında, tüm laboratuvar imkânlarından faydalanmamı sağlayan ve laboratuvar çalışmalarımda önerileri ile bana yol gösterici olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Recep KUTLUBAY' a, Sayın Prof. Dr. Kenan ÇOYAN' a, Sayın Doç. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ' a, Sayın Doç. Dr. Nazan KESKİN' e, tezimin histolojik preparasyon aşamalarında tecrübelerinden yararlandığım Teknisyen Sayın Erdinç KARATAŞ' a, deney aşamasında her türlü imkanı sağlayan Veteriner Hekim Barbaros ŞAHİN' e, tez çalışmamda yardımlarını benden esirgemeyen Hatice ORUÇ, Nazlı ÇİL, Murat Serkant ÜNAL, Sacit Safa OCAK, Gürkan TURHAN, Duygu MEYDANCI ve Seçil YILDIRIM'a ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışan ve tezimin yapılmasında emeği geçen herkese ayrıca tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi' ne ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca her koşulda yanımda olan canım aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>iv</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. AMAÇ.....	2
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>3</b>
2.1. ERKEK GENİTAL SİSTEMİ EMBRİYOLOJİSİ .....	3
2.2. TESTİS ANATOMİSİ.....	3
2.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ .....	4
2.3.1. SEMİNİFER TÜBÜLLER.....	6
2.3.2. SERTOLİ HÜCRESİ.....	6
2.3.3. SPERMATOJENİK HÜCRELER .....	8
2.3.4. SPERMİOGENEZİS.....	10
2.3.5. OLGUN SPERM .....	10
2.3.6. İNTERSTİSYUM .....	11
2.4. TESTİS FONKSİYONLARI .....	12
2.5. VARİKOSEL.....	12
2.5.1. VARİKOSEL EPİDEMİYOLOJİSİ .....	12
2.5.2. ETİYOLOJİ .....	14
2.5.3. ANATOMİK ÖZELLİKLER VE PATOFİZYOLOJİ.....	15
2.5.4. VARİKOSELDE TESTİKÜLER HASAR .....	15
2.5.4.1. TESTİKÜLER KAN AKIMI.....	16
2.5.4.2. TESTİS-İNTERSTİSYEL SIVI İLİŞKİSİ .....	17
2.5.4.3. HİPERTERMİ.....	17
2.5.4.4. VENÖZ BASINÇ.....	18
2.5.4.5. RENAL-ADRENAL REFLÜ.....	19
2.5.4.6. HORMONAL DİSFONKSİYON.....	19
2.5.4.7. OTOİMMÜNİTE .....	20
2.5.4.8. AKROZOM REAKSİYONU.....	20
2.5.5. VARİKOSELİN TESTİS HACMİ ÜZERİNE ETKİSİ .....	21
2.5.6. VARİKOSELİN TESTİS HİSTOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİSİ .....	21
2.5.7. TANI VE TEDAVİ.....	22
2.6. HİPOTEZLER.....	25
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>26</b>
3.1. HAYVANLAR VE BAKIM ŞARTLARI .....	26
3.2. DENEYSSEL UYGULAMA .....	26
3.2.1. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI: .....	26
3.2.2. DOKULARIN ÇIKARILMASI: .....	27
3.2.3. DOKU TAKİP İŞLEMLERİ VE BOYAMA:.....	27

3.2.4. BOYANAN DOKULARIN İNCELENMESİ:	27
3.2.5. REAKTİF HAZIRLANMASI	27
3.3. UYGULANAN TEKNİKLER	28
3.3.1. DOKU TAKİP YÖNTEMİ	28
3.3.2. İMMUNOHISTOKİMYASAL BOYAMA	29
3.3.3. TESTİKÜLER HİSTOLOJİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ İÇİN MORFOLOJİK PARAMETRELERİN HESAPLANMASI	31
3.3.3.1. MODİFİYE JOHNSON SKORLAMASI	31
3.3.3.2. SEMİNİFER TÜBÜL ALANLARININ VE SEMİNİFER EPİTEL KALINLIĞININ HESAPLANMASI	31
3.3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	32
<b>4. BULGULAR</b>	<b>33</b>
4.1. KONTROL GRUBU BULGULARI	33
4.2. SHAM GRUBU BULGULARI	39
4.3. SOL VARİKOSEL GRUBU BULGULARI	44
4.4. BİLATERAL VARİKOSEL GRUBU BULGULARI	55
4.5. MORFOMETRİK ÖLÇÜMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	71
4.5.1. MODİFİYE JOHNSON SKORLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	71
4.5.2. SEMİNİFER EPİTEL KALINLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	72
4.5.3. SEMİNİFER TÜBÜL ALANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	74
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>76</b>
5.1. C-KİT EKSPRESYONU	83
5.2. DAZL EKSPRESYONU	85
5.3. PLZF EKSPRESYONU	86
5.4. SOX-3 EKSPRESYONU	87
5.5. THY-1 EKSPRESYONU	88
5.6. VASA EKSPRESYONU	89
<b>6. SONUÇLAR</b>	<b>90</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>91</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
ŞEKİL 1 TESTİS KAPSÜLÜ KATMANLARI.....	4
ŞEKİL 2 LEYDİNG HÜCRELERİ (OKLA İŞARETLİ).....	5
ŞEKİL 3 SEMİNİFER TÜBÜLLER.....	6
ŞEKİL 4 SERTOLİ HÜCRELERİ ( NÜKLEUSLARI OKLA İŞARETLİ).....	7
ŞEKİL 5 SERTOLİ HÜCRETİ (EM GÖRÜNTÜSÜ) .....	7
ŞEKİL 6 SPERMATOJENİK SERİ HÜCRELERİ .....	8
ŞEKİL 7 KONTROL PLZF IHCP SONUÇLARI: .....	33
ŞEKİL 8 KONTROL DAZL IHCP SONUÇLARI.....	34
ŞEKİL 9 KONTROL THY-1 IHCP SONUÇLARI .....	34
ŞEKİL 10 KONTROL VASA IHCP SONUÇLARI .....	35
ŞEKİL 11 KONTROL SOX 3 IHCP SONUÇLARI .....	36
ŞEKİL 12 KONTROL STRO-1 IHCP SONUÇLARI .....	37
ŞEKİL 13 KONTROL C-KİT IHCP SONUÇLARI .....	37
ŞEKİL 14 SHAM PLZF IHCP SONUÇLARI.....	39
ŞEKİL 15 SHAM DAZL IHCP SONUÇLARI .....	40
ŞEKİL 16 SHAM THY-1 IHCP SONUÇLARI .....	40
ŞEKİL 17 SHAM VASA IHCP SONUÇLARI.....	41
ŞEKİL 18 SHAM SOX-3 IHCP SONUÇLARI.....	41
ŞEKİL 19 SHAM STRO-1 IHCP SONUÇLARI:.....	42
ŞEKİL 20 SHAM C-KİT IHCP SONUÇLARI.....	42
ŞEKİL 21 SVKS PLZF IHCP SONUÇLARI: .....	44
ŞEKİL 22 SVUS PLZF IHCP SONUÇLARI .....	45
ŞEKİL 23 SVKS DAZL IHCP SONUÇLARI.....	45
ŞEKİL 24 SVUS DAZL IHCP SONUÇLARI .....	46
ŞEKİL 25 SVKS THY-1 IHCP SONUÇLARI: .....	46
ŞEKİL 26 SVUS THY-1 IHCP SONUÇLARI: .....	47
ŞEKİL 27 SVKS VASA IHCP SONUÇLARI: .....	48
ŞEKİL 28 SVUS VASA IHCP SONUÇLARI .....	49
ŞEKİL 29 SVKS SOX-3 IHCP SONUÇLARI .....	50
ŞEKİL 30 SVUS SOX-3 IHCP SONUÇLARI.....	50
ŞEKİL 31 SVKS STRO-1 IHCP SONUÇLARI .....	51
ŞEKİL 32 SVUS STRO-1 IHCP SONUÇLARI .....	51
ŞEKİL 33 SVKS C-KİT IHCP SONUÇLARI .....	52
ŞEKİL 34 SVUS C-KİT IHCP SONUÇLARI.....	53
ŞEKİL 35 BVKS PLZF IHCP SONUÇLARI .....	55
ŞEKİL 36 BVUS PLZF IHCP SONUÇLARI.....	56
ŞEKİL 37 BVKS DAZL IHCP SONUÇLARI.....	57
ŞEKİL 38 BVUS DAZL IHCP SONUÇLARI .....	58
ŞEKİL 39 BVKS THY-1 IHCP SONUÇLARI .....	59
ŞEKİL 40 BVUS THY-1 IHCP SONUÇLARI .....	60
ŞEKİL 41 BVKS VASA IHCP SONUÇLARI .....	61
ŞEKİL 42 BVUS VASA IHCP SONUÇLARI .....	62
ŞEKİL 43 BVKS SOX-3 IHCP SONUÇLARI .....	63
ŞEKİL 44 BVUS SOX-3 IHCP SONUÇLARI.....	64
ŞEKİL 45 BVKS STRO-1 IHCP SONUÇLARI .....	65
ŞEKİL 46 BVUS STRO-1 IHCP SONUÇLARI .....	66
ŞEKİL 47 BVKS C-KİT IHCP SONUÇLARI .....	67
ŞEKİL 48 BVUS C-KİT IHCP SONUÇLARI.....	68

<b>ŞEKİL 49</b> TÜM GRUPLARIN SEMİNİFER EPİTEL KALINLIKLARI ÖLÇÜMÜ.....	71
<b>ŞEKİL 50</b> TÜM GRUPLARIN SEMİNİFER TÜBÜL ALANLARI ÖLÇÜMÜ .....	74
<b>ŞEKİL 51</b> FARE SPERMATOGENEZ VE SEMİNİFER EPİTEL DÖNGÜSÜ. ....	77



## TABLolar DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>TABLO 3.1</b> DENEY GRUPLARI .....	<b>26</b>
<b>TABLO 4.1</b> KONTROL GRUBU TESTİS SEMİNİFER TÜBÜLLERİNDE THY1 (CD90), C KİT, SOX3, PLZF, DAZL, VASA, STRO-1 İFADESİ .....	<b>38</b>
<b>TABLO 4.2</b> SHAM GRUBU TESTİS SEMİNİFER TÜBÜLLERİNDE THY1 (CD90), C KİT, SOX3, PLZF, DAZL, VASA, STRO-1 İFADESİ .....	<b>43</b>
<b>TABLO 4.3</b> SOL VARİKOSEL GRUBU TESTİS SEMİNİFER TÜBÜLLERİNDE THY1 (CD90), C KİT, SOX3, PLZF, DAZL, VASA, STRO-1 İFADESİ .....	<b>54</b>
<b>TABLO 4.4.1</b> KISA SÜRELİ BİLATERAL VARİKOSEL GRUBU TESTİS SEMİNİFER TÜBÜLLERİNDE THY1 (CD90), C KİT, SOX3, PLZF, DAZL, VASA, STRO-1 İFADESİ .....	<b>69</b>
<b>TABLO 4.4.2</b> UZUN SÜRELİ BİLATERAL VARİKOSEL GRUBU TESTİS SEMİNİFER TÜBÜLLERİNDE THY1 (CD90), C KİT, SOX3, PLZF, DAZL, VASA, STRO-1 İFADESİ .....	<b>70</b>
<b>TABLO 4.5.1.1</b> MORFOLOJİK PARAMETRE ORTALAMALARI .....	<b>72</b>
<b>TABLO 4.5.1.2</b> GRUPLARIN JOHNSEN SKORU ORTALAMALARININ KONTROL GRUBU (99,54) İLE KARŞILAŞTIRILMASI .....	<b>72</b>
<b>TABLO 4.5.2</b> TUKEY TESTİNE GÖRE GRUP ORTALAMALARININ SEMİNİFER EPİTEL KALINLIKLARI AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI .....	<b>73</b>
<b>TABLO 4.5.3</b> TUKEY TESTİNE GÖRE GRUP ORTALAMALARININ SEMİNİFER TÜBÜL ALANLARI AÇISINDAN KARŞILAŞTIRILMASI .....	<b>75</b>
<b>TABLO 5</b> İNSAN VE FARE SKH'LERİNDE POZİTİF VEYA NEGATİF İFADELERİ SAPTANAN BAZI YÜZEY PROTEİNLERİ .....	<b>82</b>



**SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>ASA:</b> .....	Antisperm antikor
<b>BM:</b> .....	Bazal membran
<b>BVKS:</b> .....	Bilateral varikozel kısa süreli
<b>BVUS:</b> .....	Bilateral varikozel uzun süreli
<b>EKH:</b> .....	Embriyonik kök hücre
<b>GSPD:</b> .....	Geç evre spermatid
<b>IHCp:</b> .....	Parafin blok immünohistokimya
<b>JS:</b> .....	Johnson skorlaması
<b>LH:</b> .....	Leyding hücresi
<b>PAS:</b> .....	Periyodik asit shift
<b>PEH:</b> .....	Primordiyal eşe hücresi
<b>SH:</b> .....	Sertoli hücresi
<b>SKH:</b> .....	Spermatojenik kök hücre
<b>SPD:</b> .....	Erken evre spermatid
<b>SPG:</b> .....	Spermatogonya
<b>SPT I:</b> .....	Primer spermatozoid
<b>SPT II:</b> .....	Sekonder spermatozoid
<b>SPZ:</b> .....	Spermatozoa
<b>SVKS:</b> .....	Sol varikozel kısa süreli
<b>SVUS:</b> .....	Sol varikozel uzun süreli

## 1. GİRİŞ

Üretken yaşta evli çiftler arasında infertilite oranı %15 olarak saptanmıştır. İnfertilite bulgularının yaklaşık %50' si erkeğe bağlı infertilite olarak kayıtlara geçmiştir (Naughton, Nangia ve ark. 2001, Rajeev ve Rupin 2005, Kantartzi, Goulis Ch. ve ark. 2007, Association 2008, Delilbasi 2008). Erkek infertilitesi kayıtları içinde Avrupa'da yapılmış olan bir araştırma sonucuna göre 7802 erkek hastada varikozel %16,6 sıklıkla görülmüştür (Kantartzi, Goulis Ch. ve ark. 2007).

Varikozel genel anlamda, testis venlerinde sıvı basıncının artması ile ortaya çıkar ve pampiniform pleksus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu şeklinde tanımlanmıştır. %78-93 varikozel vakaları sol testiste gerçekleşmekteyken, bilateral varikozel görülme sıklığı çok daha azdır (Kantartzi, Goulis Ch. ve ark. 2007). Venöz pleksusun genişlemesine bakılarak birinci, ikinci ve üçüncü derece varikozel şeklinde derecelendirme yapılmaktadır (Rajeev ve Rupin 2005, Kantartzi, Goulis Ch. ve ark. 2007). Varikozel vakaları incelendiğinde nedenleri henüz tam olarak bilinmese de sperm morfolojisinde yapısal defektler, sperm DNA hasarı gibi birçok sperm parametresinde bozulmalar görülmektedir (Green, Turner ve ark. 1984, Moro, Marin ve ark. 2000, Marmar 2001, Naughton, Nangia ve ark. 2001, Barqawi, Caruso ve ark. 2004, De Stefani, Silingardi ve ark. 2005). Klasik varikozektomi veya mikro varikozektomi sonucu hastaların sperm parametrelerinde belli oranlarda iyileşme gösterilebilmiştir (Kantartzi, Goulis Ch. ve ark. 2007, Shiraishi, Matsuyama ve ark. 2012). Ancak sperm parametreleri düzelse bile hastaların bir kısmında tanımlanamayan infertilite devam etmektedir (Shiraishi, Matsuyama ve ark. 2012).

Erkeğe bağlı infertilitenin giderilmesinde spermatojenik kök hücrelerin varlığının saptanması, kök hücre transplantasyonunu mümkün kılmış ve bu sayede tedavi sağlanmıştır (Singh SR, O. Burnicka-Turek ve ark. 2011). Varikozel bulgularında germ hücrelerinin apoptozu, oksidatif stres, testiküler kan akımında değişme, renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite gibi patolojilere rastlanmıştır (Oguz I 2007, McLean DJ 2008).

### 1.1. Amaç

Literatürde varikozel bulgularında spermatojenik kök hücrelerin durumu ile ilgili çok az çalışma bulunmaktadır. Varikozelin histopatolojisine bakıldığında testis dokularında verdiği hasar gösterilmiştir. Bu patolojilerin germinal kök hücrelerini de kapsadığı öngörülmektedir. Bu araştırmanın birincil amacı varikozelin sperm kök hücrelerine etkisini immünohistokimyasal belirteçler yardımıyla ortaya koyarak literatür eksikliğini gidermektir. Elde ettiğimiz bulgular ışığında yapmayı planladığımız sonraki çalışmalarda bu hasarın boyutu kantitatif olarak araştırılacak ve elde edilen bulgular ışığında bu hasarın en aza indirilmesi veya tamamen giderilmesine imkan sağlanacaktır.



## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Erkek Genital Sistemi Embriyolojisi

Erkek üreme sistemi; testisler, genital boşaltım kanalları, aksesuar bezler (vezikula seminalis, prostat ve bulboüretal bezler) ve penisten oluşmaktadır (Moore ve Persaud 2008). Genital sistem gelişimi içinde erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri, embriyonik evrenin 7. haftası sonrası gelişime başlarlar. Gonadların gelişimi 5. Haftada ortaya çıkmaya başlar. Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar:

- Posterior abdominal duvar mezoteli
- Mezotel altındaki mezenşim doku
- Primordiyal germ hücreleri

Farklılaşmamış gonadların oluşumu mezonefrozun medialinde, mezotelde ortaya çıkan bir kalınlaşma ile başlar. Mezotelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde gonadal kabartı oluşur. Parmak şeklindeki gonadal kordonlar, altındaki mezenşim içerisine doğru büyürler. Bu yolla farklılaşmamış gonad dışta korteks ve içte medullaya sahip hale gelir. Eğer embriyo XX eşey kromozomu kompleksine sahipse gonad korteksi overe differensiyel olur, medullası geriler. Eğer XY eşey kromozomu kompleksine sahipse medulla testise farklılaşır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenerel olur (Sadler 1995, Moore ve Persaud 2008). Testisler, spermatogenez ve steroidogenez olmak üzere iki temel fonksiyona sahiptir. Androjenler spermatogenez ve erkek embriyonun fenotipik erkek fetusa gelişimi için gereklidir ve eşeyssel dimorfizmden sorumludurlar (Moore ve Persaud 2008).

### 2.2. Testis Anatomisi

Testisler, funiculus spermaticus'a asılı halde sağ ve sol bir çift olup scrotum içinde bulunurlar. Yaklaşık olarak 4-5 cm uzunluğunda, 2.5cm genişliğinde ve 3 cm kalınlığında olup 10-14 gr ağırlığındadır (Arıncı ve Ellah 1995).

Testis'in iki yüzü facies medialis ve facies lateralis, kenarları margo anterior ve margo posterior, uçları extremitas superior ve extremitas inferior adını alır.

Testislerin uzun eksenleri tam vertikal yönde bulunmaz. Üst ucu biraz önde ve dışta, alt ucu ise biraz arkada ve içte bulunur. Konveks ön kenarı biraz da dışa-aşağı doğru, arka kenarı ise yukarı-içe doğru bakar. Bu sayede uzun ekseni yukardan aşağıya, dıştan içe ve önden arkaya meyilli durur (Arıncı ve Ellah 1995, Snell 1995).

Testis'in ön kenarı, her iki yüzü ve uçları düz ve konveks olup, visseral periton ile kaplıdır. Arka kenarının sadece lateral kısmı peritonla örtülüdür. Peritonsuz olan medial bölümüne, epididimis tutunur ve buradan sinirler, damarlar ve kanallar geçer (Arıncı ve Ellah 1995).

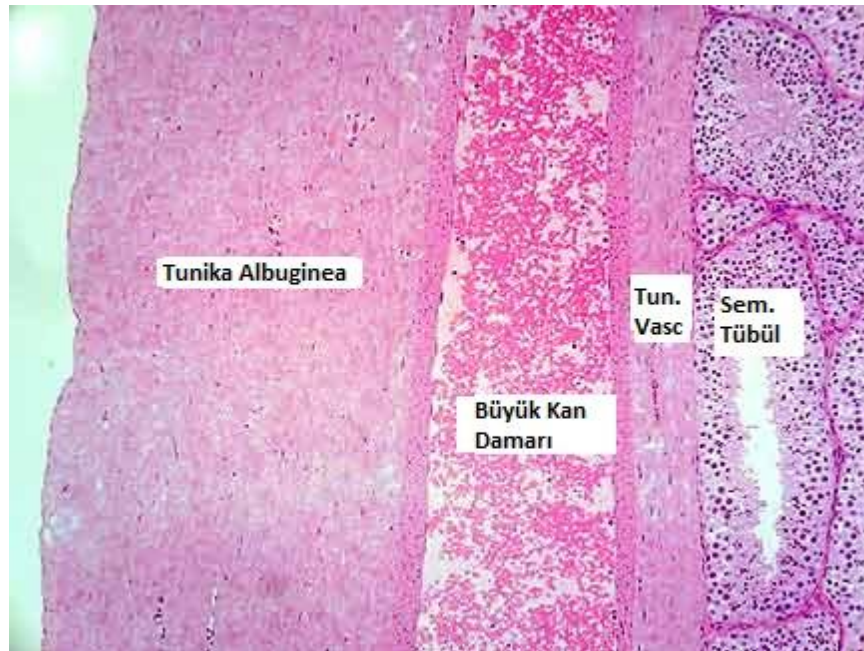
### 2.3. Testis Histolojisi

Dıştan testiküler kapsül ile sarılı olan testisler, skrotum içinde asılı durumda bulunurlar. Testiküler kapsül üç tabakadan meydana gelmiştir (ROSS ve PAWLINA 2014, WEB\_1 t.y).

1- Tunika Vaginalis: Testiküler kapsülün dış kısmında olup mezotelyal hücrelerden oluşan bazal lamina üzerine konumlanmış bir tabakadır. Testisin yan ve ön yüzeylerini çevreleyip yüzeyde skrotum üzerinde uzanarak T.vaginalisin paryetal tabakasını oluşturur. Testisin serbestçe hareketini sağlayan seröz boşluk ise visseral ve pariyetal tabakalar arasında bulunmaktadır.

2- Tunika Albuginea: Bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılan bu tabaka, kapsülün en belirgin katmanı olup düz kas hücrelerince zengin ve yoğun fibroelastik bağ dokusu yapısındadır. Bu düz kas hücreleri, testisin epididimise komşu olduğu posterior yüzeyde daha yoğun halde bulunmaktadır.

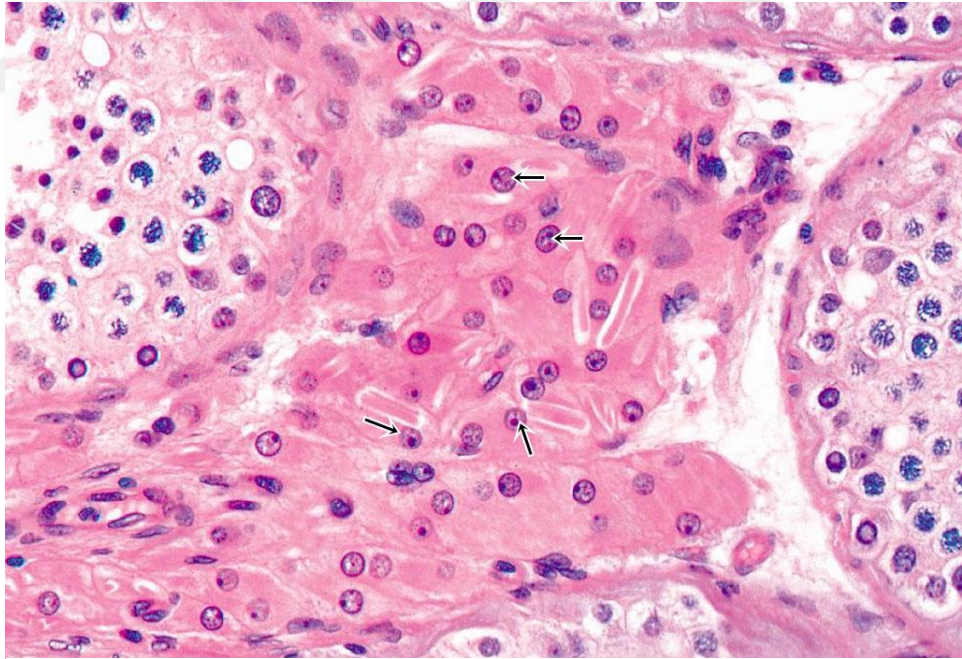
3- Tunika Vasküloza: İnce bir areolar bağ dokusu içerisine gömülmüş kan damarları ağlarından oluşan tunika vasküloza, testiküler kapsülün en iç tabakasıdır.



**Şekil 1** Testis kapsülü katmanları. (WEB\_2, 18.05.2015)

Tunica albuginea, testisin posterior yüzeyinde kalınlaşarak organ içerisine sokulur ve mediastinum testisi oluşturur. Mediastinum testisten kapsüle doğru ince, fibröz uzantılar testisin iç kısmını, lobuli testis (testis lobülleri) adı verilen 250 kadar piramidal kompartmanlara böler. Testis lobüllerinin apeksleri mediastinuma doğru olup herbir lobülde sayıları bir ile dört arasında değişen seminifer tübüller bulunmaktadır.

Tübülü rekti, mediastinum testiste yer alan seminifer tübüllerin düz kısımlarıdır ve rete testis denilen anastomoz gösteren kanallar sistemi ile mediastinum testiste devam eder. Sinirler, damarlar ve başlıca interstisyel hücreler (Leyding hücreleri) olmak üzere, stroma içerisinde pek çok tipte hücre bulunmaktadır. Leyding hücreleri, endokrin fonksiyona sahip çoğunlukla gruplar halinde düzenlenmiş, büyük ve oldukça önemli hücrelerdir.

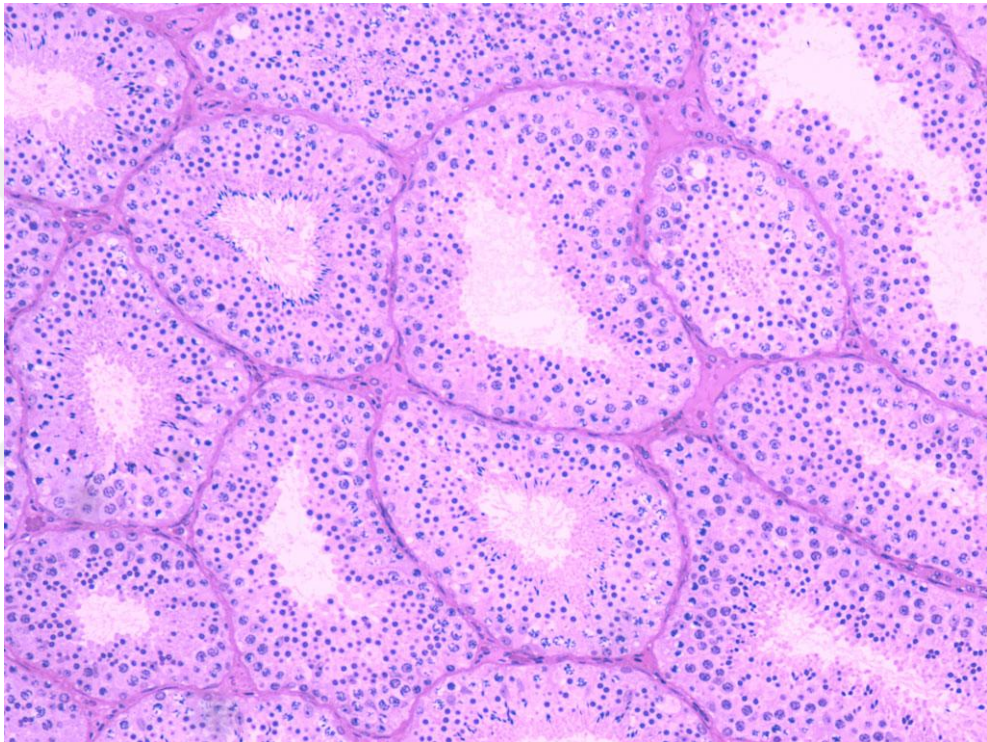


**Şekil 2** Leyding hücreleri (okla işaretli). (WEB\_3, 18.05.2015)



### 2.3.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller, yaklaşık 150-200 µm çapa, 30-80 cm uzunluğa sahip oldukça kıvrımlı yapılardır. Serbest kör uçlar veya anastomoz gösteren büklüntüler şeklinde başlayan tübüller, her lobülün apeksinde kıvrımlı özelliklerini kaybederek düz tübül haline geçerler. Seminifer tübül, seminifer epitel ya da kompleks bir germinal ile döşelidir. İnce bir bazal lamina üzerine konumlanmış olan epitel, dıştan sınırlayıcı ya da peritübüler doku adı verilen, özelleşmiş fibröz doku ile sarılmıştır. Peritübüler doku içerisinde, yassılaştırmış fibroblastlar, çok miktarda bağ dokusu lifleri ve düz kas hücresi özelliği gösteren myoid hücreler bulunmaktadır. Myoid hücreler kasılma(kontraksiyon)



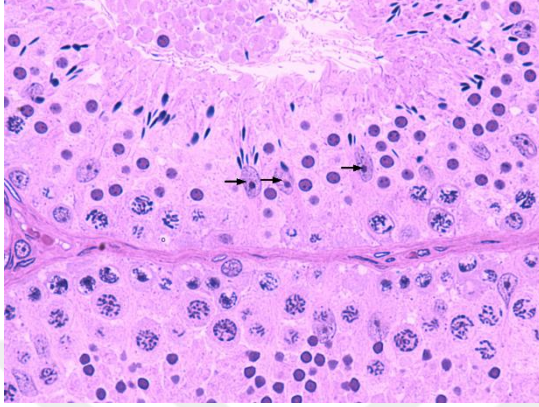
**Şekil 3** Seminifer tübüller. (WEB\_3, 18.05.2015)

ile spermatozoonların tübül içerisinde hareketine yardım ederler.

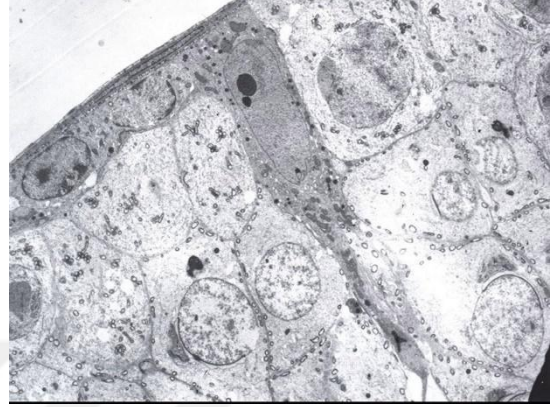
### 2.3.2. Sertoli hücresi

Bazal lamina üzerine konumlanmış, uzun ve prizmatik şekilli hücrelerdir. Bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanarak gelişmekte olan spermatojenik hücrelere kriptalar sağlarlar bu nedenle düzensiz lateral ve apikal hücre membranlarına sahiptirler. Sertoli hücresi, filamentöz bir kılıfla çevrili, hücre tabanının yukarısında yer alan, 7-9 nm kalınlığında, ökromatik yapıda bir hücre çekirdeğine sahiptir. Üçgen veya oval şekle sahip, soluk büyük çekirdek derin invaginasyonlarla karakterize olur ve 1-2

adet belirgin çekirdekçik içerir. Çekirdekçik oldukça belirgindir, merkezi asidofil kısmın periferinde bazofil materyal kümeleri görülür. Bu hücrelerin spermatojenik hücrelerden ayırt edilmesinde, karakteristik çekirdekçikler oldukça önemli bir kriterdir. Tespit edilmiş preparatlarda, içerisinde küçük fibriller, lipid damlacıkları ve küçük uzamış



**Şekil 4** Sertoli hücreleri ( Nükleusları okla işaretli) (WEB\_3, 18.05.2015)



**Şekil 5** Sertoli hücresi (EM görüntüsü) (WEB\_3, 18.05.2015)

mitokondriyonlar bulunan sitoplazma, retiküler görünümdedir.

İşlevleri,

1. Spermatojenik hücreler için gerekli besini ve fiziksel desteği sağlar.
2. Fruktöz bakımından zengin bir sıvı sentezler ve salgılar.
3. Sitoplazmik artıkları fagosite eder
4. Birbirleriyle sıkı bağlantılar yaparak spermatojenik hücreleri içlerinde muhafaza edip kandaki savunma hücrelerinin otoimmünitesine karşı korurlar [*Kan Testis Bariyeri*: Seminifer epiteli bazal ve apikal kompartmanlara böler. Bariyeri oluşturan yapılar; Bazal membran ve Sertoli hücreleri arası sıkı bağlantı kompleksidir (ZO-1, zonula okludin-1)] (Cheng, C. Y. ve D. D. Mruk 2012).
5. Testiküler transferin aracılığı ile demir alınımını sağlar.
6. İnhibin ve ABP salgılar.
7. Antimüllerian Hormon (MIF) ile embriyogenez sırasında ovaryum oluşmasına engel olur.



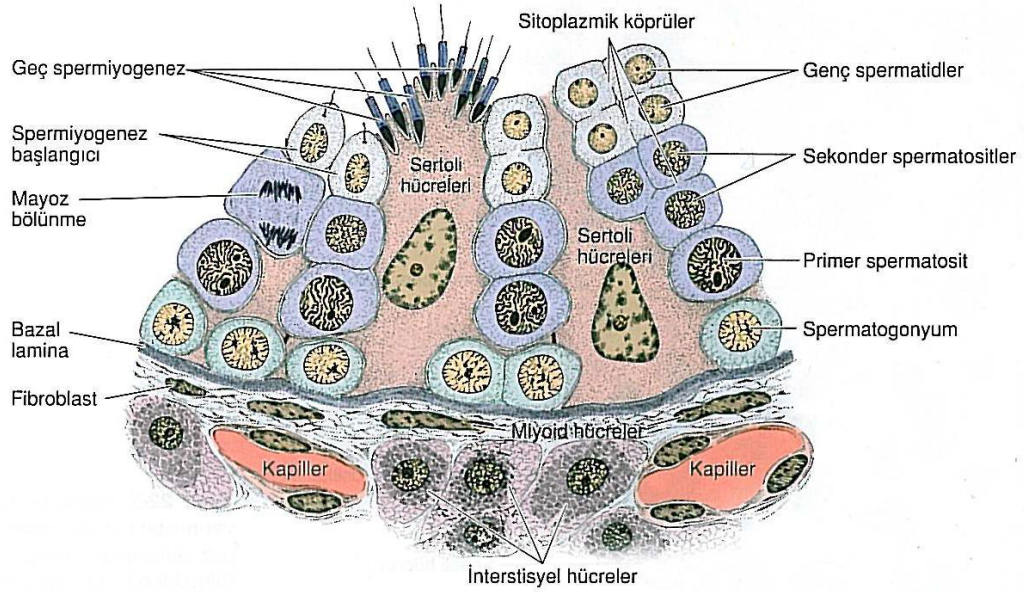
### 2.3.3. Spermatojenik Hücreler

Spermatojenik ya da germ hücreler, seminifer tübülü döşeyen ve derinliği 4-8 hücre arasında değişen çok katlı epiteli oluştururlar. Prolifere olan hücreler, tübülün bazalinden lümenine doğru ilerler, proliferasyon hücreleri lümeneye doğru ilerler. Lümeneye en yakın olan hücreler spermatozoonlara dönüşür ve epitelten ayrılarak lümen içerisinde serbest hale geçer. Bu olaylar dizisine spermatogenez adı verilir. Spermatogenez 3 aşamadan oluşur.

- Spermatogonyal faz: Mitoz bölünmeler sonucu, spermatogonyum farklılaşarak primer spermatisiti oluşturur.

- Spermatisit fazı (mayoz): Mayoza giren primer spermatisitler, kromozomlarını diploid sayıdan haploid sayıya indirgeyerek spermatidleri oluşturur.

Spermatid fazı (spermiyogenez): Spermatidler farklılaşarak olgun spermeleri oluşturur.



**Şekil 6** Spermatojenik seri hücreleri (Junqueira, L. C. ve J. Carneiro 2009)

Spermatogonyumlar puberteye kadar görülebilen tek germ hücreleridir ve Sertoli hücreleri gibi bazal lamina üzerine konumlanmışlardır. Her bir spermatogonyum çekirdeğinde diploid sayıda kromozom bulunmaktadır(44 otozom + XY). İnsanda 3 tip spermatogonyum belirtilmiştir.

1-Tip A koyu spermatogonyumlar: Ovoid ve koyu boyanan çekirdekleri vardır. Depo(reserv) kök hücreler olarak görev yaparlar ve bölünerek spermatogonyumların sayısını korurken aynı zamanda tip A açık spermatogonyumları oluştururlar.

2- Tip A açık spermatogonyumlar: Ovoid ve açık boyanan çekirdekleri vardır. Mitotik bölünmelerle diğer tip A açık spermatogonyumları ve tip B spermatogonyumları oluştururlar.

3- Tip B spermatogonyumlar: Koyu boyanmış kromatin yığınları içeren, nüklear membrana yakın küresel çekirdekleri bulunur. Tip B spermatogonyumların mitoz ile bölünmesi sonucunda meydana gelen yavru hücrelerin hepsi primer spermatositlere farklılaşırlar.

Bu olay sırasında yavru hücrelerin, hacimleri artar ve çekirdek karakterlerinde değişme olur ve yavru hücreler bazal laminadan lümene doğru uzaklaşır. Primer spermatositler epitelin orta kısımlarında yer alırlar ve seminifer tübül içerisinde görülebilen en büyük germ hücreleridir. Primer spermatositlerde görülen hücre bölünmesi çeşidi mayoz olarak adlandırılan redüksiyon bölünmesidir. Bunun sonucunda, herbir sekonder spermatosite ya da yavru hücreye 23 kromozom (22 otozom + 1 gonozom) geçer. Mayotik bölünmede sitokinez tam gerçekleşmemiştir ve primer spermatositlerin bölünmesi sonucunda oluşan sekonder spermatositler bir protoplazmik köprü ile hala birbirlerine bağlı haldedirler. Birbirlerine bağlı olan iki sekonder spermatosit tekrar mayotik olarak bölünür ve sitokinez tam olarak gerçekleşmediği için, oluşan 4 yeni hücre (spermatidler) birbirlerine bağlı haldedirler. Sekonder spermatositler, lümene daha yakın bulunurlar ve primer spermatositlerin yarısı kadarlardır. Sekonder spermatositler spermatidleri oluşturmak üzere çok kısa zamanda bölündükleri için seminifer tübül kesitlerinde görülmeleri oldukça güçtür. Buradaki bölünme II. Mayoz bölünmedir ve oluşan herbir spermatidte 23 kromozom bulunur (haploid sayı). Sekonder spermatositler bölünme ile daha da küçülür. Oluşan spermatidler artık lümene çok yakın haldedir.

Spermatidler, oluştuktan hemen sonra Sertoli hücrelerinin yüzeyine sıkıca tutunurlar (Sertoli hücre yüzeylerindeki derin çöküntüler içerisinde konumlanır). Bu bölgede spermatidler spermatozoonları oluşturmak için metamorfoza uğrarlar. Sonunda, spermatozoonlar arasındaki sitoplazmik devamlılığın kaybolması sonucu, hücrelerin Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine salındığı bu olaya spermiyasyon denir.

### 2.3.4. Spermiogenezis

Spermiogenezis 4 evrede özetlenebilir:

- Golgi evresi: İlk önce Golgi bölgesinde bulunan çok sayıdaki küçük vesiküller içerisinde küçük granüller görülür ve bu granüller tek büyük bir granül olan akrozomu meydana getirmek üzere birleşirler. Akrozom, Golgi bölgesi ile çekirdek arasında yer alan bir akrozomal vesikül içerisinde yer almaktadır. Akrozomal vesikül, Golgi bölgesinden köken alan bir membran ile çevrilidir.
- Şapka evresi: Akrozomal vezikül, nüklear membran yüzeyi üzerinde büyümeye başlayarak nüklear yüzeyin yaklaşık yarısını örter hale gelir. Golgi aparatı bundan sonra yerini terk ederek çekirdeğin diğer kutbuna doğru uzaklaşır.
- Akrozom evresi: Akrozom şeklinde yoğunlaşan vezikül, çekirdek üzerinde baş şapkasını meydana getirir, tabakaları arasında akrozom bulunmaktadır. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve tripsin benzeri proteaz olan akrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir. Çekirdek yoğunlaşarak hafifçe düzleşir ve incelik uzar, hücre membranının üzerine doğru ilerleyerek burada tam bir sperm başını oluşturur. Bu duruma kadar sitoplazma içerisinde değişikliklere uğrayan mitokondriyonlar, annulus ve bazal sentriol arasındaki bölgeye geçer, burada flagellumun etrafında heliks ya da spiral şekilde düzenlenerek mitokondriyal kılıfı oluşturur. Bunun sonucunda sitoplazmanın büyük bir kısmı kalıntı haline gelir
- Maturasyon (olgunlaşma) evresi: Kalıntı(residüel) cisimcikler atılır. Olgun spermatozoonun çekirdek, orta parça ve kuyruğu etrafında sadece çok ince bir sitoplazma kalmıştır. Residüel cisimcikler, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edildikten sonra germ hücrelerinin lipid içeriği Sertoli hücreleri sitoplazmasında tutulur. Kuyruk yapısal yönden bir silyuma benzer, içerisinde aynı sayıda ve aynı düzenlenmede longitudinal filamanlar bulunur. Kapasitasyon olarak bilinen, spermatozoon olgunlaşmasının son basamağı dişilere ejakülasyondan sonra görülür.

### 2.3.5. Olgun Sperm

60 µm uzunluğundaki olgun insan spermatozoonu baş, orta parça ve kuyruktan oluşur. 4.5 µm uzunluğunda, 1 µm kalınlığında ve 3 µm genişliğindeki baş kısmı yoğunlaşmış bir çekirdek ile anterior kenarlarında yoğun akrozom içeren baş şapkasından oluşmaktadır. Baş içerisinde genetik materyal ya da DNA bulunur. Akrozom, fertilizasyona yardım eden ve mitokondriyal kılıf kuyruk hareketinin kontrolünden sorumlu olan hyaluronidaz enzimine sahiptir. Spermin oosit ile teması

sonucunda akrozom reaksiyonuyla akrozom enzimleri salınır. Kuyrukta, periferinde 9 çiftli ve merkezinde 2 adet tekli mikrotülül bulunur.

#### Spermatogenezi etkileyen durumlar,

- Spermatogenez için çok önemli olan 35 °C sıcaklık, spermatik arteri saran venlerin oluşturduğu pampiniform pleksus tarafından skrotumda sağlanır.
- Sıcaklığı dağıtmak amacıyla, ters yönlü akımla ısı değişimi görevi görür. Sıcaklık 35 °C'nin altına düştüğünde, sıcaklığı artırmak için spermatik kordondaki kremaster kası ve skrotum kesesinin dartos kası kasılarak, testisleri karın boşluğuna yaklaştırır.

#### Ters Akım Isı Değişim Sistemi (CHES- Countercurrent Heat Exchange System)

Testisin ven ve arterlerinin bu şekilde bir arada ilerlemesi *Ters Akım Isı Değişim Sistemi(CHES)* olarak adlandırılır. Bu sistem ile testislere giren kan testisten dönen daha soğuk kan ile soğutulur, testisin sıcaklığının düşük tutulmasına yardımcı olur.

#### **2.3.6. İnterstisyum**

Lobuli testis içerisinde, seminifer tübüller arasında yer alan interstisyel dokuda, kollajen lifler, sinir lifleri, kan ve lenf damarları, fibroblast, makrofaj, mast hücreleri, farklılaşmamış mezenşimal hücreler ve testise özgü Leyding hücreleri bulunur. Leyding hücreleri genellikle tübüller arasındaki üçgen şeklindeki bölgelerde sık gruplar halinde bulunur. Çekirdekte belirgin bir çekirdekçik ve kaba kromatin granülleri vardır. İki çekirdekli Leyding hücreleri yaygındır. Sitoplazmaları ışık mikroskopunda genellikle vakuollü görünümündedir ve inklüzyon yönünden oldukça zengindir. İnküzyonlar içerisinde en önemli olanı lipid damlacıklarıdır. İnsanda, sitoplazmada ayrıca Reinke kristalleri denilen, çubuk şekilli lipofuksin pigmenti içeren kristalloidler de görülebilir. Elektron mikroskopide bu hücrelerin en önemli özellikleri steroid hormonlarının sentez edildiği yer(SER)in oldukça gelişmiş olmasıdır. Leyding hücreleri farklılaşarak erken fetal dönemde testosteron salgılamaya başlarlar. Testosteron, embriyonik dönemde erkek fetusta gonad gelişimi için esas olup pubertede ise sperm üretiminin başlaması, sekonder seks karakterlerinin gelişimi ve aksesuar bezlerin sekresyonundan sorumludur. Yetişkinde spermatogenezin, genital kanalların, aksesuar bezlerin ve sekonder seks karakterlerinin devamlılığı için gereklidir. Leyding hücreleri, erkek fetusta erken dönemde farklılaşır ve fetal hayatın 5. ayında inaktif duruma geçer. İnaktif durumdaki Leyding hücrelerini fibroblastlardan ayırmak zordur. İnaktif Leyding hücreleri, pubertede salınan gonadotropinlerin etkisiyle tekrar aktifleşir ve androjen salgılamaya başlarlar.

Leyding hücre tümörleri, çocuklukta ve 20-60 yaş arasında görülebilen, hormonal yönden aktif olup androjen salgılayan benign tümörlerdir. Bu benign tümörlerde, anormal hormon üretimi ile ilişkili olan testiküler büyüme ilk belirtidir. Prepubertal dönemdeki çocuklarda erken seksüel gelişmeye (sexual precocity), yetişkinlerde ise jinekomasti ve feminizasyona neden olmaktadır.

#### **2.4. Testis Fonksiyonları**

Testisin esas endokrin salgısı olan testosteron, interstisyel hücreler (Leyding hücreleri) tarafından sentez edilir. Testisin endokrin bezini oluşturan Leyding hücreleri, testisin mezanşimal stromasından köken alır, çoğu endokrin bezlerde olduğu gibi epitelyal yüzeyden gelişmez. Leyding hücreleri, çok miktarda kapillere sahip olan stroma içerisinde salgılarını vasküler sisteme kolaylıkla iletebilirler. Testosteron, spermatogenez üzerine etkisine ek olarak seksüel olgunlaşmayı, sekonder seks karakterlerinin görünümünü ve genital duktuslar ile yardımcı bezlerinin fonksiyonlarının devamlılığını kontrol eder. Erkek seks hücrelerinin yapımı testisin başlıca ekzokrin fonksiyonudur ve pek çok faktörlere bağlıdır. Hipofizin anterior lobundan salgılanan follikül uyarıcı hormon (FSH) memelilerde spermatogenezisi stimüle eder. FSH doğrudan Sertoli hücrelerini etkileyerek androjen bağlayıcı proteinin sentezi ve salınımını stimüle ederek testosteron ile bağlanıp seminifer tübül lümenine salınır. Sertoli hücreleri aynı zamanda kana geçerek ön hipofizden FSH salınımını inhibe eden inhibin denilen bir diğer testiküler hormonu salgılar.

#### **2.5. Varikosel**

Varikosel terimi ilk olarak 1846 yılında T.B Curling tarafından kaleme alınan bir vaka raporunda 1843te karşılaştığı bir olguda geçmektedir (Curling varikoseli). 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 başlanmıştır (Raifer 1998). Hastalık yüzyıllardır bilinmesine karşın patofizyolojisi günümüze kadar tam olarak aydınlatılamamıştır.

##### **2.5.1. Varikosel Epidemiyolojisi**

Varikosel, erişkin erkek popülasyonunun %15-22'sini etkileyen fiziksel bir anomalidir (Nieschlag vd 1998, Nagler vd 1997, Oğuz, I. 2007). İnfertilite nedeniyle başvuranların ortalama %30-40'ında varikosel saptanmaktadır (Varicocele and male

infertility 2001, Varikozel Kılavuzu 2004, Oğuz, I. 2007) Anormal semen analizi olan infertil erkeklerin de %25'inde varikozel bulunduğu bildirilmektedir (Saypol vd 1981, Oğuz, I. 2007). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 78923 numaralı ve 9043 hastanın değerlendirildiği projesinde, anormal semen parametrelerine sahip erkeklerin %25,4'ünde, normal semen parametrelerine sahip erkeklerin %11,7'sinde varikozelin bulunduğu bildirilmiştir (Turner 2001, Oğuz, I. 2007). Sekonder infertilite nedeniyle başvuran olgularda, varikozel görölme sıklığı artarak %69-81 oranına ulaşmaktadır (Ikeda vd 1999, Weese vd 1993, Jefferson 2000). Bununla birlikte, varikozele sahip olguların %80'inde infertilite bulunmamaktadır (Simsek vd 1998, Oğuz, I. 2007). Her ne kadar varikozelin 10 yaş altı çocuklarda görölmediği ve 10-14 yaş arasında sıklığının arttığını ortaya koyan çalışmanın verilerine dayanarak varikozelin yalnızca pubertede geliştii ileri sürölse de (Ahlberg vd 1966), Akbay ve arkadaşlarının 2-19 yaş arası 4052 çocukta yaptıkları kapsamlı prevalans çalışmasından elde edilen bulgular hastalığın erken yaşlarda da başlayabileceğini göstermektedir (Kadioğlu vd 1998). Bu çalışmaya göre, 2-10 yaşları arasında prevalans %0,92 iken, 11-19 yaşları arasında %11 düzeyine ulaşmaktadır. Varikozelin kalıtımla ilişkisini araştıran başka bir çalışma ise, varikozeli olan erkeklerin birinci derece akrabalarında hastalığın görölme sıklığı %53 gibi genel populyasyondan önemli derecede yüksek oranda saptanmaktadır (Pinto vd 1994, Oğuz, I. 2007, Doğan, F. 2011).

Erkek infertilitesinin en sık düzeltilebilir nedeni olan varikozel, spermatik kord içerisinde pampiniform pleksusu oluşturan venlerde dilatasyon, staz ve yüksek basınç ile karakterizedir (Raifer 1998, Ahlberg vd 1966). Varikozel sol renal venin veya internal spermatik venin tümör ya da başka bir patoloji sonucu kompresyona uğraması sonucu oluşabilir. İleri evre böbrek tümörünün renal vene invazyonu sonrası veya bu venin obstrüksiyonuna sekonder olarak da oluşabilen varikozelle klinikte infertilite şikayetiyle gelen hastaların çoğunda karşılaşılr ve infertilite ile ilişkili olan primer varikozeldir (Kadioğlu 1998, Oğuz, I. 2007).

Erişkin erkek populyasyonunun %15-22'sini etkileyen bir hastalık olan varikozel oranı, infertilite şikayeti ile başvuran erkeklerde ortalama %30-40 iken anormal semen parametrelerine sahip infertil erkeklerde ise %25'tir. (Nieschlag, Hertle vd. 1998). Sekonder infertilite nedeniyle kliniğe başvuran olgularda ise varikozel görölme sıklığı artarak %69-81 oranına ulaşmaktadır ve bununla birlikte, varikozele sahip olguların %80'inde infertilite bulunmamaktadır (Pinto, Kroovand vd. 1994). Varikozeli olan erkeklerin birinci derece yakınlarında hastalığın görölme sıklığı %53 oranında saptanmış olup bu oran genel populyasyondan önemli derecede yüksektir. Ayrıca, ırlara göre sıklık farkı bildirilmemiştir (Lipschultz ve Corriere 1977).

### 2.5.2. Etiyoloji

Varikoselin etiyojisi için anatomik değişkenlikler, doğumsal ve/veya edinsel valv disfonksiyonuna ikincil gelişen venöz reflü ve venöz obstrüksüyon gibi değişik teoriler ileri sürülmektedir.

Varikosel etiyojisinde günümüzde kabul görmüş 3 teori bulunmaktadır (Naughton vd 2001).

1.Sağ ve sol internal spermantik venler arasında anatomik farklılıklar: Sol internal spermantik ven sol renal vene dik açıyla drene olurken, sağda dar açı ile oblik olarak vena kava inferiora drene olur. İnternal spermantik ven, solda sağa göre 8-10 cm daha uzundur. Anatomik yapıdaki bu farklılıklar, sol tarafta hidrostatik basınç artışına neden olmaktadır ve sonucunda pampiniform pleksusa iletilen basınç venlerde dilatasyon ve kıvrılmaya yol açmaktadır (Grillo-Lopea 1979).

2.Venöz kanın reflüsü ile sonuçlanan kompetan venöz valvlerin olmayışı: Varikoselli erkeklerde sol renal ven ve internal spermantik ven birleşim düzeyinde valv bulunmadığı gösterilmiştir (Kohler 1967, Ahlberg vd 1966, Coolsaet 1980, Comhaire vd 1981). Ayrıca Ahlberg'in 1965 yılında rasgele seçilen 79 kadavrada yaptığı çalışma, sol internal spermantik venin kranial kısmında % 46 oranında valv olmadığını göstermiştir (Ahlberg vd 1966). Yapılan başka bir çalışmada ise varikoseli olan 659 erkeğin retrograd venografik çalışması incelendiğinde % 73'ünde venöz valvlerin bulunmadığı gösterilmiştir (Braedel vd 1994). Ancak, yeterli kapakçık sistemine sahip hastalarda da % 26,2 oranında varikosel görülebilmektedir (Wishahi 1991). Bazı araştırmacılara göre, kapakçıkların yokluğu varikosel gelişimine katkıda bulunmaktadır, ancak, direkt altta yatan neden değildir (Wishahi 1991, Shafik vd 1990).

Reflüdeki ikinci mekanizma ise, venöz kollaterallerin varlığında kan akımının normal gonadal venöz sisteme olan reflüsüdür (Comhaire vd 1981). Pleksus pampiniformiste kollateral oluşturan iki venöz sistem bulunmaktadır:

a)Yüzeyel venöz sistem

b)Derin venöz sistem

Yüzeyel venöz sistemde skrotal, eksternal spermantik, epigastrik, safen ve femoral venler bulunurken, derin venöz sistem, penil, krural, pelvik, lomber ve renal venöz sistemi içerir. Varikoselde internal venöz sistemdeki dilatasyona ek olarak, eksternal kremasterik sistemin dilatasyonu da klinik öneme sahiptir. Coolsaet, sol ana iliak venin parsiyel obstrüksiyonunda eksternal spermantik vende ve pampiniform pleksusda dilatasyon olduğunu göstermiştir (Coolsaet 1980). Eksternal spermantik ven, varikoseli

saptanmayan erişkinlerde normalde 2-3 mm çapında iken 4 mm ve daha dilate eksternal spermatik ven çapı görülme oranı ise %16-74 olarak bildirilmiştir (Beck vd 1992). Varikoselektomi sırasında saptanamayan ya da bağlanmayan bu venler nedeni ile nüks oluşabilmektedir.

3. Sol gonadal venöz sistemde hidrostatik basınçta artışa neden olan bir diğer anatomik mekanizma “nutcracker” yani sıkıştırılma fenomeni: Sol renal venin, aorta ile superior mezenterik arter arasına sıkışması sonucu sol testiküler vende kısmi obstruksiyon oluşur. Bu duruma fındıkçıran fenomeni (Nutcracker fenomeni) denir ve iki tipe ayrılır:

a)Klasik tip (proksimal tip): Abdominal aortun anteriorunda, superior mezenterik arterin posteriorunda seyreden sol renal venin kompresyona uğraması. (insidans: % 0.7).

b)Distal tip: Sol ana iliak arterin kompresyonuna bağlı olarak sol ana iliak venin kompresyona uğraması (insidans: % 0.5) (Braedel vd 1994).

Varikosel gelişiminde embriyolojik faktörlerin de rol oynadığı ileri sürülmektedir. Embriyolojik gelişim esnasında sol taraftaki vasküler yapılar daha elastik dokuya sahip olduğu için sol tarafın daha zayıf drene olmasına ve kollateral venlerin açık kalmasına neden olmaktadır (Braedel vd 1994, Wishahi 1991). Situs inversusta sadece sağda varikosel görülmesi bu embriyolojik olayı destekler.

### **2.5.3. Anatomik Özellikler ve Patofizyoloji**

Varikosel lokalizasyon olarak daha çok sol tarafta görülür. Varikoselin solda görülme sıklığı yaklaşık % 90 oranındayken, tek başına sağ tarafta ise % 2'den azdır. İzole sağ varikosel situs inversus dışında vena kava inferior ya da sağ internal spermatik vende kompresyona veya obstrüksüyona yol açan patolojilere (tromboz) bağlı olarak oluşur (Grillo-Lopea 1979).

### **2.5.4. Varikoselde Testiküler Hasar**

Erkek infertilitesinin en sık rastlanan nedenleri arasında yer alan varikoselin hem hayvanlarda hem insanlarda progresif ve zamanla artan testis hasarına yol açtığı bilinmektedir. (Nagler vd 1997). Varikosel, ilerleyici testis hasarı, testis gelişiminde gerileme ve spermatogenezi bozarak adım adım infertiliteye neden olabilir.

Varikoselin fertilité üzerine etkileri şunlardır;

- sperm sayısında azalma,



- sperm motilite ve morfolojisinde bozulma,
- testiküler hacimde azalma
- Leydig hücre fonksiyonunda azalma.

Varikoselin patofizyolojisi konusunda olası hipotezler arasında,

- 1.Hipertermi,
- 2.Testiküler kan akımında ve venöz basınçta değişiklikler,
- 3.Renal ve adrenal artık ürünlerin reflüsü,
- 4.Beslenme değişimi ya da interstisyel sıvı oluşumunda değişikliklere yol açan testiküler vasküler değişiklikler,
- 5.Hormonal disfonksiyon,
- 6.Otoimmünite,
- 7.Akrozom reaksiyon defekti,
- 8.Artmış oksidatif stres,
- 9.Apoptozis,
- 10.Kadmiyum gibi ağır elementler sayılabilir.

Ancak varikosele bağlı testiküler disfonksiyonda en çok kabul gören iki teori, testiküler ısı artışı ve venöz reflüdür.

#### **2.5.4.1. Testiküler Kan Akımı**

Vasküler bir olay olan varikoselin patofizyolojisinin aydınlatılabilmesi için vasküler yapıya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Green ve Turner bağımsız olarak deneysel hayvan modellerinde varikosele indüksiyonu ile intratestiküler mikrovasküler kan akımında artış olduğunu, birlikte histolojik değişiklikler meydana geldiğini göstermişlerdir (Turner 2001, Francis ve Mark 1998). Mikrovasküler kan akımı ve intratestiküler ısı yüksekliği fosforilaz aktivitesi ve metabolizmasında artışa neden olur. Bu aktivitenin intrasellüler glikojen depolarını tüketerek sonuçta testiküler parankimal hasara yol açtığı düşünülmektedir (Francis ve Mark 1998). Saypol ve arkadaşları sıçanlar ve köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada deneysel olarak oluşturulan varikoselin testiküler kan akımında artışa neden olduğunu ve bu artışın erken cerrahi onarımı takiben normal düzeylere indiğini göstermişlerdir (Saypol vd 1981).

Bu bulguların aksine, deneysel varikosel modelinde kan akımının azaldığını gösteren Li ve arkadaşları, bunun bozulmuş Sertoli hücre fonksiyonunun göstergesi olduğunu savunmuşlardır (Li vd 1999).

Yapılan insan çalışmalarında varikoseli olmayan kontrollere göre varikoseli olanlarda kan akımında anlamlı farklılıklar olduğu renkli doppler ultrasonografi ile gösterilmiştir (Grasso vd 1997).

#### **2.5.4.2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi**

Seminifer tübülü ve interstisyel dokudaki hücreleri saran testiküler interstisyel sıvı testis ve testis vaskülaritesi ile bağlantılı olup, testiküler hücreler ve dolaşım arasında endokrin etkileşimi ve hücreler arasındaki parakrin mekanizmaları düzenler. Testiküler interstisyel sıvı oluşumunu kontrol eden faktörler testis işlevinde önemli rol oynamaktadır (Kendirci ve Miroğlu 2004, Sharpe 1984) ve bu faktörlerden birisi testis kapillerlerinin vasküler geçirgenliği olabilir. Bu görüş varikosel oluşturulan ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı oranda fazla polimorfonükleer hücre birikiminin olması bulgusuyla desteklenmektedir. Bu birikimin sol tarafta sağa kıyasla daha fazla gerçekleştiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Salama 2003).

#### **2.5.4.3. Hipertermi**

Testiküler disfonksiyon için en yaygın kabul gören teorilerin başında gelen hipertemi ile ilgili yapılan çalışmalarda, oligospermik varikoselli hastalarda intraskrotal ısının, varikoseli olmayan kişilere göre 0,6-0,8 C°, intratestiküler ısının da 0,78 C° daha fazla olduğu gösterilmiştir (Zorgniotti ve MacLeod 1973, Sigman ve Howards 1998). Saypol ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada tek taraflı deneysel varikosel oluşturulan hayvanlardaki incelemeler sonucunda bilateral testiküler ısı artışı ve bozulmuş spermatogenez saptanmıştır (Saypol 1981). Tüm bunların aksine, varikoseli olan ve olmayan infertil erkeklerde skrotal ısı arasında fark olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Lund ve Nielsen 1996).

Yapılan bir çalışmada adolesan grade 2-3 varikoseli olanlarda hem yatar durumda hem de ayakta ölçülen skrotal ısı düzeyleri, varikoseli olmayan kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Dahl ve Hendrick 1959). Varikosele bağlı sol tarafta skrotal ısı artışı olan adolesanlarda, ısı artışı ile sol testis volümünün ters korelasyon gösterdiği bulunan ve başarılı varikoselektomi sonrasında ısı azalırken testis volümünün arttığı ileri sürülen çalışmalar da bulunmaktadır (Salisz vd 1991).

Varikosektomi sonrasında bilateral intraskrotal ısı artışının kontrol grubu düzeylerine indiği ileri sürülmesine karşın, aksi görüşler de bulunmaktadır (Wright vd 1997, Lerchl vd 1993). Skrotal ısı ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlara ulaşılması, ısının ölçüm yöntemindeki farklılıklara bağlı olarak değişebildiği düşüncesini güçlendirmiştir.

Green ve arkadaşlarının hayvanlarda yaptığı çalışmada, deneysel olarak oluşturulan varikoselin intraskrotal ısı artışına neden olduğu ve varikosel onarımı ile ısının normal hale döndüğü gösterilmiştir (Green vd 1984). Yapılan çalışmalarla intraskrotal ısı artışının testiküler histolojide anormalliklere neden olduğu ve ejakülattaki sperm kalitesini düşürdüğü de bildirilmiştir (Saypol vd 1981, Shafik vd 1989).

Artmış intratestiküler ısı çeşitli mekanizmalarla spermatogenez bozar ancak bu tam olarak aydınlatılamamıştır. Seminifer tübül ve/veya Leydig hücrelerinde nükleer DNA ve RNA bağlayıcı proteinlerde direkt termal hasar sonucu spermatogenez etkilediği düşünülmektedir (Fujisawa vd 1989). Fujisawa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar, Sertoli hücrelerinden inhibin ve androjen bağlayıcı proteininin salınımının azaldığını ancak, kısa dönemde Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunun bozulmadığını düşündürmektedir (Fujisawa vd 1988). Fujisawa ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada ise tek taraflı varikoseli olan infertil hastaların, varikoseli olmayan kontrol grubuna göre her iki testislerinde DNA polimerazların ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) aktivitesinde %50 azalma olduğu bulunmuş ve diğer bir mekanizmanın DNA polimeraz aktivitesinde azalma olduğu ileri sürülmüştür (Fujisawa vd 1989).

#### **2.5.4.4. Venöz Basınç**

Varikosel ve venöz basınç değişiklikleri arasındaki ilişki uzun süredir araştırılmakta olup patofizyolojik mekanizmasını aydınlatmak için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarla varikosele sekonder gelişen venöz basınç artışının testis kan akımını etkileyebileceği gösterilmiştir (Sweeney vd 1991 – Shafik 1983). Hamster testisinin subkapsüler yüzeyinde bulunan mikrodamarlardaki intravasküler basınçların direk ölçümü, testiküler kapiller basıncın çok düşük olduğunu ve vasküler ağın arteryel komponenti tarafınca düzenlendiğini ortaya koymuştur ve vasküler direncin dağılımı, hamster modelindeki venöz basınç artışına kapiller basıncın oldukça duyarlı olabileceğine işaret edebilir (Sweeney vd 1991). Venöz basıncın artması, intratestiküler onkotik ve hidrostatik basınçlarda değişiklik olması, önemli hormonlar için parakrin ve taşınma ortamının değişmesi ve mikrovasküler sıvı değişimini bozulması sonuçlarını doğurabilir.

Shafik'in 1983'te yaptığı varikoselektomi uygulanan 60 olguluk bir çalışmada, olguların % 88'inde cerrahi sonrasında venöz basınç değerlerinde azalma saptanmıştır (Shafik 1983). 42 hastanın % 70'inde hem venöz basınçta azalma hem de semen parametrelerinde iyileşme gözlenirken, bu grup için gebelik oranı % 32 düzeyinde gerçekleşmiştir. Ayrıca venöz basınçta varikozel onarımı ile azalma sağlanan olgularda, sağlanmayanlara göre sperm motilitesinde düzelme daha fazla bulunmuştur.

#### **2.5.4.5. Renal-Adrenal Reflü**

Böbrekte oluşan katekolaminler, kortizol, serotonin, anjiyotensin-1, fosfolipaz A2, prostaglandin E ve F2 $\alpha$ , serbest oksijen radikallerinin testislere olan reflüsü ve buna bağlı bozulan spermatogenez, testiküler disfonksiyonu açıklayan diğer bir teoridir (Ito vd 1982). Bazı deneysel çalışmalarda prostaglandin ve katekolaminlerin spermatogenezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak diğer metabolitler hakkındaki bilgiler çok sınırlıdır (Yaman ve Özdiler 2000).

Comhaire ve Vermeulen'in yaptığı çalışmada varikozel cerrahisi sırasında, testiküler geri akımın olduğu venlerden alınan kandaki katekolamin düzeyi, periferik venlerden alınanlara oranla 3 kat daha fazla iken, kontrol grubunda bu oran 1,5 kat fazla bulunmuştur (Comhaire ve Vermeulen 1974). Steeno ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise varikozeli olan infertil hastalarda katekolaminler dışındaki metabolitlerin (kortizol, DHEA gibi) spermatik venlerdeki konsantrasyonu, periferik venlerden farklılık göstermemektedir (Steen vd 1976).

#### **2.5.4.6. Hormonal Disfonksiyon**

Varikozeli olan infertil olgularda, Leydig hücre fonksiyonunun bozularak testosteron üretiminde azalmaya yol açabileceği üzerinde durulmuş ve birçok rat modelinde yapılan çalışmada spermatogenezin devamı için en az 20 ng/ml intratestiküler testosteron konsantrasyonu gerektiği bildirilmiştir (Kendirci ve Miroğlu 2004). Serum testosteron konsantrasyonunda etkilenme görülmezken intratestiküler testosteronda belirgin azalma olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Rajfer vd 1987). Turner ve Lopez tarafından yapılan bir çalışmada ise sol varikozel oluşturulan ratlarda bilateral intratestiküler testosteron konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir (Turner ve Lopez 1990). Ayrıca, tek taraflı varikozelin, intratestiküler testosteron konsantrasyonunda bilateral ve eşit düzeyde düşmeye yol açtığı belirlenmiş ve testosteron biyosentezinden sorumlu 17,20-dezmozolaz ve 17  $\alpha$ -hidroksilaz enzimlerinin düzeyinde de belirgin azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Bu çalışmalar testosterondaki

azalmanın sentezde bozukluktan kaynaklandığını düşündürmektedir (Kendirci ve Miroğlu 2004).

Mikrocerrahi varikosektominin hormonal parametrelere etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, varikozel onarımının Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunu artırdığını, serum serbest testosteron düzeyindeki anlamlı artışa sperm sayı ve motilitede iyileşmenin de eşlik ettiğini bildirmişlerdir (ayan vd 1999). Bunun aksine varikozeli olan hastalardaki folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinizan hormon (LH), testosteron ve östradiol gibi hormon düzeylerinin normal sınırlarda kaldığı yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (Hudson vd 1981, Schiff vd 1976).

Bu bilgiler ışıkında varikozelin hipotalamo-hipofizer gonadal aksı olumsuz yönde etkilediği ve özellikle anormal Leydig hücre işlevi olan olguların varikozel onarımından yarar görmeyeceği söylenebilir (Kendirci ve Miroğlu 2004).

#### **2.5.4.7. Otoimmünite**

Kan-testis bariyerinin bozulması antisperm antikor (ASA) retimini tetikleyerek varikozel patofizyolojisinde rol alır. Bu bariyeri bozan etyolojilerden bazıları, testis torsiyonu, duktal obstrüksiyon, epididimit, prostatit ve testis travmasının yanı sıra varikozel de bulunmaktadır (Jarrow ve Sanzone 1992). Turner ve arkadaşlarının ratlarda oluşturduğu bir varikozel modelinde, sham ve opere edilmeyen ratlara göre varikozel oluşturulan ratlarda daha yüksek düzeyde ASA birikimi olduğu gösterilmiş, ancak varikozelin hangi mekanizmalarla kan-testis bariyerini bozmadan ASA'ları uyardığı açıklanamamıştır (Turner vd 1987).

#### **2.5.4.8. Akrozom Reaksiyonu**

Akrozom reaksiyonu varikozel patofizyolojisi ile ilgili diğer bir güncel konudur. Varikozel, sperm sayı ve morfolojisinden daha çok sperm fonksiyonunda defekt oluşturarak zona pellusidaya bağlanma sırasındaki akrozom reaksiyonunda bozulma oluştuğunu düşünen araştırmacılar bulunmaktadır (Rogers vd 1985, Virgil vd 1994). Kendirci ve Miroğlu, varikozeli olan hastalarda akrozom reaksiyonunu olumsuz etkileyen önemli sperm plazma proteinlerinin ekspresyonundaki moleküler farklılıkların, fertilitte üzerine değişken etkilere neden olabildiğini yaptıkları çalışmalarla göstermişlerdir (Kendirci ve Miroğlu 2004).

### 2.5.5. Varikoselin Testis Hacmi Üzerine Etkisi

Varikoselin, bulunduğu evreye ve etki süresine bağlı olarak testis büyüklüğünde atrofiye sebep olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hans vd 1991). Genel olarak kabul gören bir bulguya göre varikozel olgularında aynı taraf testis hacminde küçülme olmaktadır (Kass vd 2001 – Zini vd 1997). Varikozelde karşı testis hacminde artış olduğunu söyleyen yayınların yanı sıra hacimde azalma olduğu bildirilen yayınlar da bulunmaktadır (Kass vd 2001 – Ku vd 2002). Farklı araştırma gruplarının yaptığı çalışmalarla, grade 2 ve 3 varikozelde testis atrofisi (Thomas ve Elder 2002), grade 1 ve 2 varikozelde aynı taraf testiste rölafif atrofi (Zini vd 1998), subklinik varikozelde de testiküler atrofi (Zini vd 1997), subklinik varikoselin testis hacmi üzerine etkisi olmadığı (Akcar vd 2004), grade 1 varikoselin testis hacmi üzerine herhangi bir etkilerinin olmadığı ancak grade 2 varikoselin sol testis hacim kaybına ve grade 3 varikoselin ise hastalarda bilateral testis hacminde azalmaya yol açtığı (Kass vd 2001), yüksek gradeli varikozelde karşı taraf testiste hipertrofi görülebileceği (Ku vd 2002), varikozel ile testis hacmi arasında bir ilişki olmadığı (Alukal vd 2005) gibi sonuçlar elde edilmiştir.

### 2.5.6. Varikoselin Testis Histolojisi Üzerine Etkisi

Testiküler dokuda, varikozel için tanı koydurucu (patognomonik), histolojik veya mayotik değişiklikler bulunmaktadır. Bu değişiklikler arasında, Leydig hücre hiperplazisi, tübül başına düşen Sertoli hücresi sayısında azalma, Sertoli hücrelerine ait endoplazmik retikulumda vakuol artışı, maturasyon arresti, germinal epitelde dökülme, seminifer tübül bazal membranında kalınlaşma sayılabilirken bu değişiklikler, varikozeli olmayan düşük spermatogeneze sahip olgular ile benzer özellik göstermektedir (Paduch ve Skoog 2001).

Varikoselli insanlardan alınan testis biyopsi örnekleri çok değişken özellik gösterir. Germinal aplazi (Sertoli cell-only sendromu), spermatojenik arrest, hipospermatogenez ve normal spermatogenez tabloları izlenebilir (Kim vd 1999 – Etriby vd 1967). Aggar ve Johnsen yaptıkları çalışmada sol taraf varikoselli erkeklerde, bilateral testiküler biyopsi yapıldığında, her iki testis de benzer histoloji ve benzer Johnsen skorları göstermişlerdir. Bu da hem sol taraf varikoselinin, bilateral etki gösterebileceğini hem de varikoselin tüm seminiferöz dokuyu etkileyen altta yatan diğer patolojik faktörlerle beraber ortaya çıkabileceğini işaret edebilir (Aggar ve Johnsen 1978). Varikoselli olgularda, spermatozoonda, akrozom gelişmemesi, immatürite ve amorf baş anomalisine de sık rastlanır (Reichart vd 2000). Kumagai ve arkadaşları yaptıkları çalışmada reaktif oksijen radikalleriyle ilişkili bir morfolojik özellik olarak

sitoplazmik droplet varlığından ve bunun da sperm DNA hasarı ile ilişkili olduğundan söz etmişlerdir (Kumagai vd 2002).

Varikosel düzeyi ile spermatik ven duvar kalınlığı ve damar duvarındaki düz kas miktarı arasında doğrusal bir ilişkiden söz edilmektedir. Varikoselli olguların spermatik venleri üzerine Tanji ve arkadaşlarının yaptığı 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 göstermiştir (Tanji vd 1999). Ven, venül ve kapillerlerdeki vasküler değişiklikler arasında, intimal fibrozis ve media tabakasında kollajen artışı sayılabilir (Agarwal 1991).

Yapılan elektron mikroskopi ve immunohistokimya çalışmaları ile varikoselede, peritübüler lamina propria sklerozisi, laminin ve kollajen tip IV kaybı olduğu ortaya konmuştur (Santamaria vd 1992). Cameron ve Snyder yaptıkları kan-testis bariyeri ultrastrüktürel çalışmalarıyla, "Sertoli-Sertoli bağlantı komplekslerinin" normal görüldüğü ve bazal kompartmanının korunduğu gösterilmiştir (Cameron ve Snyder 1980). Bu bulgular hayvanlardaki fonksiyonel çalışmalarla da doğrulanmıştır (Turner vd 1987).

### **2.5.7. Tanı ve Tedavi**

Varikosele özgü bir klinik bulgu olmamakla birlikte varikosel olan tarafta kasık ağrısı ve çekilme hissi olabilir. Bazen hasta skrotumda belirgin dilate venlerden dolayı doktora başvurur ve çoğunlukla infertilite nedeniyle doktora başvurdukları zaman yapılan muayene ve tetkikler esnasında tespit edilir.

Varikoselin tespitinde fiziksel muayene ve renkli doppler ultrasonografi, radyonüklid anjiyografi, skrotal termografi, venografi kullanılır (Varikosel Kılavuzu 2004). Bilinen tanı yöntemleri arasında en değerlisi venografidir. İnvaziv bir tetkiktir ve rutin olarak kullanılmaz. Tedavinin antegrad embolizasyon ile yapıldığı merkezlerde ek olarak spermatik venografi ile de tanı konabilir (Kadıoğlu vd 1998). Renkli doppler ultrasonografi kullanılan durumlar ise skrotal kesenin küçük olması, testislerin skrotumun yukarısında yerleşmiş olması, krameterik hiperrefleksi, uygunsuz ortam ve uyumsuz hasta gibi fiziksel muayenenin güçleşmesidir.

Fiziksel muayene, oda ısısında ve hasta ayakta iken spermatik kord iki parmak arasında palpe edilerek yapılır. Dilatasyon palpe edilemediyse hastaya valsalva manevrası yaptırılır (derin nefes aldırılır veya ıkınması istenir) ve venlerde dilatasyon olup olmadığına bakılır. Klinik varikosel, muayene bulgularına göre

derecelendirilmektedir. Bu derecelendirme 1970 yılında Dubin ve Amelar tarafından yapılmış ve halen yaygın olarak kullanılmaktadır (Dubin ve Amelar 1970):

- Derece (grade) I: Varikozel, sadece Valsalva manevrası ile palpe edilebilmektedir
- Derece (grade) II: Varikozel, dinlenme anında ve normal solunumda palpe edilebilmektedir.
- Derece (grade) III: Varikozel, dinlenme anında ve normal solunumda gözle görülebilmektedir.

Ölçülerek elips formülü (uzunluk x genişlik x kalınlık x 0,52 = volüm) ile de hesaplanabilir (Çayan vd 2002).

Fiziksel muayenede tespit edilmemiş, ancak radyolojik yöntemlerle tanı konulmuş varikozele subklinik varikozel denir. Subklinik varikozelin tedavi edilmesinin sperm parametreleri ve gebelik oranlarına etkisi kesin olarak ispatlanmış değildir. Bu sebeple, bugünkü veriler subklinik varikozelin tedavi edilmesine gerek olmadığı yönündedir (Varikozel Kılavuzu 2004).

Testisin fonksiyonunu ve seminal parametreleri iyileştirmek, testis fonksiyonlarında (spermatogenez ve steroidogenez) azalmayı engellemek ve böylelikle gebelik oranını arttırmak varikozel tedavisinin amacıdır. Erkeklerde varikozel mevcutsa, varikozel tedavisi için şu kriterlerin bulunması gerekir (Oktar vd 2004),

1. Çiftlerin infertil olması,
2. Varikozelin palpabl olması,
3. Kadın partnerin fertilitésinin normal olması veya tedavi edilebilecek bir patoloji olması,
4. Erkek partnerin bir veya daha fazla anormal semen parametresinde bozukluk olması (sperm sayısı, hareket veya morfolojisinde bozukluk olması).

Adölesan varikozelin tedavi endikasyonu kesin ve rölatif olmak üzere ikiye ayrılır:

1. Kesin endikasyon etkilenen testiste 2 ml. veya % 10'dan fazla volüm kaybı olmasıdır.
2. Rölatif endikasyonları ise:
  - Testis kıvamında yumuşama,
  - Sperm parametrelerinde bozulma
  - Bilateral palpabl varikozel varlığı



- Semptomatik ileri derecede varikozel varlığı
- GnRH stimölasyonuna aşırı FSH-LH yanıtı olması (Oktar vd 2004)

Semptomatik varikozelde semen değeri de normal sınırlardaysa, cerrahiden önce konservatif tedavi seçenekleri denenmelidir. Bu amaçla analjezik, anti-inflamatuar, skrotal elevasyon gibi tedaviler verilmeli, bu tedavilere cevap vermeyen olgularda cerrahi tedavi düşünölmelidir. Ayrıca ağrı nedeninin varikozele bağılı olduğu kesinleştirilmelidir. Skrotal ve inguinal ağrı yapabilecek diğer sebepler ekarte edilmelidir. Ancak bu şekilde tedaviden başarı elde edilebilir (Çayan vd 2004).

Varikozel tedavisinde perkütan embolizasyon, laparoskopik ve açık cerrahi (yüksek inguinal, inguinal, subinguinal ve skrotal) yaklaşımları mevcuttur (Varikozel Kılavuzu 2004). Varikozel tedavisinde amaç, testiköler arteri, lenf damarlarını, vas deferens ve damarlarını koruyarak tüm internal ve eksternal spermatic ven dallarını bağlamaktır. Ameliyat sonrası testiköler venöz drenaj, vas deferensin venlerinden olur.

Cerrahi yöntemler arasında en iyi olanları düşük ligasyon yöntemleri olan inguinal ve subinguinal mikrocerrahi varikozelektomidir. Her iki yöntemde de eksternal spermatic ven bağlanabilmektedir. Subinguinal varikozelektomi daha distalde olduğu için daha fazla ven bağlanabilirken testiköler arteri yaralama riski daha fazladır. Ancak inguinal varikozelektomi daha az ven ligasyonu ve daha az arter yaralanması riski ile ön plana çıkmaktadır. Mikrocerrahi yaklaşım, postoperatif hidrosel oluşumu ve testiköler atrofi veya azospermi gibi komplikasyonlarda da azalmaya neden olmaktadır. Bunun sebebi lenfatiklerin ve arterin daha kolay belirlenmesi ve korunmasıdır (Çayan ve Kadioğlu 2005).

Kullanılan yöntemler arasında ise en ideali varikozel nüksü, arter yaralanması, postoperatif hidrosel oluşumu gibi komplikasyonları en az olan ve postoperatif sperm parametrelerinde iyileşme ile gebelik oranlarında en fazla artış sağlayan yöntemdir.

Literatürde varikozelde medikal tedavi ile ilgili deneysel olarak az sayıda çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada cerrahi ve medikal tedaviyi kontrollü olarak değeriendirdikleri sıçan deneysel varikozel modelinde HCG, kallikrein, indometasin ve hidralazin medikal tedavi grupları oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda cerrahi tedavi tüm medikal tedavi gruplarına göre üstün bulunmuştur. Ayrıca sperm sayısı, motilitesi, testis volümü ve fertilite oranları açısından buna en yakın sonuçların HCG+kallikrein tedavisi alan grupta olduğunu bildirmişler ve cerrahi sonrası beklenen yanıtın oluşmadığı hastalarda bu şekilde planlanacak eşzamanlı Sertoli ve Leydig hücrelerinin uyarılmasının fertilite üzerine olumlu etkileri olacağını da ileri sürmüşlerdir (Sofitikis vd 1992).

Varikosel ve oksidatif strese yönelik deneysel varikosel modelleri ile yapılan çalışmalarda deneysel varikosel modelinde her iki testiste apoptosis ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı gösterilmiştir ve vitamin E'nin koruyucu rolü üzerinde durulmuştur (Çam 1998). Başka bir çalışmada ise testiste proapoptotik bax protein artışı, antioksidan enzim aktivitesinde azalmayı ve malondialdehit düzeylerindeki artışı ortaya koyarken bir antioksidan olan melatoninin bu mekanizmalar üzerine olan düzeltici etkisi gösterilmiştir (Onur vd 2004).

## 2.6. Hipotezler

Çalışmamızın hipotezleri şunlardır:

- a) Varikosel vakalarındaki histopatolojik bulgular göz önünde bulundurulduğunda, varikoselin, seminifer epitel ile birlikte spermatojenik kök hücrelere de hasar vereceğidir.
- b) Spermatojenik kök hücrelerdeki hasar, SKH belirteçlerinden THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA ve negatif belirteç olarak Stro-1 ifadesinde değişikliğe yol açacaktır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmamızda, Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden alınan 40 adet erkek erişkin Wistar tipi sıçan kullanılmıştır. Tüm denekler için önerilen optimum çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlanmış ve sıçanlar, ışıklandırması (12 saat aydınlık/karanlık siklusunda, 07:00-19:00 saatleri arası aydınlık), havalandırılması (%60-70 nem) ve oda ısısı (20-24 °C) kontrol edilen bir odaya yerleştirilmiştir. Denekler, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (purina) beslenmiştir.

#### 3.2. Deneysel Uygulama

##### 3.2.1. Deney Gruplarının Oluşturulması:

40 adet erkek erişkin Wistar tipi sıçan rastgele olarak, kontrol, kısa ve uzun süreli sham, sol varikozel ve bilateral varikozel olmak üzere 7 gruba ayrılmıştır.

**Tablo 3.1** Deney Grupları

Gruplar		Kontrol	Sham	Sol Varikozel	Bilateral varikozel
Kısa Süreli Varikozel	Histoloji(HE Boyama)	6	5	6	6
	Kök hücre İnceleme(İmmün Boyama)				
Uzun süreli Varikozel	Histoloji(HE Boyama)		5	6	6
	Kök hücre İnceleme(İmmün Boyama)				
Toplam Sıçan Adedi		40 adet sıçan			

Varikozel oluşturma, Sham ve Kontrol Grupları İşlemleri:

Unilateral, bilateral varikozel oluşturma ve sham grubu işlemleri Hurt, G. S. ve ark. (1986)' nin metodolojisine göre gerçekleştirilmiştir. Kullandığımız methoda varikozel oluşturma renal venlerin 0.85 mm çapında proplar kullanılarak, 3/0 sütür yardımıyla daraltılması esasına dayanmaktadır. İşlemler genel anestezi altında yapılmaktadır. Sham grubunda ise renal ven etrafındaki yağ ve bağ dokusu diseke edilerek ven görünür hale geldikten sonra ven etrafına, aynen varikozelde uygulandığı

gibi, 3/0 ipek sütür sarılır fakat herhangi daraltma yapılmadan serbest halde bırakılıp, batın kapatıldı. Kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmadı.

### 3.2.2. Dokuların Çıkarılması:

Dokuların alınması için varikoselleştirme sonrası kısa süreli etkinin gözleneceği grupta 30 gün, uzun süreli etki grubunda ise 100 gün beklendi. Sakrifikasyon işlemi anestezi altında servikal dislokasyon ile yapıldı. Skrotal bir insizyon ile her iki testis dışarı çıkartıldı. Tunika vajinalisler uç kısımlarından insizyonla açılarak kaput epididimis, vas deferrens ve spermatik kan damarları skrotum dışına alınarak orşiektomi yapıldı (Onur, R. 2001).

### 3.2.3. Doku Takip İşlemleri ve Boyama:

Testisler çevre dokulardan diseksiyonla ayrılıp vertikal olarak bölünerek doku tespit protokolleri uygulandı. Alınan dokular tespit için, 12 saatlik bouin solüsyonu ile fiksasyonun ardından, %10'luk formaldehit solüsyonunda 72 saat bekletildikten sonra rutin ışık mikroskopi takibine alındı. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica RM-2125 rotary mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Doku takibi Oguz, I. (2007)'nin ışık mikroskobu doku takip ve inceleme protokolüne göre yapılmıştır.

Vertikal olarak ikiye ayrılan dokulardan birine histopatolojik durumu incelemek üzere Hematoksilen-Eozin boyama uygulanırken diğer yarısı spermatojenik kök hücre markerları kullanılarak immun boyama ile incelendi. Immun boyama spermatojenik kök hücre belirteçleri olan, THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA, Stro-1 primerleri ve uygun sekonder antikörler kullanılarak yapıldı.

### 3.2.4. Boyanan Dokuların İncelenmesi:

Boyanan dokular ışık mikroskobu altında incelendi ve fotoğrafları alındı.

### 3.2.5. Reaktif Hazırlanması

Fiksatif Solüsyonu Hazırlama: Bouins Solution

Hazırlanışı,

1500ml Saturated aqueous solution of Picric Acid

500ml Formaldehyde (%37)

100ml Glacial acetic acid

\*\*\*NOT: Çalışmamızda %37 formaldehit yerine Neutral Buffered %10 Formalin (NBF) kullanılmıştır.

NBF Hazırlanışı,

900ml	Top water (distile)
100ml	Formalin (%37 formaldehit solusyonu)
4gr	Sodyum fosfat, monobazik, monohidrat
6,5gr	Sodyum fosfat, dibazik, anhydrous

\*\*\* Bouins solusyonu fiksasyon süresi max.18 saattir. İdeal zaman olarak testis dokusunda 12-14 saat aralığı tespit edilmiştir.

Bouins Solusyonunda Fiksasyon İşlemi

Orşiektomi sonrası disekte edilen dokular dikkatlice önce petriye alınarak ince iğneler ile (insulin iğnesi) delikler açılıp fiksatifin içine atılmıştır ve 2 saat beklenilmiştir. Enjektör yardımıyla testis içine fiksatif yavaşça verilerek doku içine nüfus etmesi kolaylaştırılmıştır. 3 saat süreyle oda koşullarında kültür kaplarında fiksatifte kalan dokular çıkarılıp bisturi yardımıyla dikkatlice enine 3-4 halka olacak şekilde dilimlenip kasetlere alınarak etiketleri ile birlikte daha büyük bir fiksasyon kabına alınmıştır. Fiksatif miktarı yaklaşık olarak içerdeki dokuların kapladığı hacmin yaklaşık 10 katı fazla olmak durumundadır. Bu yüzden fiksasyon için tekli doku kaplarından kasetlere alınan dokular daha büyük hacimdeki bir doku takip kabına alınarak daha fazla fiksatifle muamele edilmiştir. Bouin solüsyonundaki total fiksasyon süresi için testis büyüklüğüne göre 12-14 saatin optimal olduğu görülmüştür.

### 3.3. Uygulanan Teknikler

#### 3.3.1. Doku takip yöntemi

- 12 saat bouin solüsyonu ve ardından 72 saat formaldehitde bekletilen dokular çıkarıldı ve akan su altında 30 dakika yıkandı.
- %70' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- %80' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- %90' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- %96' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- %96' lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- Ksilen I'de 1 saat bekletildi.
- Ksilen II'de 1 saat bekletildi.

- i) Parafin I'de 1 saat bekletildi.
- j) Parafin II'de 1 gece bekletildi.
- k) Dokulara parafine gömme ve etiketlenme işlemi yapıldı.

### 3.3.2. İmmunohistokimyasal boyama

Doku takip yöntemi tamamlanan testis bloklarından, mikrotom cihazıyla 3 µ' luk kesitler alınıp, kesitler benmariye bırakıldı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir: (Reaktifler için İnvitrogen, MD 21704, USA, Lot: 948867A Histostain-Plus kit kullanılmıştır.)

4. Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
5. Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 gece bekletildi.
6. Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
7. Ksilenden çıkarılıp havada kurutularak PAP pen ile dokular işaretlendi.
8. Kesitler sırasıyla %100, %96, %80, %70, %50'lik etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletildi.
9. Alkolden çıkan preparatlar distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
10. Antijen retrieval işlemi için önceden hazırlanmış ve 37°C de bekletilen Tripsin solüsyonu(200cc PBS + 0,2gr Tripsin) ile 37°C'de 30 dakika bekletildi.
11. 10 dakika PBS'de bırakıldı.
12. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, % 30' luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Metanol (1: 9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
13. Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
14. Kesitler üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece over night yapıldı. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları dilüsyonlar şu şekildeydi: Stro-1 (1: 100, Santa Cruz, Lot: E05040-1630), DAZL (1: 100, Santa Cruz, Lot: K1513), VASA (1: 200, Novus Biologicals, Lot: 31214), c-Kit (1:100, Santa Cruz, Lot: D1712), Thy-1 (1:100, Santa Cruz, Lot: J1713), PLZF (1:100, Santa Cruz, Lot: F1512), Sox 3 (1:100, Santa Cruz Lot: L0313). Bütün primer antikorlar PBS ile dilüe edildi.
15. Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edildi. Kullanılan sekonder

antikorlar ve dilusyonları şu şekildeydi: Donkey anti-goat IgG FITC (1:300, Santa Cruz, Lot: H2313), pAb anti-chicken anti rabbit IgG-FITC (1:300, Novus Biologicals, Lot: 10), goat anti-mouse IgG<sub>1</sub>-FITC, (1:300, Santa Cruz, Lot: G2413), goat pAb to Rb IgG(HRP) (1:300, Abcam, Lot: GR146022-3), goat anti-mouse IgM-FITC (1:300, Santa Cruz, Lot: D1013), goat anti-rabbit IgG-FITC (1:300, Santa Cruz, Lot: G1713)

16. Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmiş- sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 10 dakika kadar muamele edildi.
17. Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3- 10 dakika kadar muamele edildi.
18. Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin (Merk Harris' hematoksilin) ile zıt boyama yapıldı.
19. Kesitler akansuda yıkandı ve sırasıyla %50, %70, %80, %96, %100' lük etil alkol serilerinde 2' şer dakika bekletildi.
20. Alkol serilerinden çıkan dokular ksilen I ve ksilen II'de 2 şer dakika bekletildi.
21. Ksilenden alınan dokuların üzeri kuruması beklenilmeden entellan ile kapatıldı.
22. Boyanmanın değerlendirilmesinde aşağıdaki skala kullanıldı.  
(+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok.

### 3.3.3 Testiküler Histolojinin Değerlendirilmesi İçin Morfolojik Parametrelerin Hesaplanması

#### 3.3.3.1 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 kullanıldı (Yoshida A., 1997).

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 spermatisitlerin olmaması, fakat çok sayıda spermatogonyum gözlenmesi.
5. Spermatozoa, spermatidlerin olmaması, fakat birkaç adet primer spermatisit gözlenmesi.
6. Spermatozoa ve geç spermatidlerin olmaması, fakat birçok primer spermatisit gözlenmesi.
7. Spermatozoa ve geç spermatidlerin olmaması, fakat birkaç sekonder spermatisit gözlenmesi.
8. Spermatozoa ve geç spermatidlerin olmaması, fakat birçok sekonder spermatisit 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

#### 3.3.3.2 Seminifer Tübül Alanlarının ve Seminifer Epitel Kalınlığının Hesaplanması

Her gruptan 30 yuvarlak veya yuvarlağa yakın seminifer tübül rastgele seçilip tübülün total alanı ve epitel kalınlığı Olympus marka BX51 model ışık mikroskobu ve Olympus DP72 model kamera ataçmanı ile çekilip DP2-BSW yazılımı kullanılarak morfometrik ölçüm teknikleri ile hesaplanmıştır.



### 3.3.4 İstatistiksel Analiz

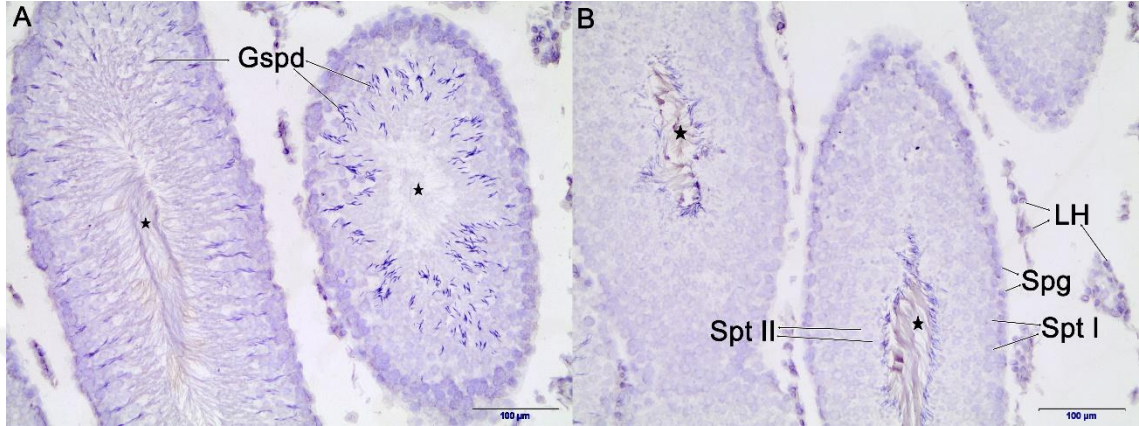
Gruplar arasında morfometrik farklar, Johnsen skorlamaları, seminifer túbül alanları ve seminifer epitel kalınlıkları açısından yapılan karşılaştırmalarda, ortalamaların normal dağılım göstermesi (normal dağılım testi = Shapiro Wilk) nedeniyle One-way ANOVA metodu uygulandı. One-way ANOVA testi sonucu 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.



## 4. BULGULAR

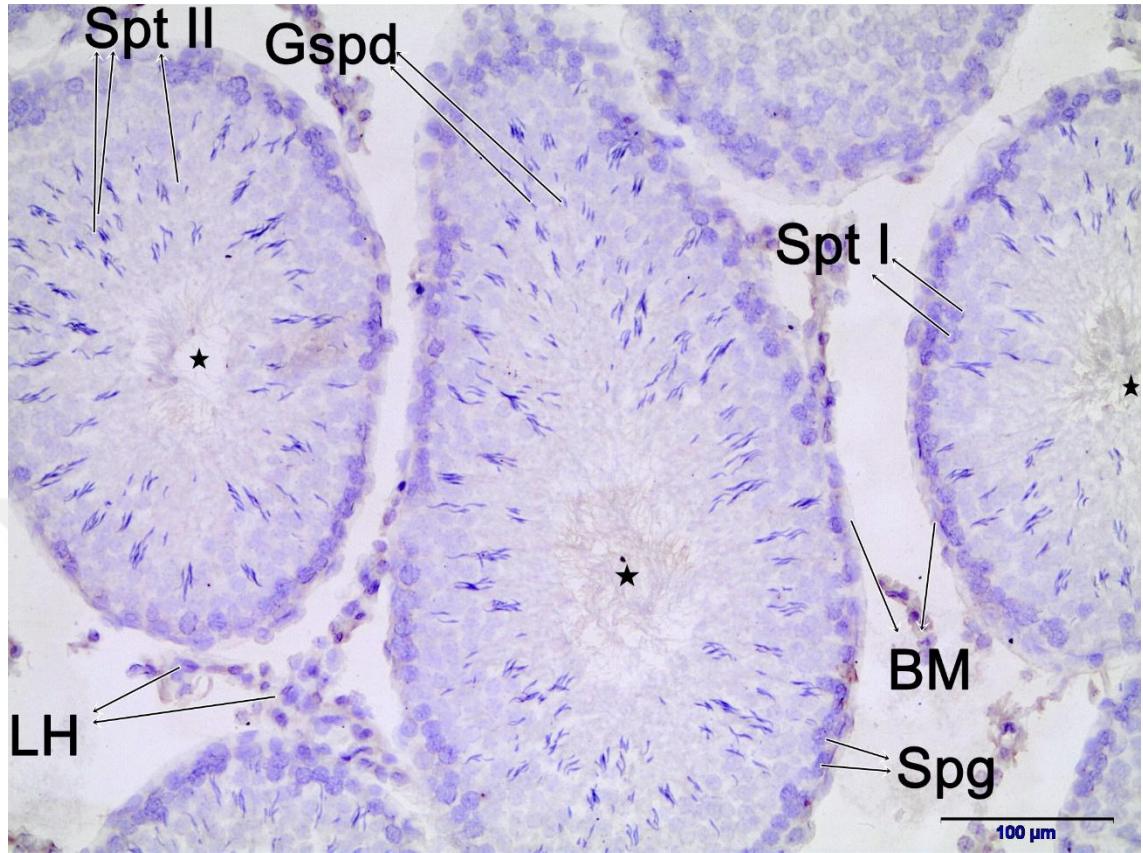
### 4.1. Kontrol Grubu Bulguları

PLZF: Spermatogonyumlar çok zayıf pozitif diğer tüm seminifer tübül hücrelerinde negatif boyanma gözlemlendi.



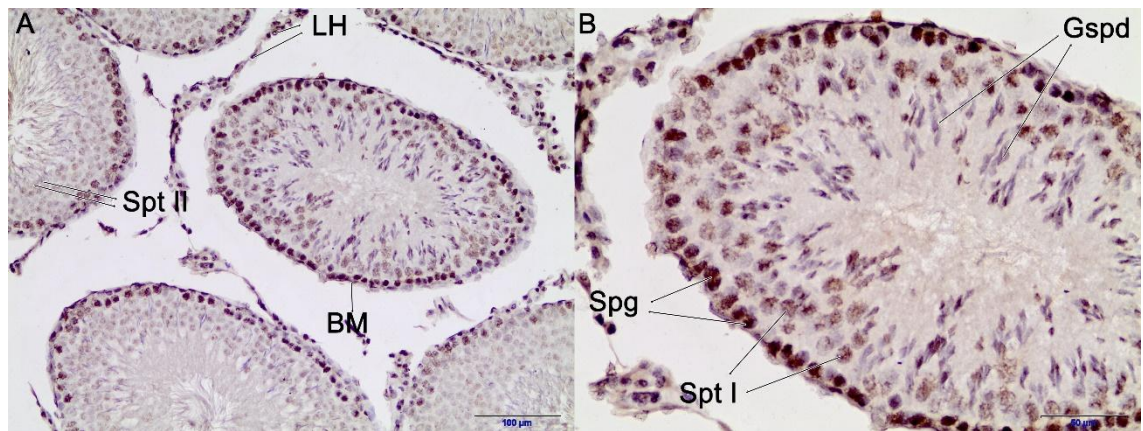
**Şekil 7** Kontrol PLZF IHCp Sonuçları: Kontrol grubu sıçanlarından alınan 2 farklı sol testis enine kesiti (A, B) (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatoisitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücreleri (LH))

DAZL: Spermatogonyumlarda ve primer spermatisitlerde zayıf sitoplazmik boyanma gösterdi.



**Şekil 8** Kontrol DAZL IHCp Sonuçları: Kontrol grubu sol testis (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatisitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

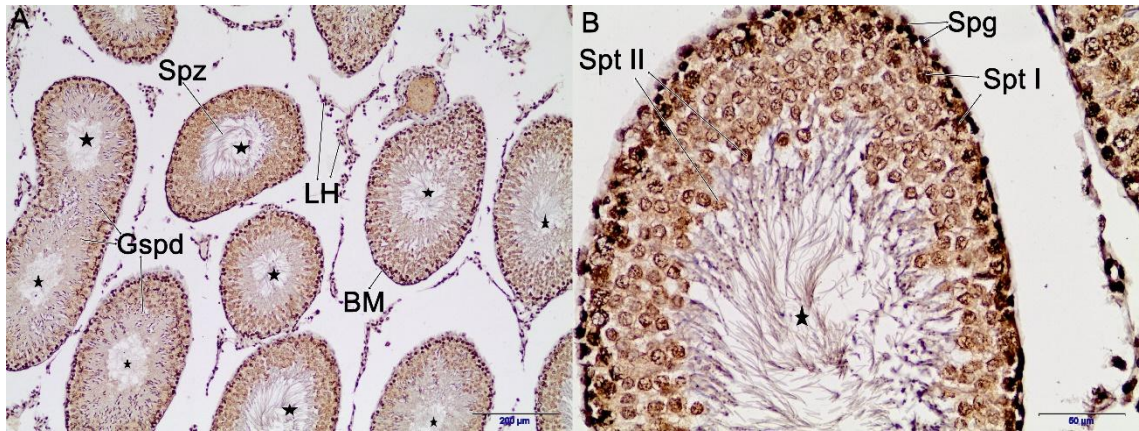
Thy-1: Spermatogonyum, primer ve sekonder spermatisitler ve sertoli hücreleri kuvvetli pozitif, erken evre spermatidler orta derece pozitif ekspresyon gösterdi. Gec evre spermatidler ve Leyding hücrelerinde negatif boyanma gözlemlendi.



**Şekil 9** Kontrol thy-1 IHCp sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatisitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

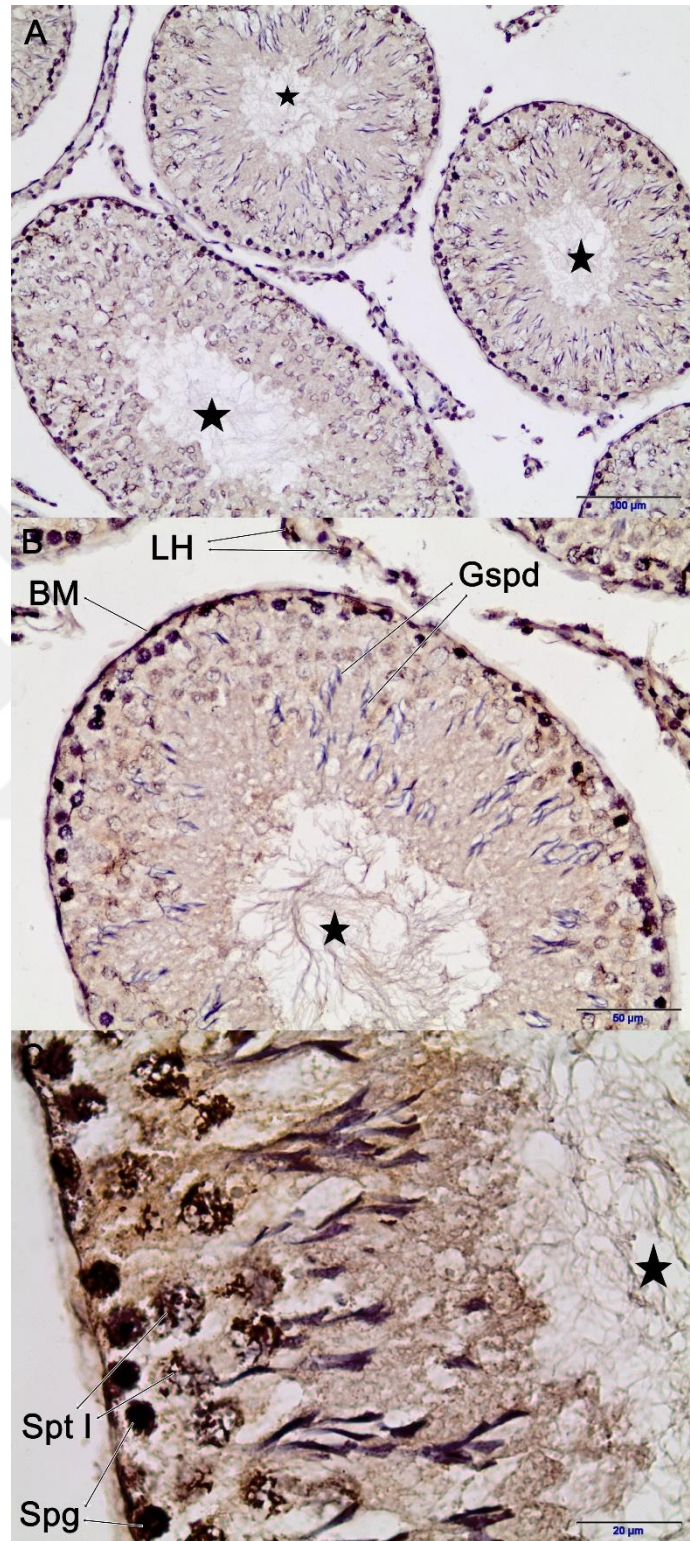


VASA: Spermatogonyumlarda çok kuvvetli, primer ve sekonder spermatisitlerde de kuvvetli boyanma gösterdi. Geç spermatidlerde ise bazı tübüllerde boyanma olmazken bazılarında orta derecede boyanma gözlemlendi.



**Şekil 10** Kontrol VASA IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatisitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

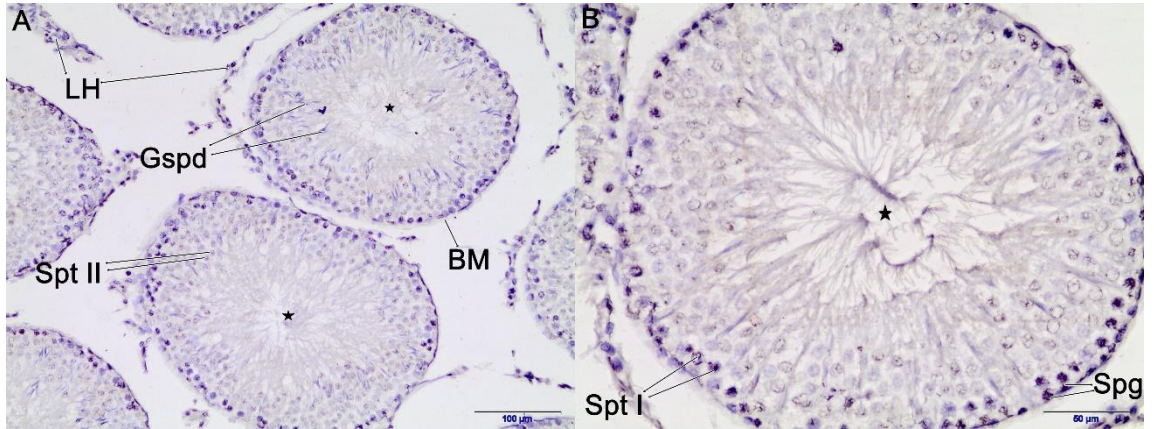
Sox-3: Spermatogonyumlarda kuvvetli, primer ve sekonder spermatozoidler ve Sertoli hücrelerinde zayıftan orta derecede değişen derecelerde boyanma izlendi. Erken evre spermatidler pozitif boyanırken, geç evre spermatidlerinde boyanma gözlenmedi.



**Şekil 11** Kontrol Sox 3 IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B, C: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlarda (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leydig Hücresi (LH), bazal membran (BM))

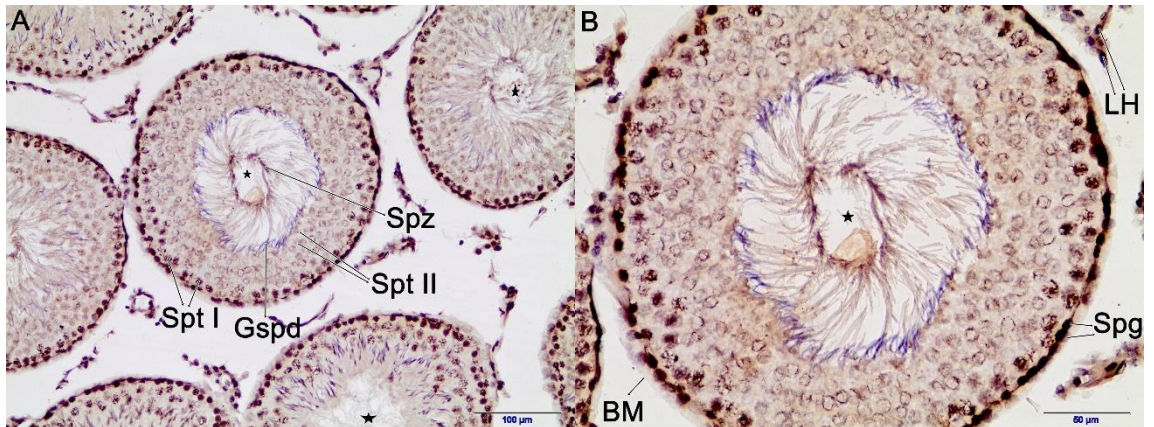


Stro-1: Seminifer tübül hücreleri ve Leyding hücrelerinin tamamında boyanma gözlenmedi.



**Şekil 12** Kontrol Stro-1 IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))

C-Kit: Spermatozoidler ve spermatozoidler kuvvetli pozitif, primer ve sekonder spermatozoidler ve erken evre spermatidleri zayıf pozitif boyanma gösterirken geç evre spermatidlerde boyanma olmamıştır.



**Şekil 13** Kontrol C-Kit IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoidler (Spz), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))

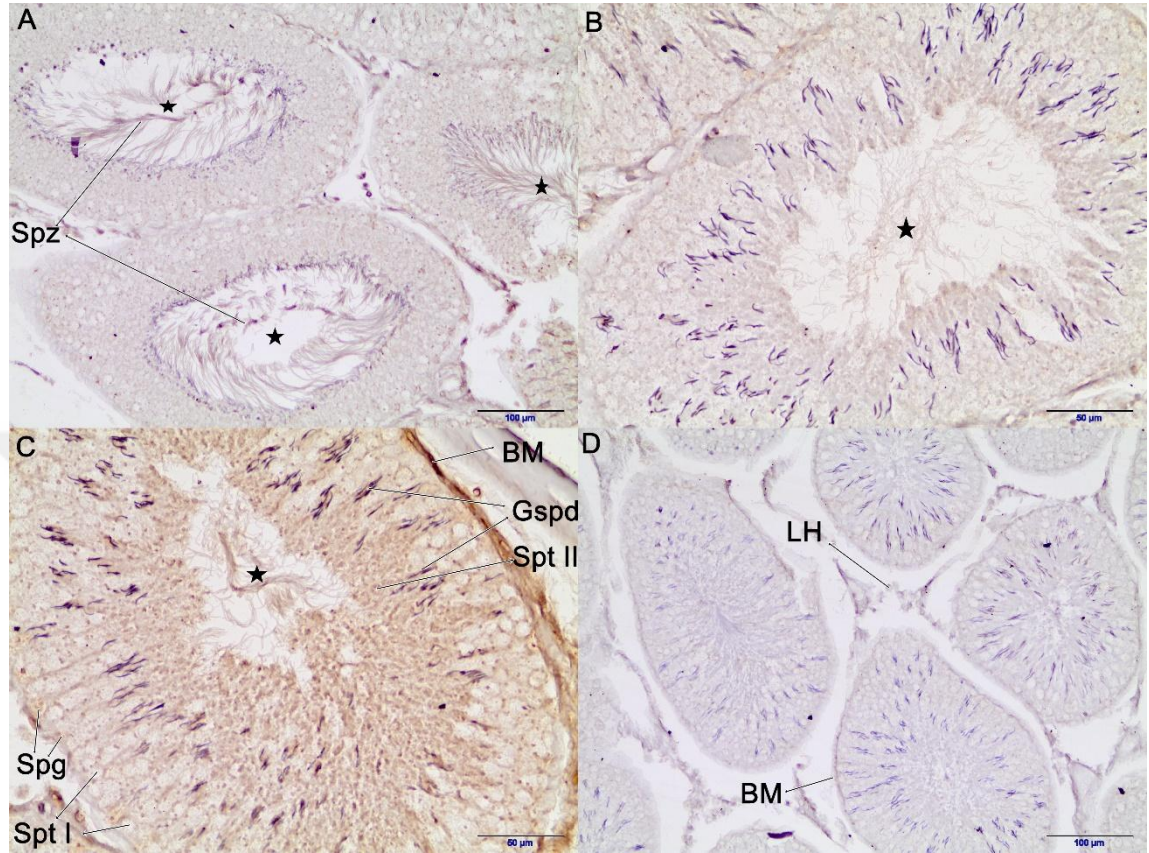
**Tablo 4.1** Kontrol grubu testis seminifer tübüllerinde THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA, Stro-1 ifadesi.

Kısa ve Uzun Süreli Etki Grubu (30-100 gün)							
	THY1 (CD90)	C kit	Sox3	PLZF	DAZL	VASA	Stro-1
<b>Spg</b>	+++	+++	+++	+/-	+	+++	-
<b>Spt I</b>	++	+++	++	-	+	+++	-
<b>Spt II</b>	++	+	+	-	-	+++	-
<b>Spd</b>	+	+	-	-	-	++	-
<b>Gspd</b>	-	-	-	-	-	++	-
<b>SH</b>	+	-	+	-	-	++	-
<b>LH</b>	++	-	++	-	-	++	-
<b>BM</b>	+++	+	++	-	-	+++	-

spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatositler (Spt I ve Spt II), erken spermatidler (Spd), geç spermatidlerin (Gspd), Sertoli Hücresi (SH), Leyding Hücresi (LH), Bazal membran (BM), (+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok

#### 4.2. Sham Grubu Bulguları

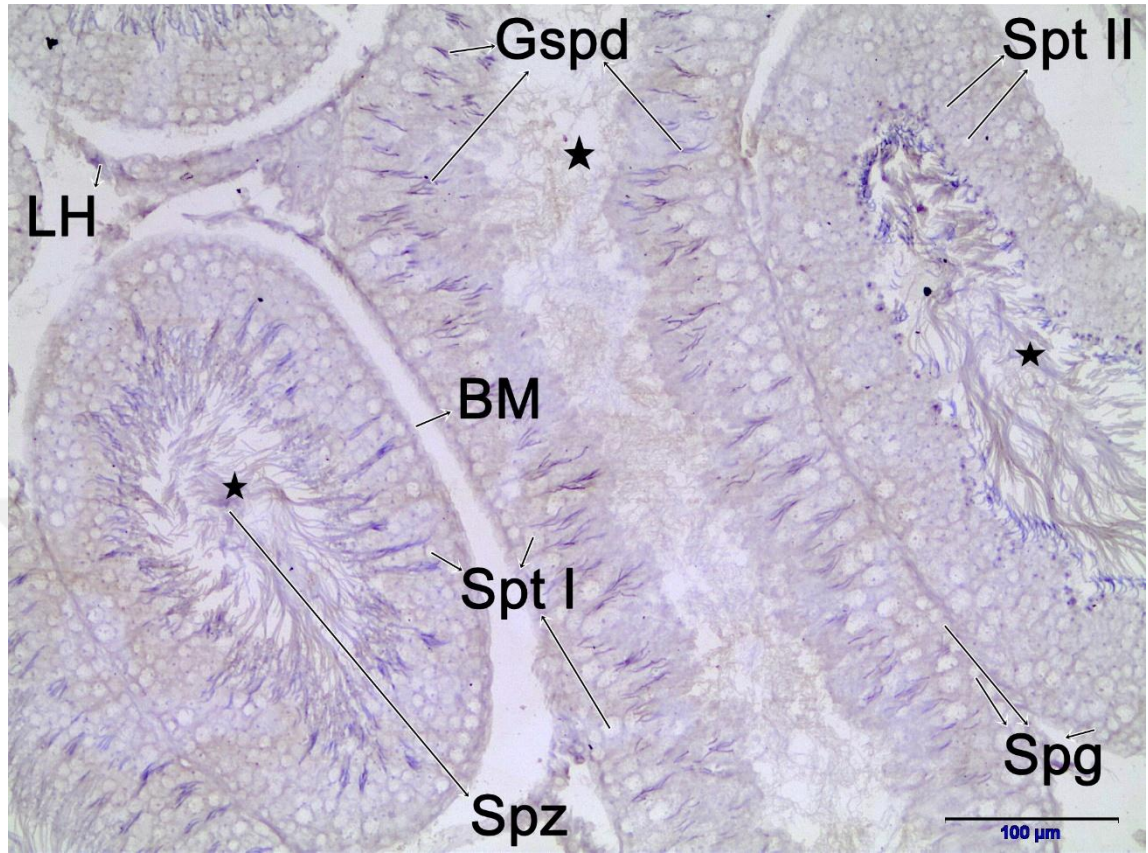
PLZF: Zayıf pozitif ve negatif boyanma gözlemlendi. Sol varikosel sham grubunda ise spermelerde pozitif boyanma gözlemlendi.



**Şekil 14** Sham PLZF IHCp Sonuçları: A,D: sol testis enine kesiti. B,C: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatositler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

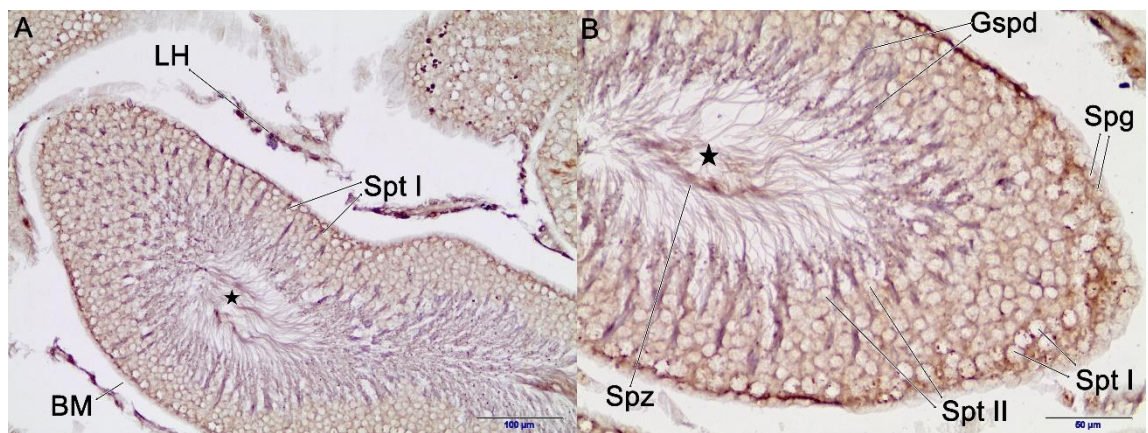


DAZL: Spermatogonyumlarda ve primer spermatisitlerde çok zayıf sitoplazmik boyanma gözlemlendi.



**Şekil 15** Sham DAZL IHCp Sonuçları: Sol testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatisitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

Thy-1: Tübül duvarını oluşturan hücrelerde zayıf sitoplazmik boyanma izlendi. Spermatidlerde boyanma gözlenmedi.

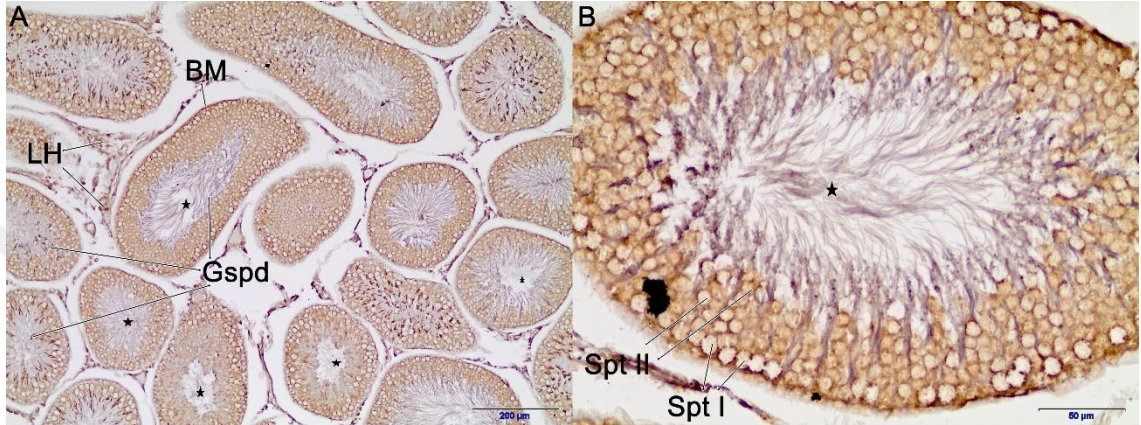


**Şekil 16** Sham Thy-1 IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatisitler (Spt I ve



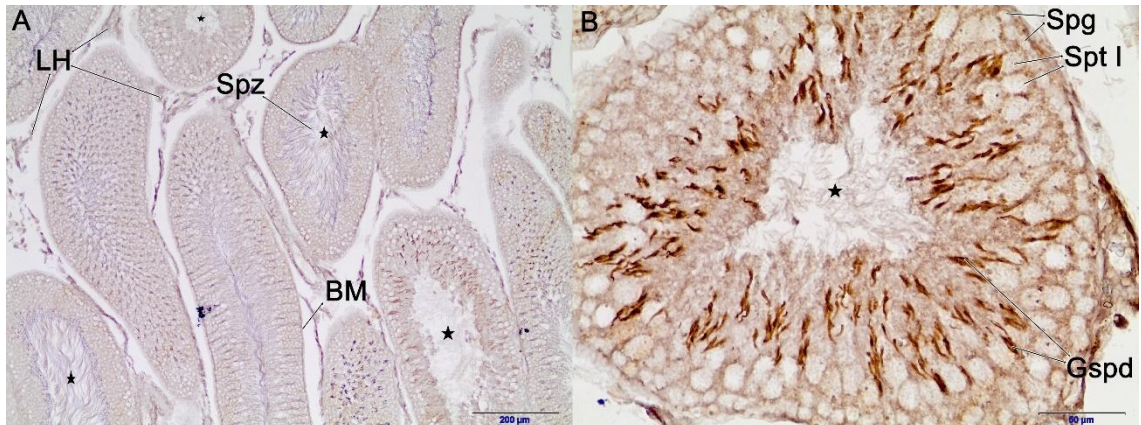
Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

VASA: Spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatisitler, Sertoli hücrelerinde orta derece kuvvetli boyanma gözlemlendi. Primer spermatisitlerde boyanma hücre membranında olurken, spermatogonyumlar, sekonder spermatisitlerde ve erken evre spermatidlerde sitoplazmik boyanma gözlemlendi. Geç tip spermatidlerde bazı tübüllerde boyanma olmazken bazılarında orta derecede boyanma gözlemlendi.



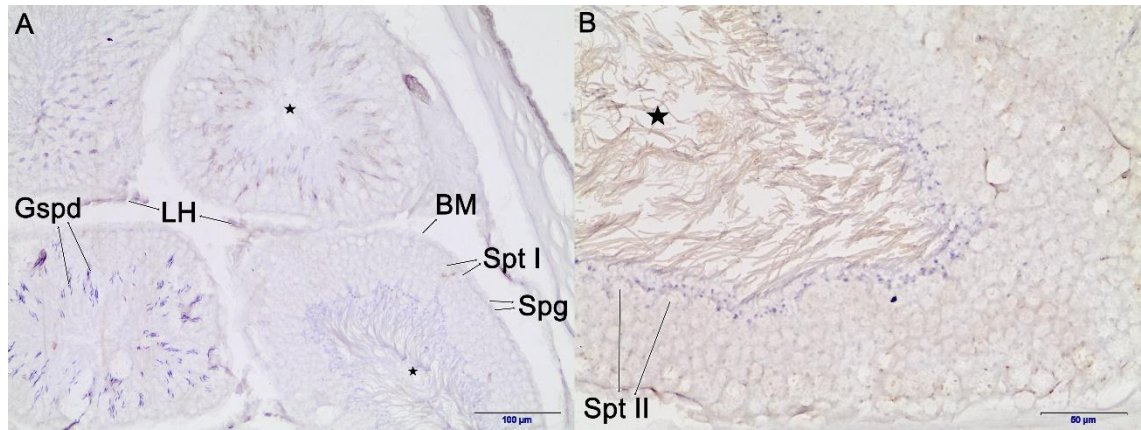
**Şekil 17** Sham VASA IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatisitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

Sox-3: Kontrolde farklı olarak spermatogonyumlarda, primer ve sekonder spermatisitlerde, Sertoli ve erken evre spermatidlerinde zayıf boyanma gözlemlendi ancak bazı tübüllerde geç evre spermatidlerde boyanma ilgi çekici olarak bazen pozitif bazen negatif gözlemlenmiştir.



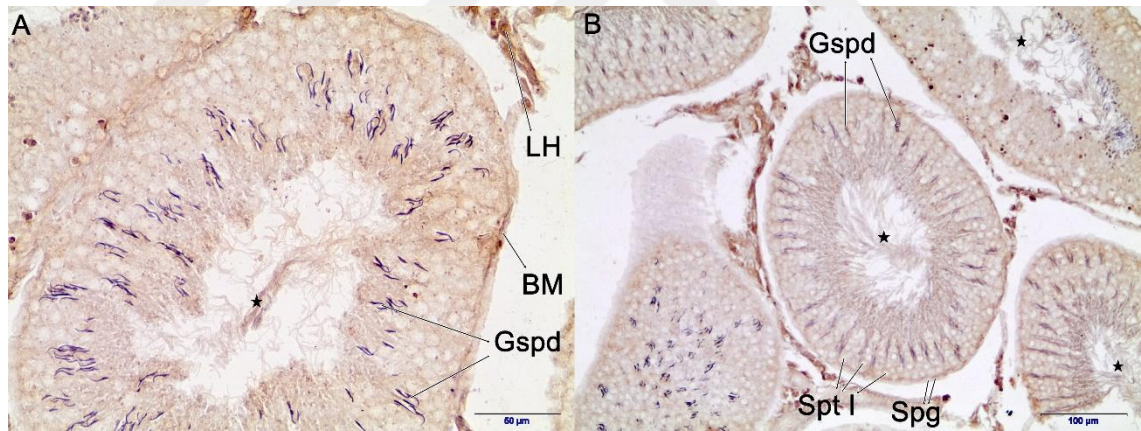
**Şekil 18** Sham Sox-3 IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatisitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

Stro-1: Bazı tübüllerde geç evre spermatidlerinde pozitif boyanma izlendi.



**Şekil 19** Sham Stro-1 IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))

C-Kit: Spermatozoidler ve spermatozoidler güçlü pozitif, primer ve sekonder spermatozoidler ve erken evre spermatidleri zayıf pozitif boyanma gösterirken geç evre spermatidlerde boyanma olmamıştır.



**Şekil 20** Sham C-Kit IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti seminifer tübül. B: Sol testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))

**Tablo 4.2** Sham grubu testis seminifer tübüllerinde THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA, Stro-1 ifadesi.

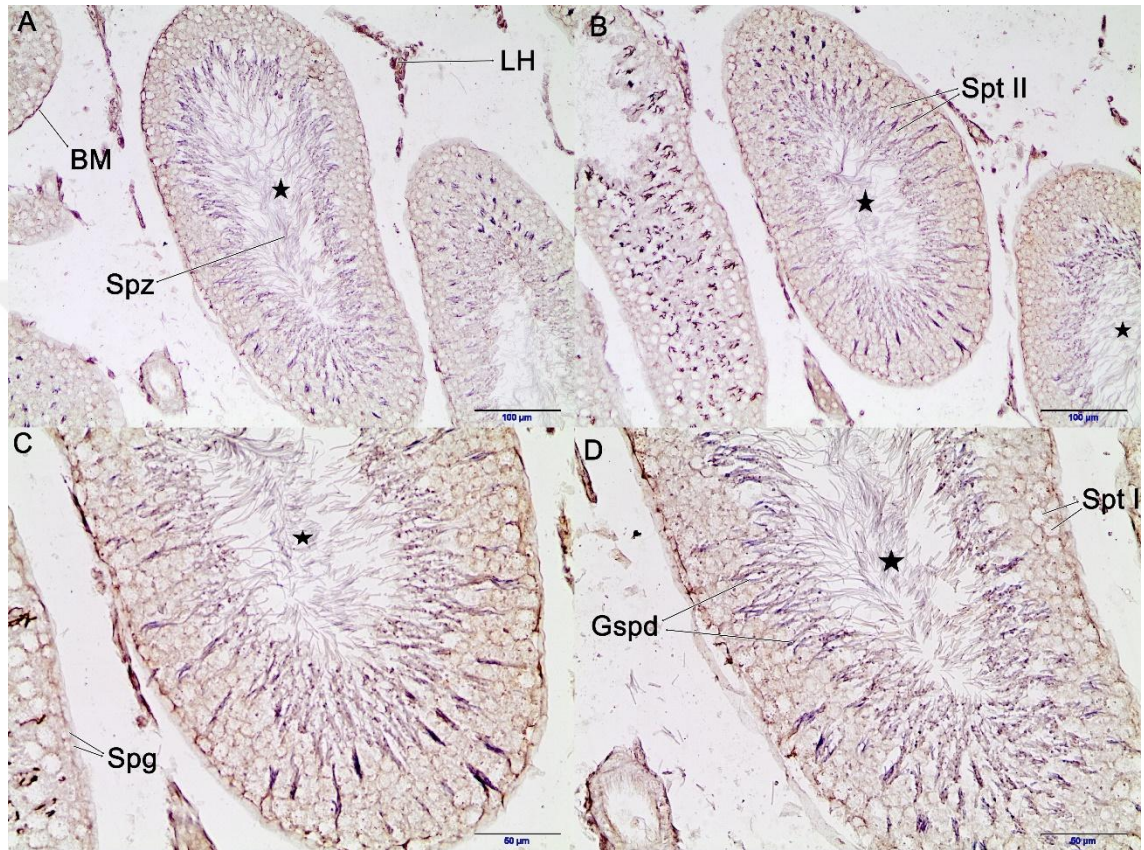
Kısa ve Uzun Süreli Etki Grubu (30-100 gün)							
	THY1 (CD90)	C kit	Sox3	PLZF	DAZL	VASA	Stro-1
<b>Spg</b>	+++	+++	+++	-	+	+++	-
<b>Spt I</b>	++	+++	++	-	+/-	+++	-
<b>Spt II</b>	++	+	+	-	-	+++	-
<b>Spd</b>	+	+	+	-	-	++	-
<b>Gspd</b>	-	-	-	-	-	++	-
<b>SH</b>	-	+	-	-	-	++	-
<b>LH</b>	+	-	+	-	-	+	-
<b>BM</b>	+	+++	++	-	-	+++	-

spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatositler (Spt I ve Spt II), erken spermatidler (Spd), geç spermatidlerin (Gspd), Sertoli Hücresi (SH), Leyding Hücresi (LH), Bazal membran (BM), (+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok

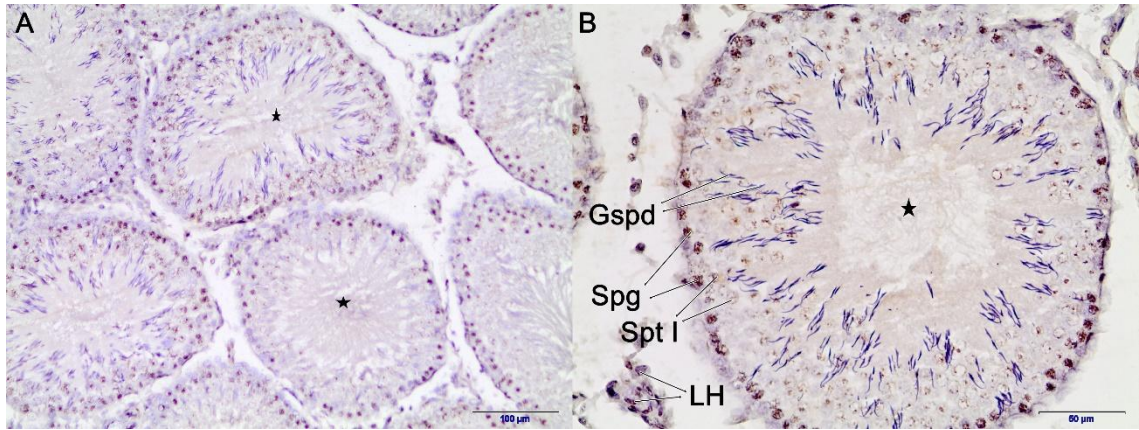


### 4.3. Sol Varikosel Grubu Bulguları

PLZF: SVKS Spermatogonyum, primer ve sekonder spermatositler, Sertoli hücreleri ve Leyding hücrelerinde zayıf pozitif, spermatidlerde ise negatif boyanma gözlemlendi. Boyanma hücre membranında gözlemlendi. SVUS Spermatogonyumlar kuvvetli boyanma gösterdi. Primer ve sekonder spermatositler, Sertoli hücreleri zayıf boyanma gösterirken, geç spermatidler ve Leyding hücrelerinde boyanma negatifti.

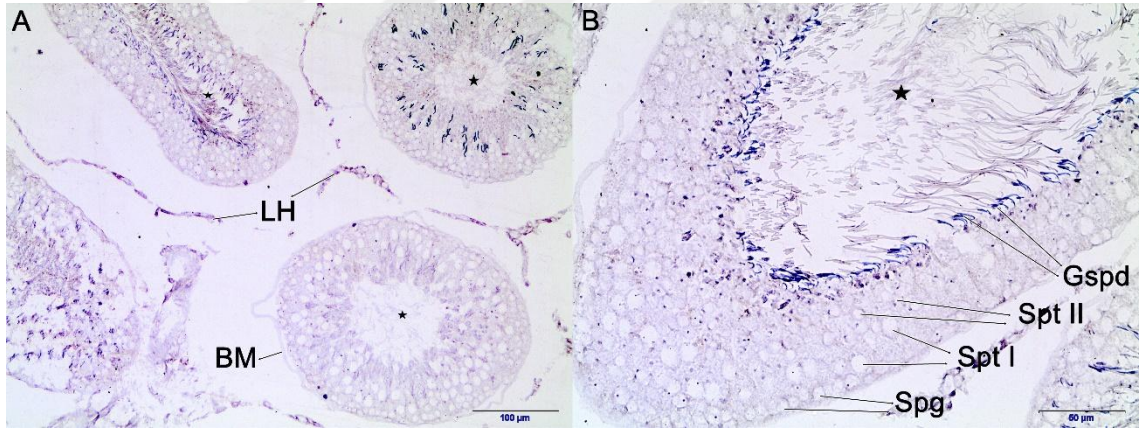


**Şekil 21** SVKS PLZF IHCp Sonuçları: A, B: sol testis enine kesiti. C, D: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatositler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))



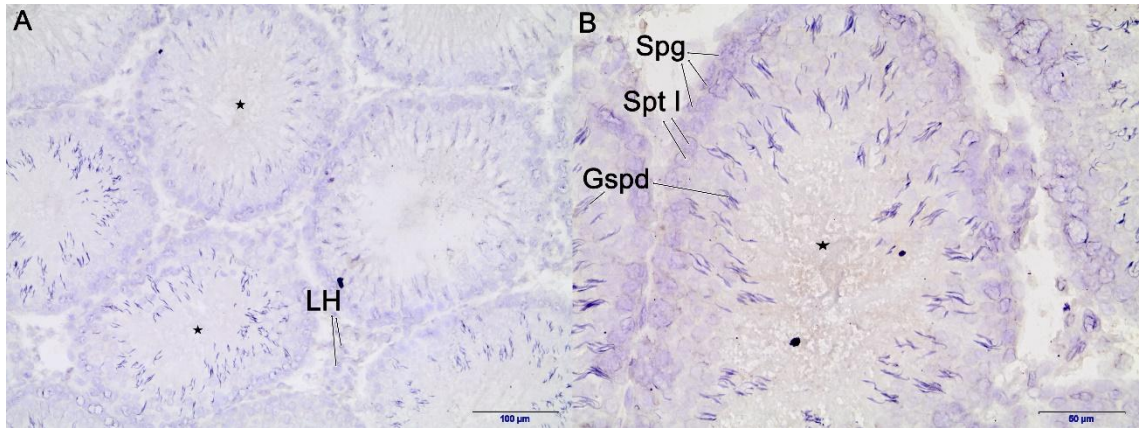
**Şekil 22** SVUS PLZF IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))

DAZL: SVKS ve SVUS gruplarında benzer şekilde spermatogonyumlarda boyanma gözlenmedi.



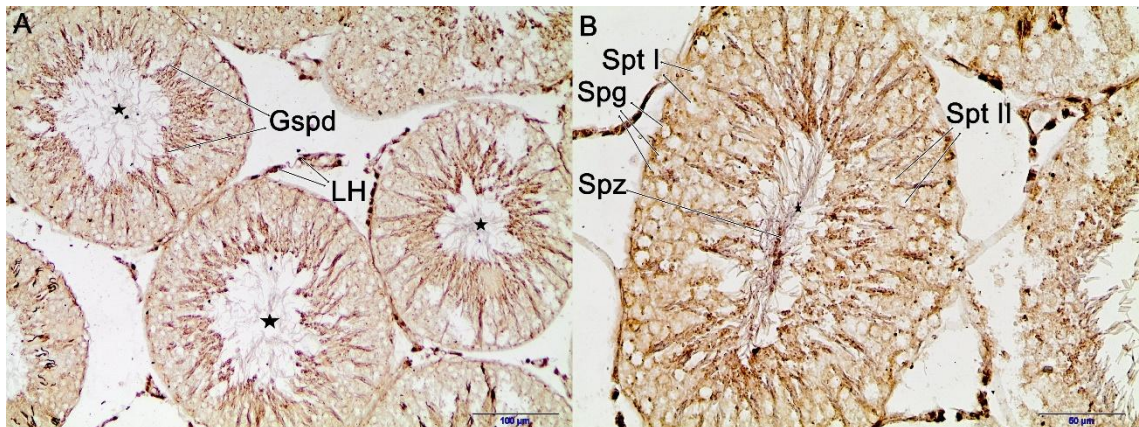
**Şekil 23** SVKS DAZL IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))





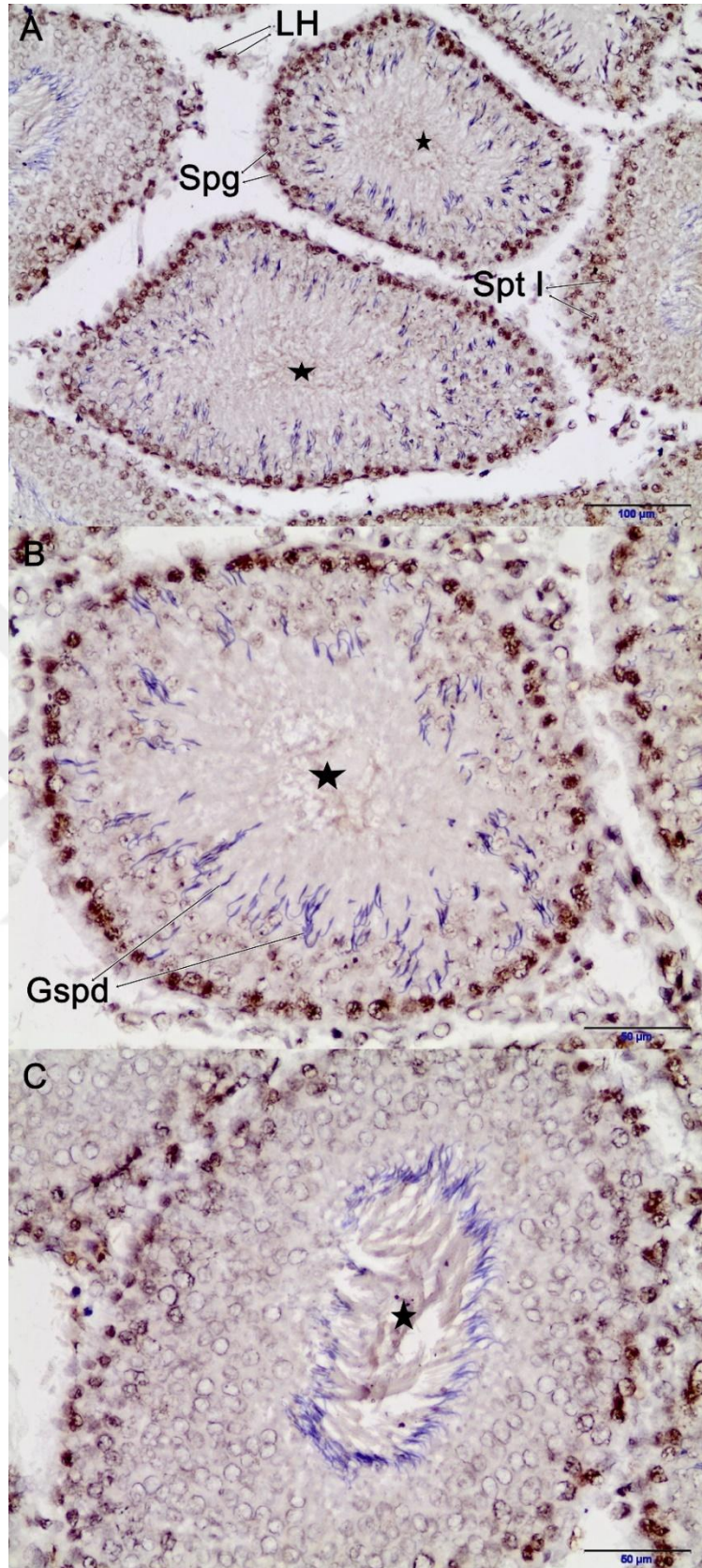
**Şekil 24 SVUS DAZL IHCp Sonuçları:** A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatisitler (Spt I), geç spermatisitler (Gspd), Leyding Hücreleri (LH))

Thy-1: SVKS spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatisitlerde boyanma zayıftı. Çekirdek boyanması izlenmedi. Leyding hücreleri ve geç evre spermatisitlerde boyanma izlendi. Şaşırtıcı şekilde SVUS grubunda kontrol grubuna benzer ekspresyon paterni görüldü. Spermatogonyum, primer ve sekonder spermatisitler ve sertoli hücreleri kuvvetli pozitif, erken evre spermatisitler orta derece pozitif ekspresyon gösterdi. Olgun spermatisitler ve Leyding hücrelerinde negatif boyanma gözlemlendi.



**Şekil 25 SVKS Thy-1 IHCp Sonuçları:** A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatisitler (Spt I ve Spt II), geç spermatisitler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücreleri (LH))

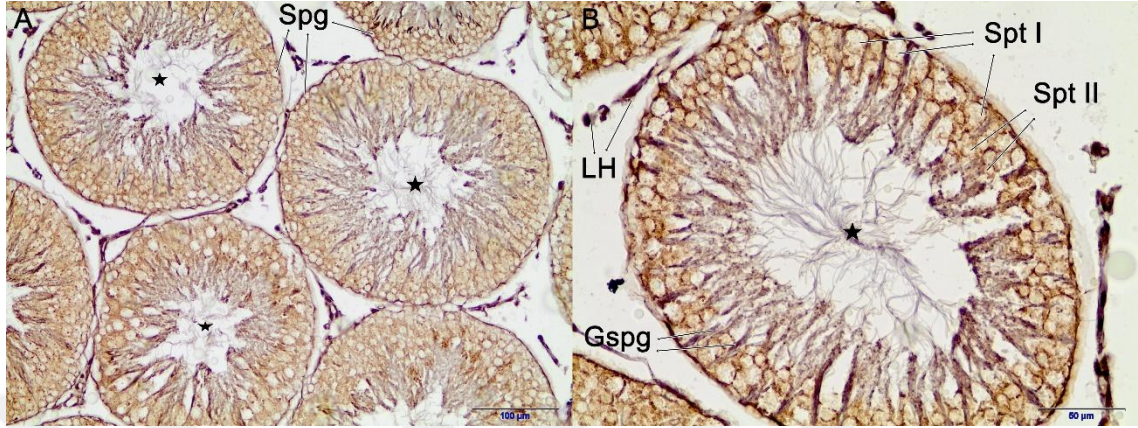




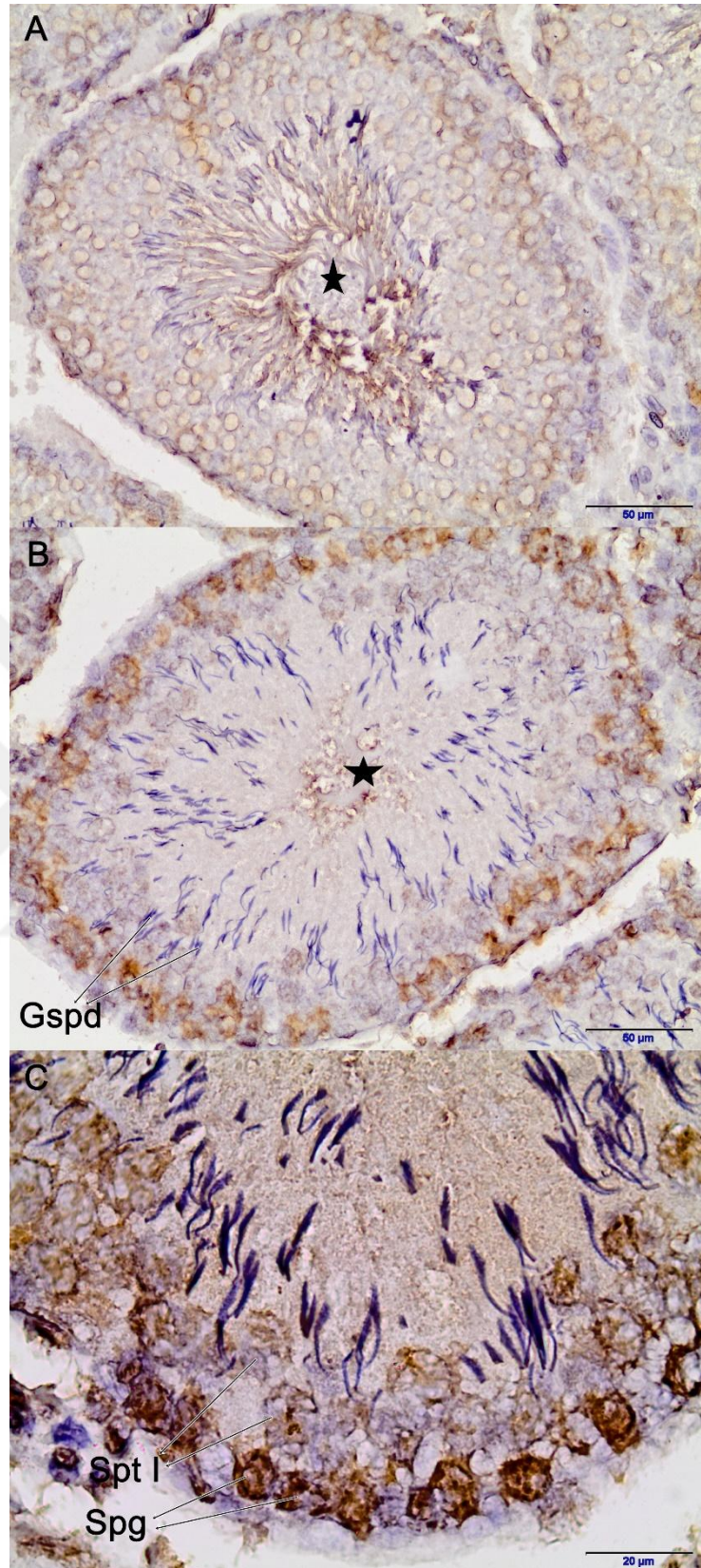
**Şekil 26** SVUS Thy-1 IHCp Sonuçları: Sol testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatositler (Spt I), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücresi (LH))



VASA: SVUS ve SVKS gruplarında spermatogonyum ve primer spermatozoidlerde kuvvetli ve orta derece pozitif boyanma gözlenirken, kontrol grubunda spermatogonyumlarda çekirdek boyanması gözlenirken sol varikozel gruplarında membran boyanması gözlemlendi.



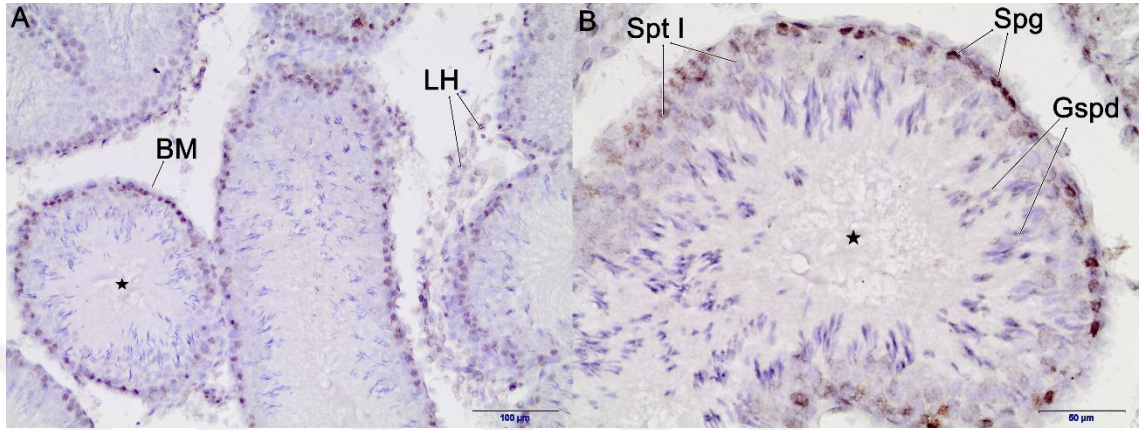
**Şekil 27** SVKS VASA IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatozoidler (Gspg), Leydig Hücreleri (LH))



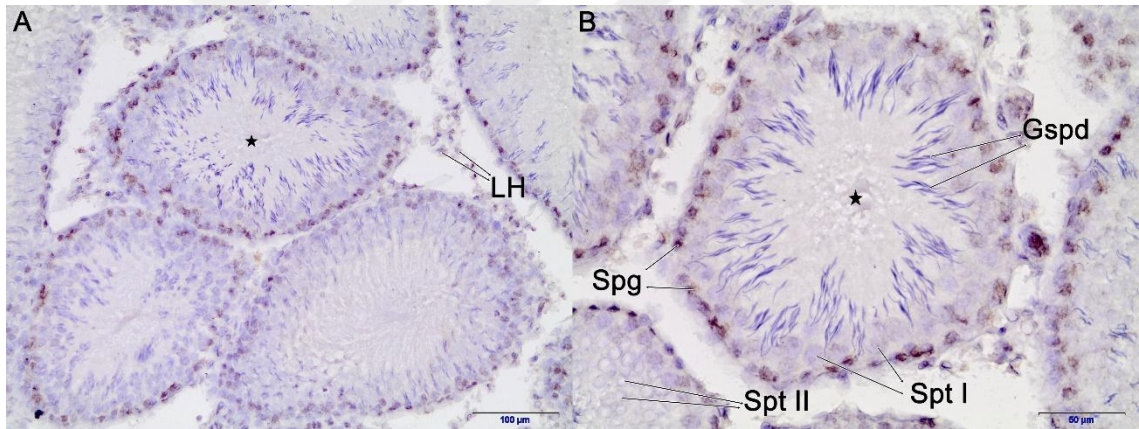
**Şekil 28** SVUS VASA IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatositler (Spt I), geç spermatidler (Gspd))



Sox-3: Hem SVKS hem de SVUS gruplarında boyanma paterni kontrol grubuna benzerlik göstermiştir fakat ekspresyon derece daha az haldedir. Spermatogonyumlar orta derecede, primer ve sekonder spermatozoidler ve Sertoli hücreleri zayıftan ortaya değişik derecelerde pozitif boyanma gözlemlendi. Geç evre spermatidlerinde boyanma gözlemlenmedi.

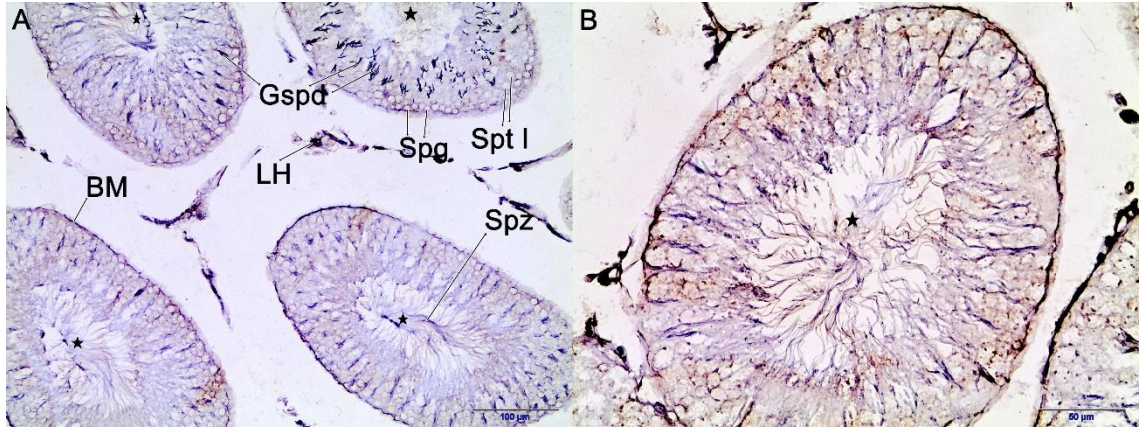


**Şekil 29** SVKS Sox-3 IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatozoidler (Spt I), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

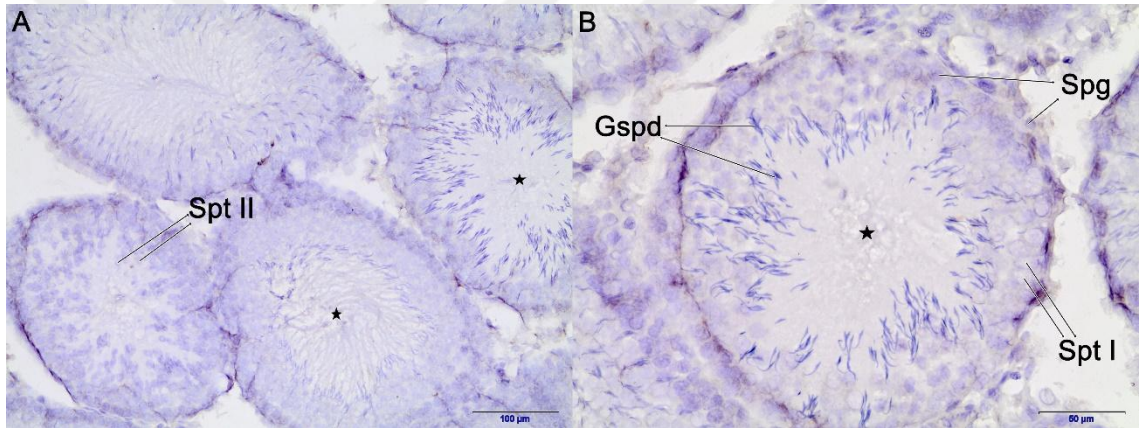


**Şekil 30** SVUS Sox-3 IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

Stro-1: Seminifer tübül hücreleri ve Leyding hücrelerinin tamamında boyanma gözlenmedi.



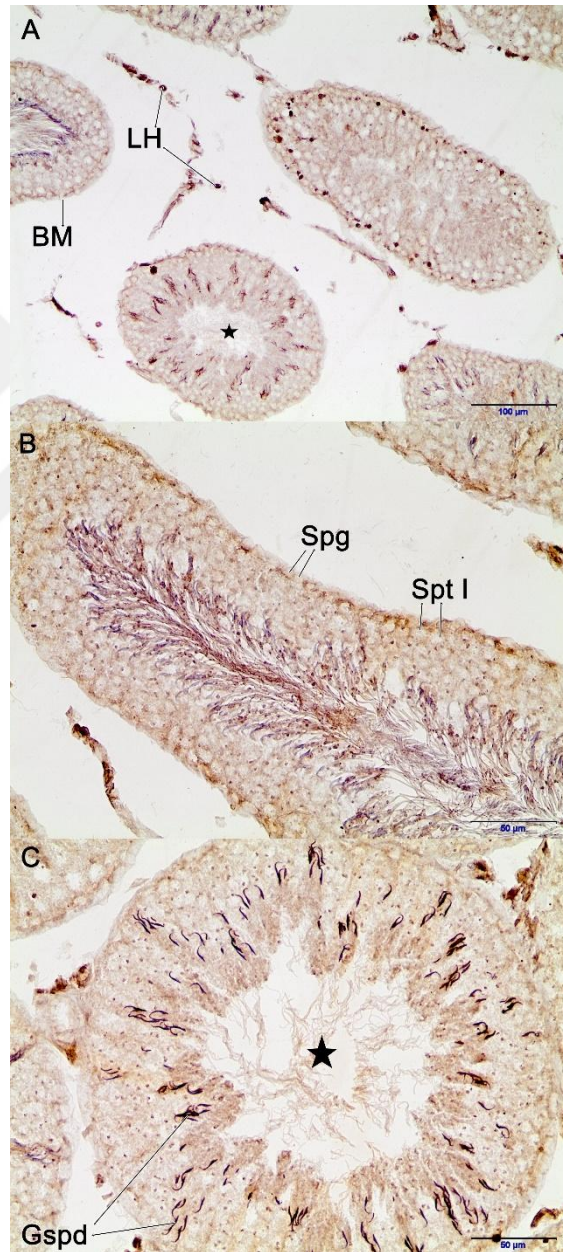
**Şekil 31** SVKS Stro-1 IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatozitler (Spt I), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))



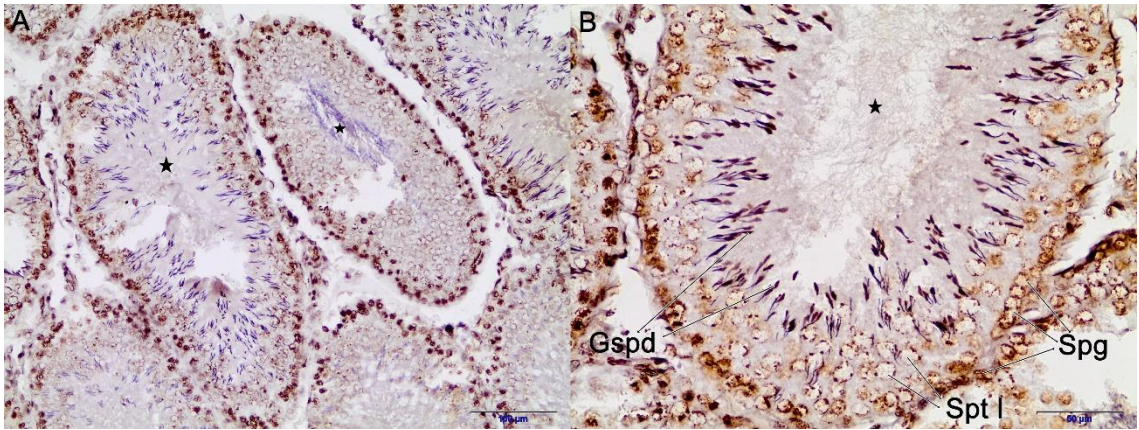
**Şekil 32** SVUS Stro-1 IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozitler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd))



C-Kit: SVKS grubunda sol testiste pozitif C-Kit ekspresyonu gözlenirken, ilginç olarak bazı tübüllerde geç evre spermatidlerde kuvvetli pozitif boyama olurken bazılarında boyanma gözlenmemiştir. Spermatogonyumlar orta derece pozitif ekspresyon gösterirken, primer ve sekonder spermatositler ve erken evre spermatidler zayıf pozitif ve negatiftir. Bununla birlikte Leyding hücreleri kuvvetli pozitif boyanmaktadır. SVUS Kısa süreliye oranla spermatogonyumlarda daha kuvvetli pozitif boyanma görülürken, spermatositlerde ve erken evre spermatidlerde zayıf pozitif boyanma gözlenmiştir. Leyding hücreleri pozitif boyanma göstermiştir.



**Şekil 33** SVKS C-Kit IHCp Sonuçları: A: sol testis enine kesiti. B, C: Sol testis enine kesiti seminifer tübül (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatositler (Spt I), geç spermatidler (Gspd), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))



**Şekil 34** SVUS C-Kit IHCp Sonuçları: Sol testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatozoidler (Spt I), geç spermatozoidler (Gspd))

**Tablo 4.3** Sol varikosel grubu testis seminifer tübüllerinde THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA, Stro-1 ifadesi.

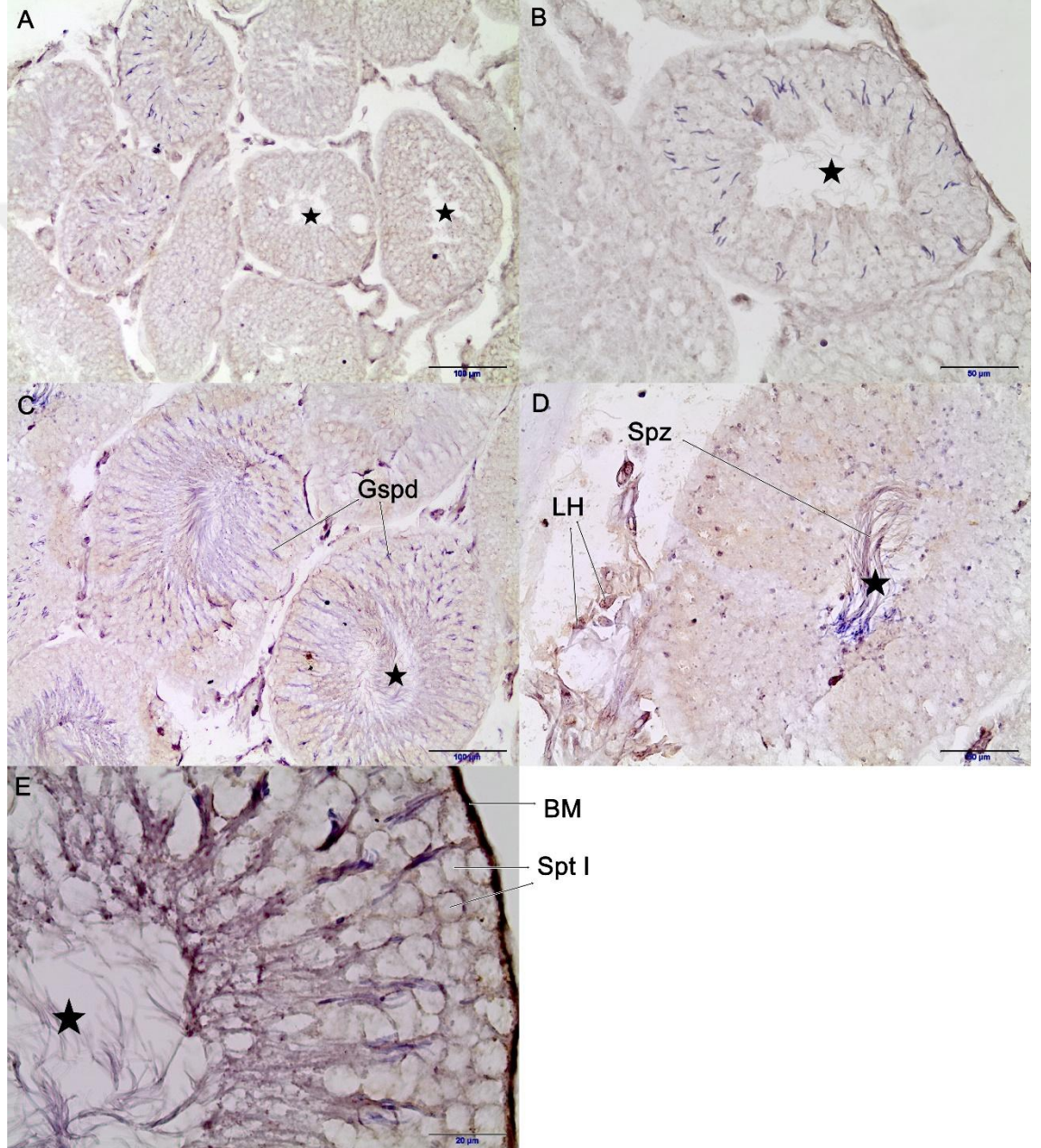
Kısa ve Uzun Süreli Etki Grubu (30 gün ve 100 gün)														
	THY1 (CD90)		C kit		Sox3		PLZF		DAZL		VASA		Stro-1	
	Kısa Süreli	Uzun Süreli	Kısa Süreli	Uzun Süreli	Kısa Süreli	Uzun Süreli	Kısa Süreli	Uzun Süreli	Kısa Süreli	Uzun Süreli	Kısa Süreli	Uzun Süreli	Kısa Süreli	Uzun Süreli
<b>Spg</b>	+	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	+++	+++	-	-
<b>Spt I</b>	+	+++	+	+++	+	-	++	+++	-	-	+++	+++	-	-
<b>Spt II</b>	+	-	+	+	+	-	++	+	-	-	++	+	-	-
<b>Spd</b>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gspd</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SH</b>	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	++	-	-	-
<b>LH</b>	+	+	++	+++	-	-	++	-	-	-	+	+	-	-
<b>BM</b>	-	-	+++	+	++	-	+++	-	-	-	+++	-	-	-

spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatositler (Spt I ve Spt II), erken spermatidler (Spd), geç spermatidlerin (Gspd), Sertoli Hücresi (SH), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM), (+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok



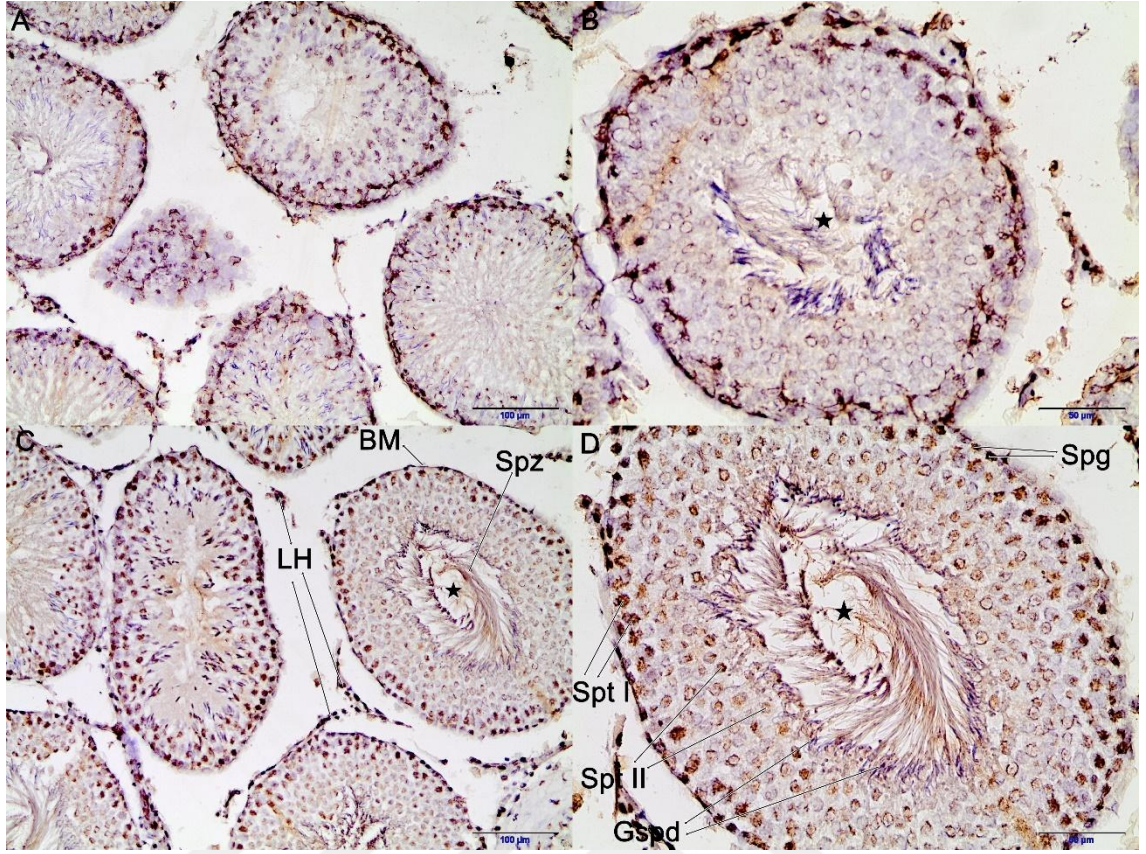
#### 4.4. Bilateral Varikosel Grubu Bulguları

PLZF: BVKS grubunda sağ ve sol testis tübüllerinde spermatogonyumlarda, spermatozoidlerde ve Leyding hücrelerinde zayıf tutulum gözlemlendi. BVUS grubunda sol testiste spermatogonyumlar ve primer spermatozoidlerde kuvvetli boyanma izlenirken sekonder spermatozoidlerde ve spermatidlerde zayıf pozitif ve negatif. Leyding hücrelerinde kuvvetli pozitif boyanma izlendi. Her iki grupta spermatogonyumlarda boyanma nükleerdi.



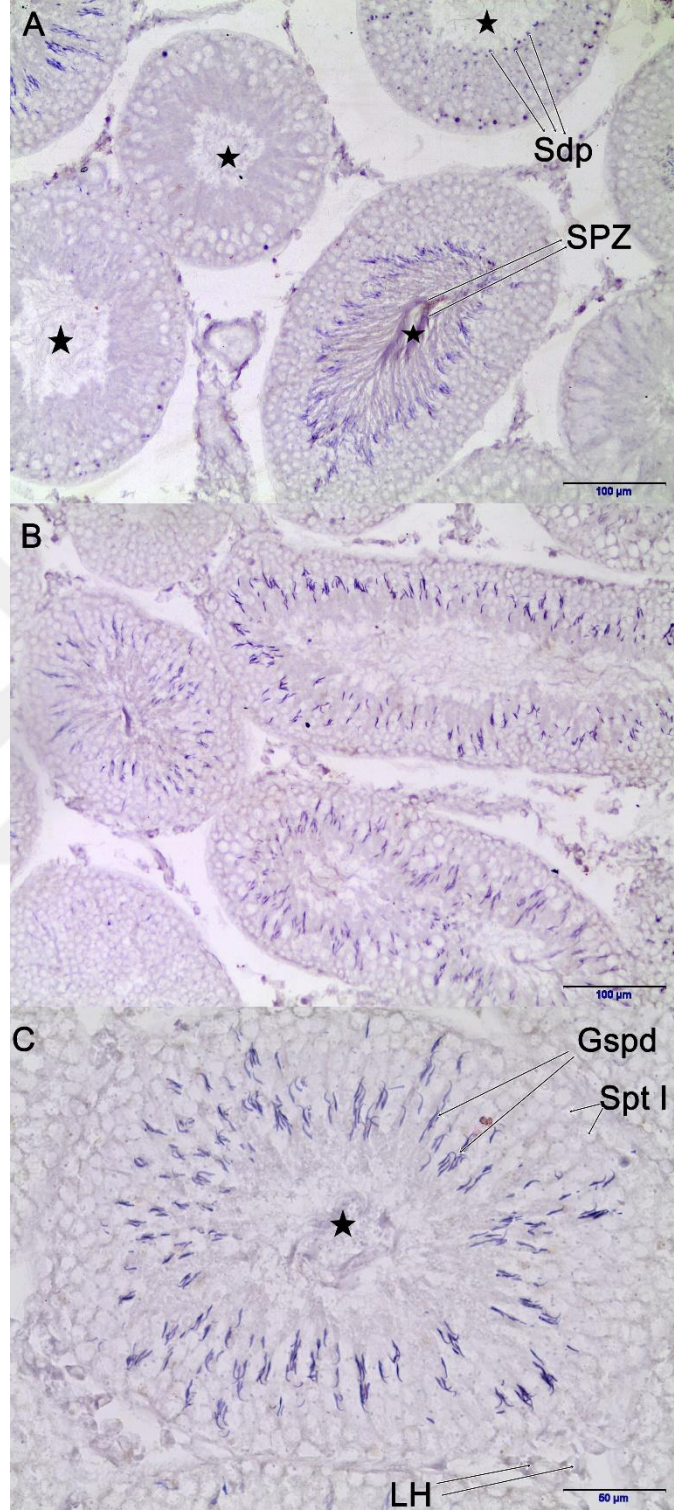
**Şekil 35** BVKS PLZF IHCp Sonuçları: A,B sol testis enine kesiti. C, D, E sağ testis enine kesiti (primer spermatozoidler (Spt I), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))





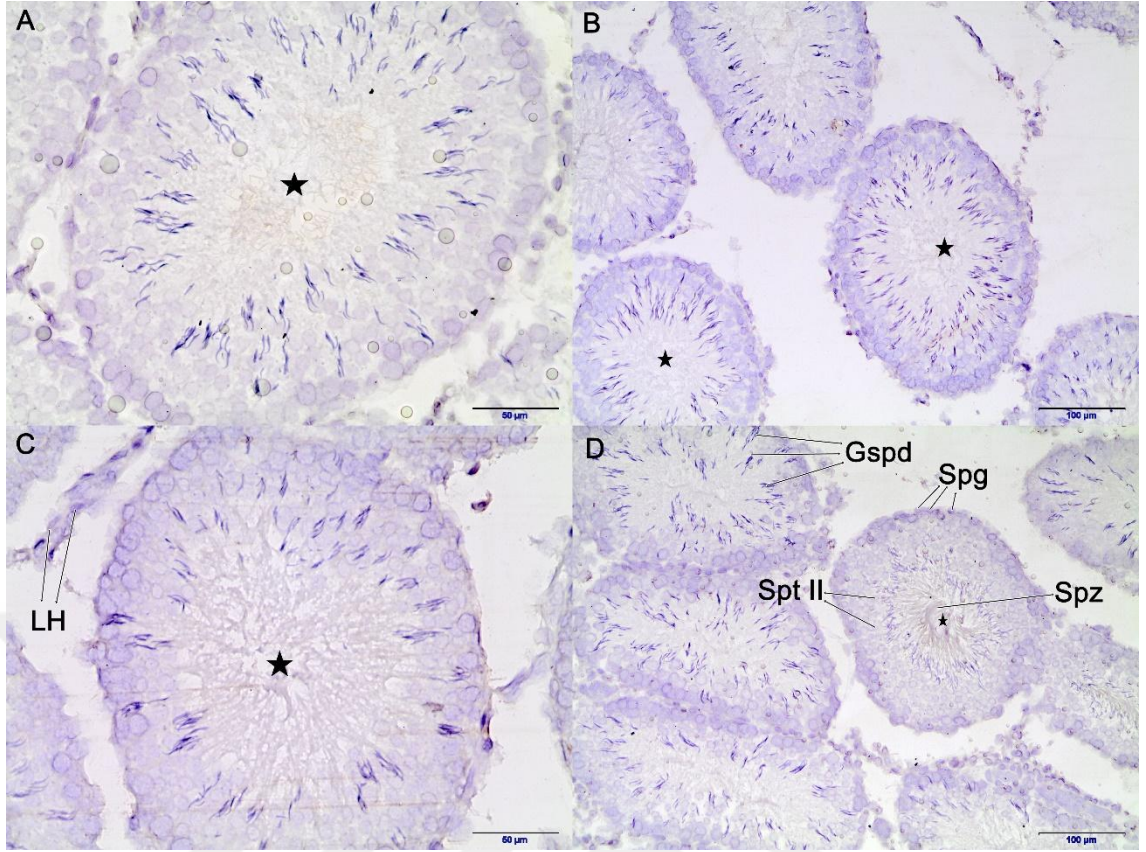
**Şekil 36** BVUS PLZF IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatositler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

DAZL: Uzun ve kısa süreli bilateral varikozel gruplarında benzer şekilde spermatogonyumlarda boyanma gözlenmedi.



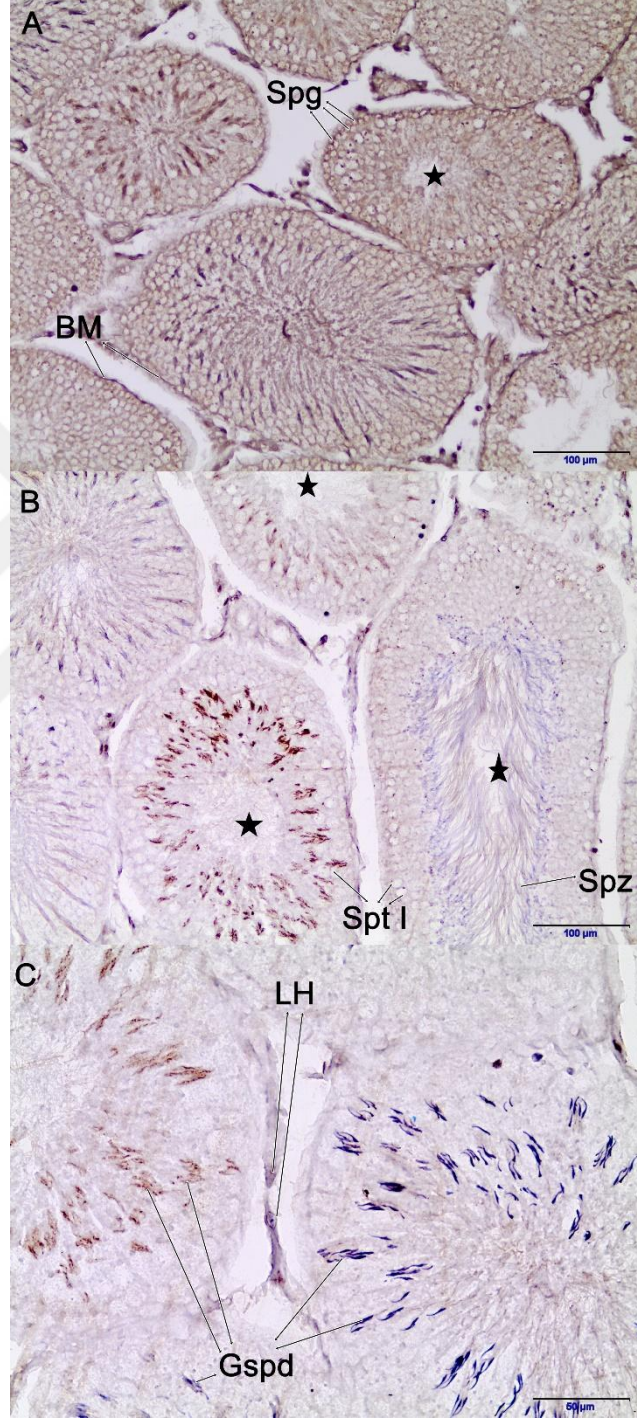
**Şekil 37** BVKS DAZL IHcP Sonuçları: A,B sol testis enine kesiti. C sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatozidler (Spt I), erken ve geç spermatozidler (Spd ve Gspd), spermatozoa (Spz))





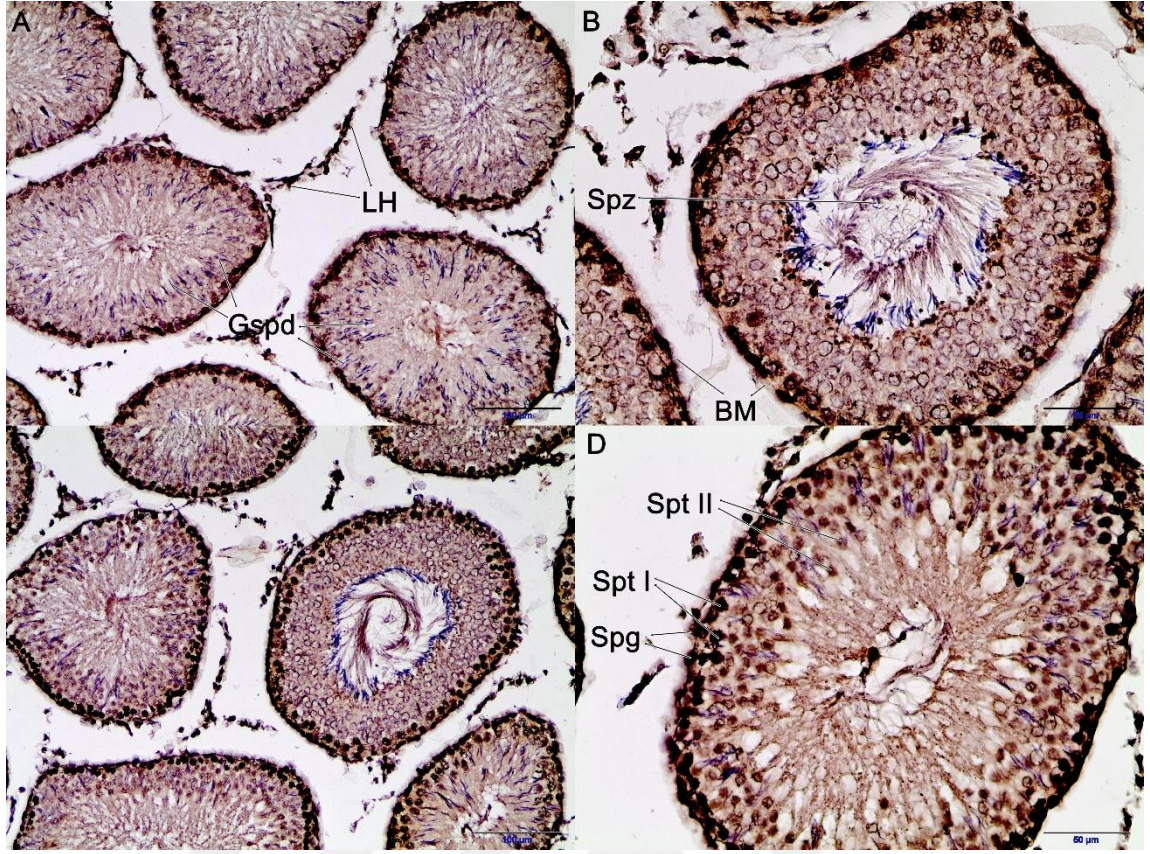
**Şekil 38** BVUS DAZL IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), sekonder spermatositler (Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz))

Thy-1: BVKS grubu sağ ve sol testiste kontrol grubuna kıyasla oldukça farklı ekspresyon gösterdi. Spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatisitler, Sertoli ve Leyding hücreleri negatifken bazı tübüllerde geç tipte spermatidlerin pozitif olduğu gözlenmiştir. Şaşırtıcı olarak BVUS grubunda boyanma paterni kontrol grubuna benzerlik göstermekle birlikte daha kuvvetli boyanmaya sahip oldukları da gözlenmiştir.



**Şekil 39** BVKS Thy-1 IHCp Sonuçları: A sol testis enine kesiti. B, C sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatisitler (Spt I), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

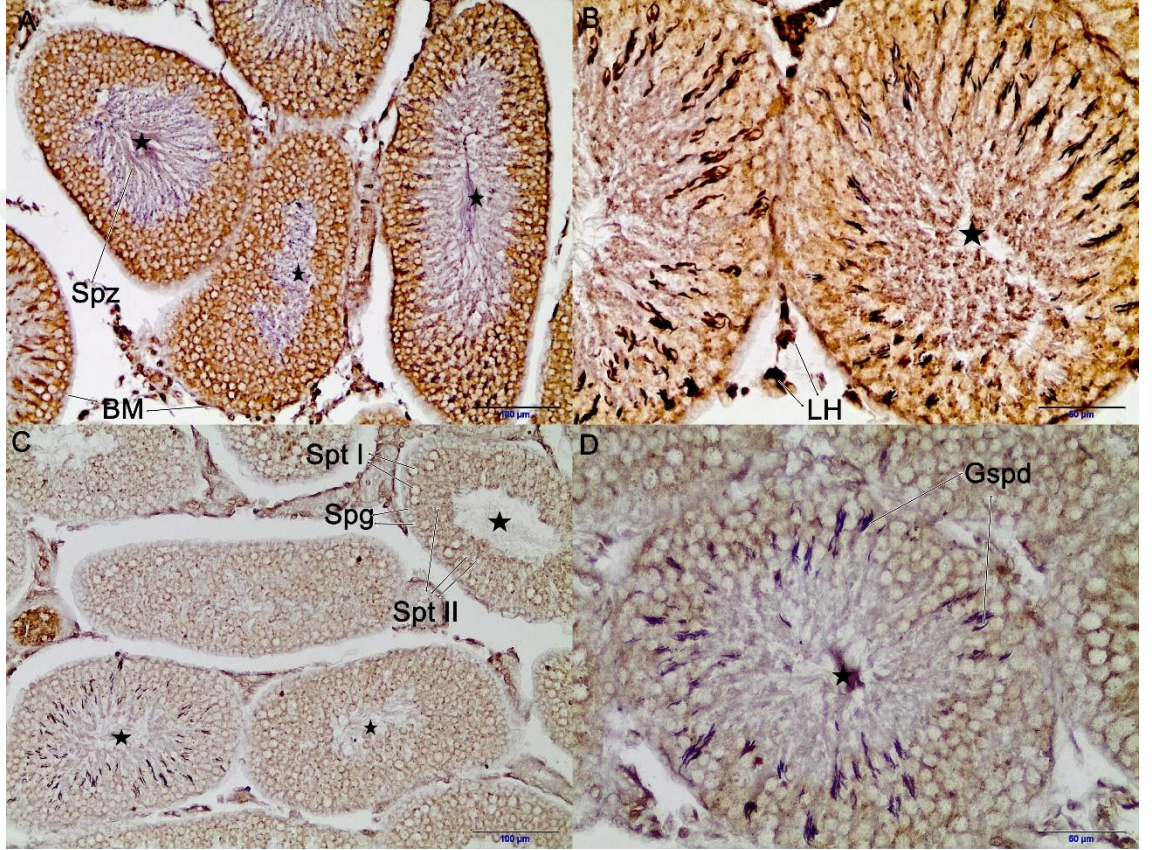




**Şekil 40** BVUS Thy-1 IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

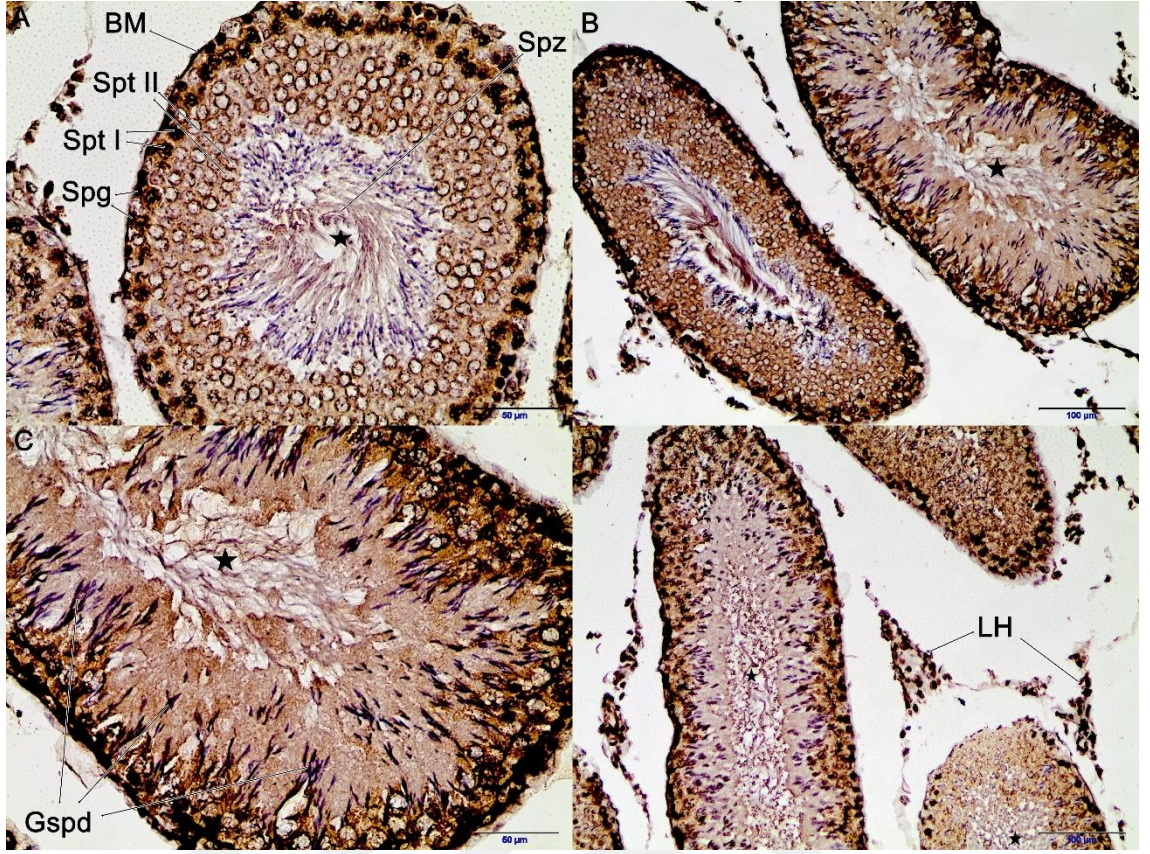


VASA: BVKS grubunda sağ testiste spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatisitler ve erken tip spermatisitlerde boyanma çok zayıf izlenirken sol testiste boyanma daha kuvvetliydi. Leyding hücrelerinde pozitif boyanma gözlemlendi. Geç evre spermatisitlerde boyanma gözlenmedi. BVUS grubunda spermatogonyumlar ve primer spermatisitlerde kuvvetli çekirdek boyanması gözlenirken, sekonder spermatisitler ve erken evre spermatisitlerde membran boyanması ve sitoplazmik boyanma gözlemlendi. Geç evre spermatisitlerde boyanma gözlenmedi. Leyding hücreleri kuvvetli boyanma gösterdi.



**Şekil 41** BVKS VASA IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatisitler (Spt I ve Spt II), geç spermatisitler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))

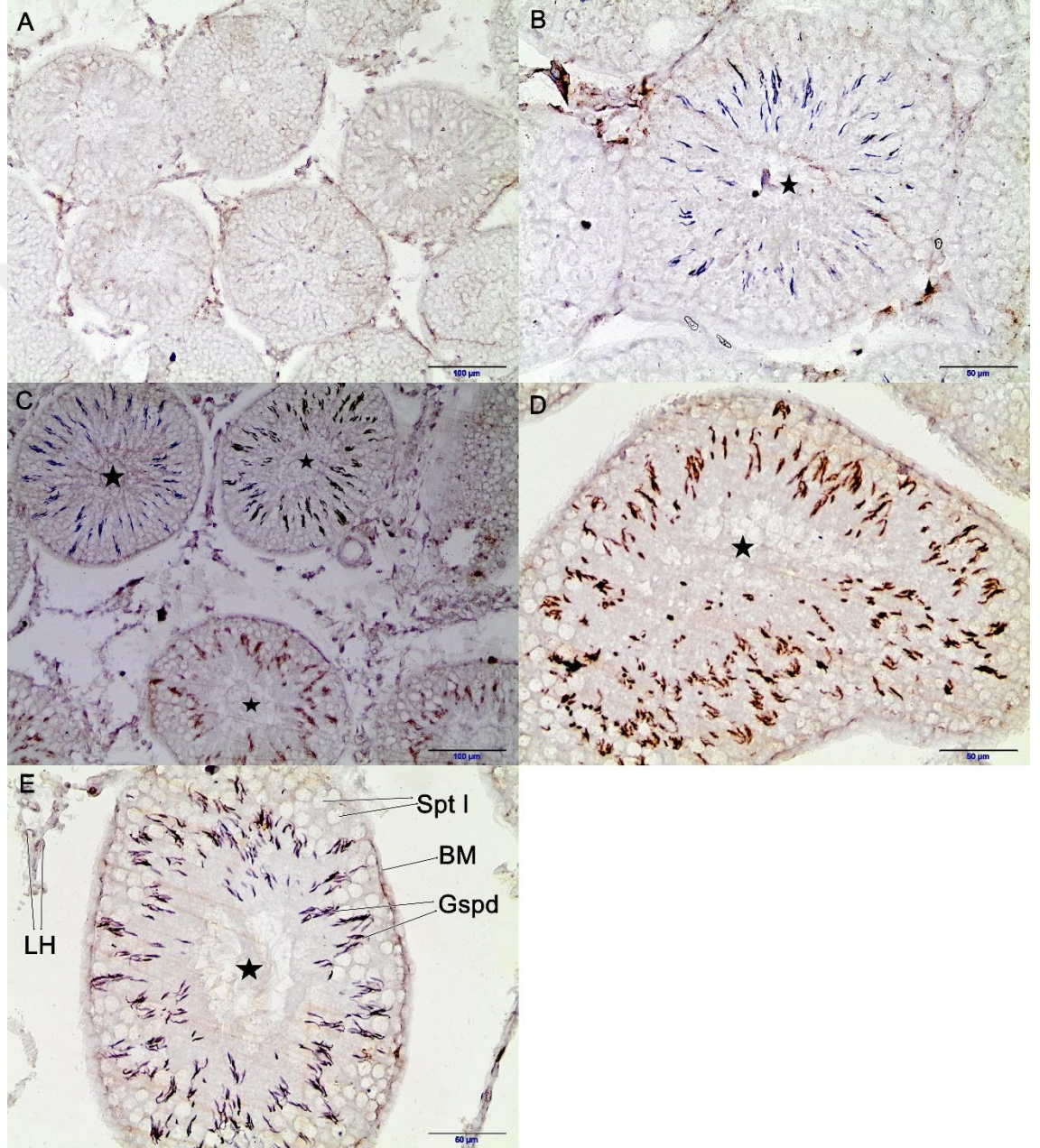




**Şekil 42** BVUS VASA IHCp Sonuçları: A, D sol testis enine kesiti. B, C sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatozoidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

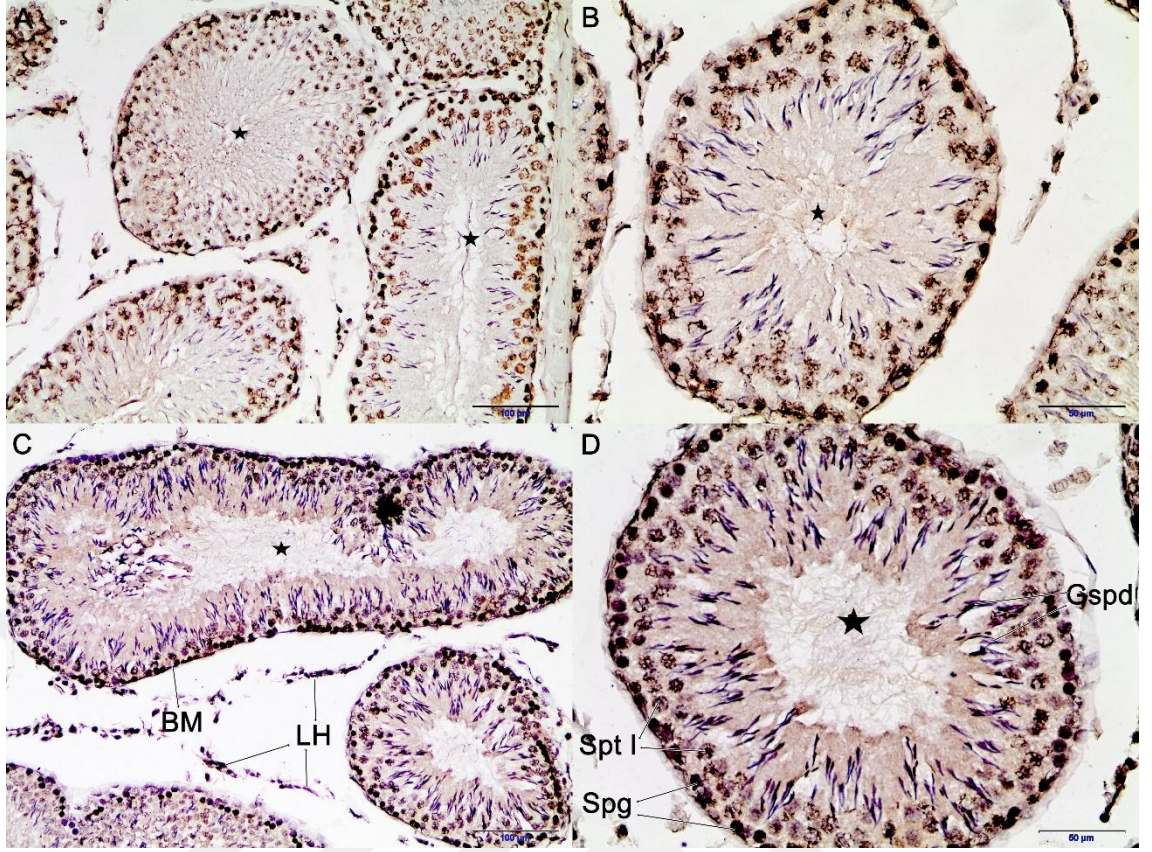


Sox-3: BVKS grubunda sox-3 ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla oldukça azalmıştır. Sol testiste spermatogonyumlarda ekspresyon gözlenmezken sağ testiste zayıf ekspresyon gözlenmiştir. BVUS gruplarındaki sox-3 ekspresyonu kontrol grubuyla benzerlik göstermektedir. Spermatogonyumlar kuvvetli, primer ve sekonder spermatozoidler ve Sertoli hücreleri zayıftan ortaya değişik derecelerde pozitif ekspresyon göstermişlerdir. Geç evre spermatidlerinde boyanma gözlenmemiştir.



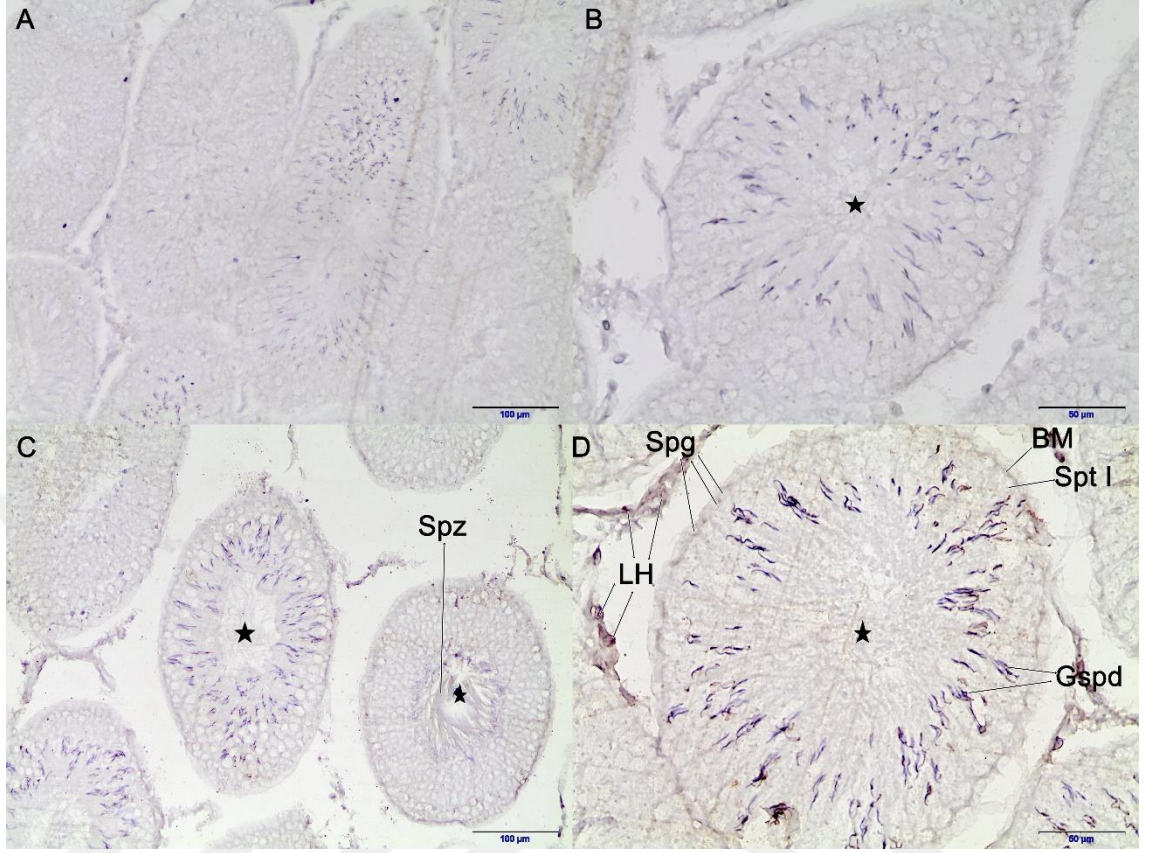
**Şekil 43** BVKS Sox-3 IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D, E sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatozoidler (Spt I), geç spermatidler (Gspd), Leydig Hücresi (LH))





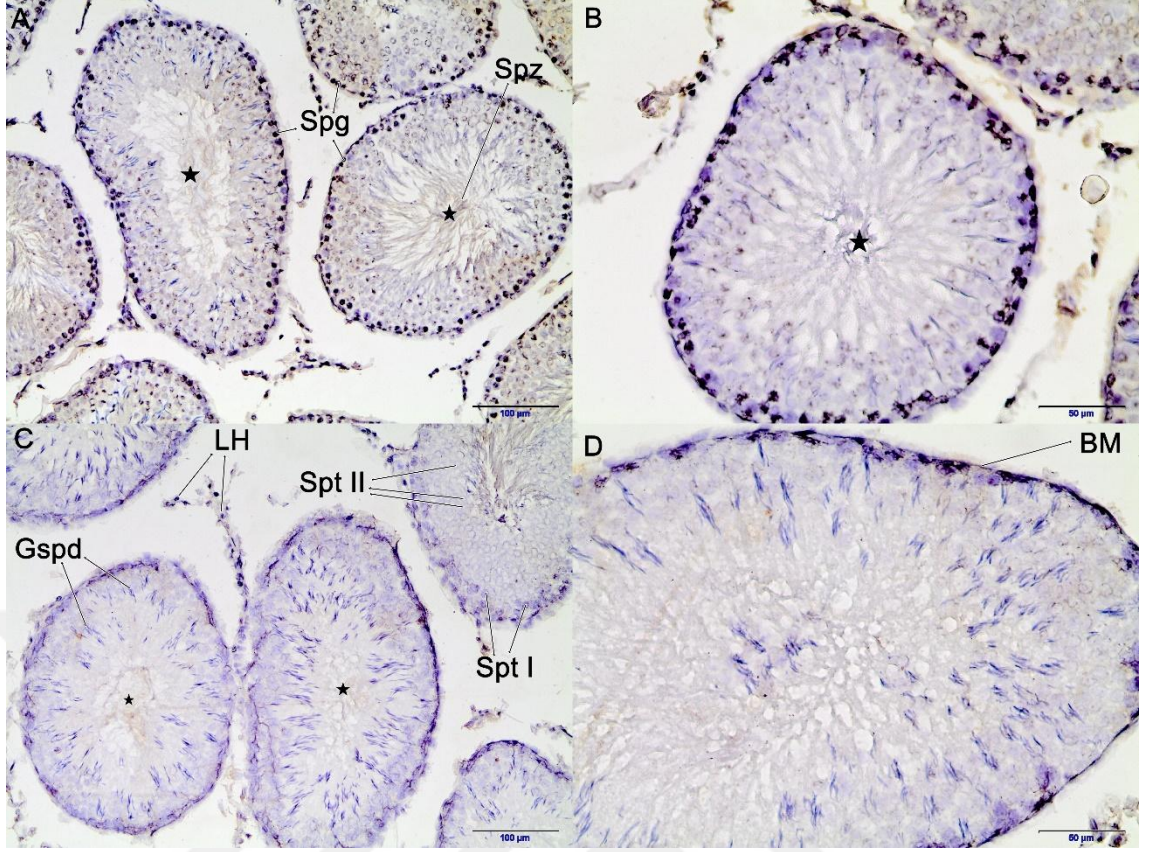
**Şekil 44** BVUS Sox-3 IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatozidler (Spt I), geç spermatozidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

Stro-1: Seminifer tübül hücreleri ve Leyding hücrelerinin tamamında boyanma gözlenmedi.



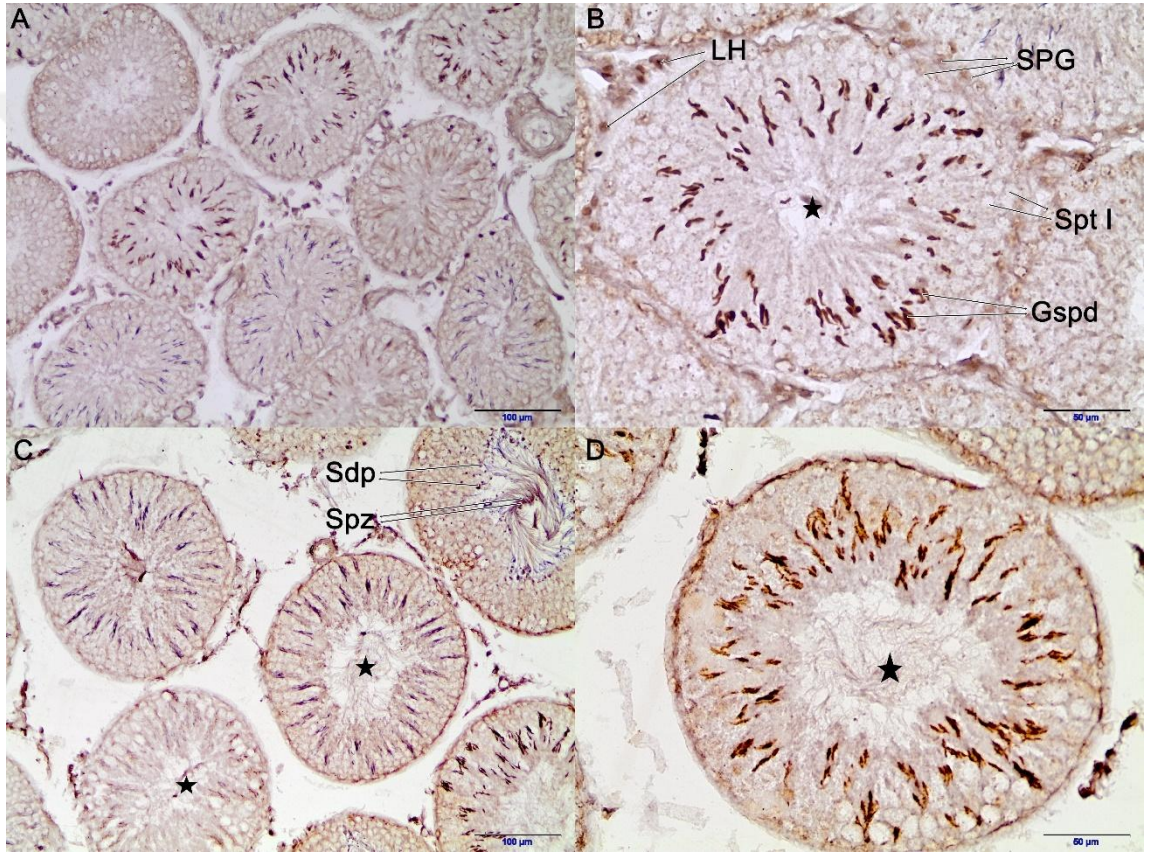
**Şekil 45** BVKS Stro-1 IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer spermatositler (Spt I), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))





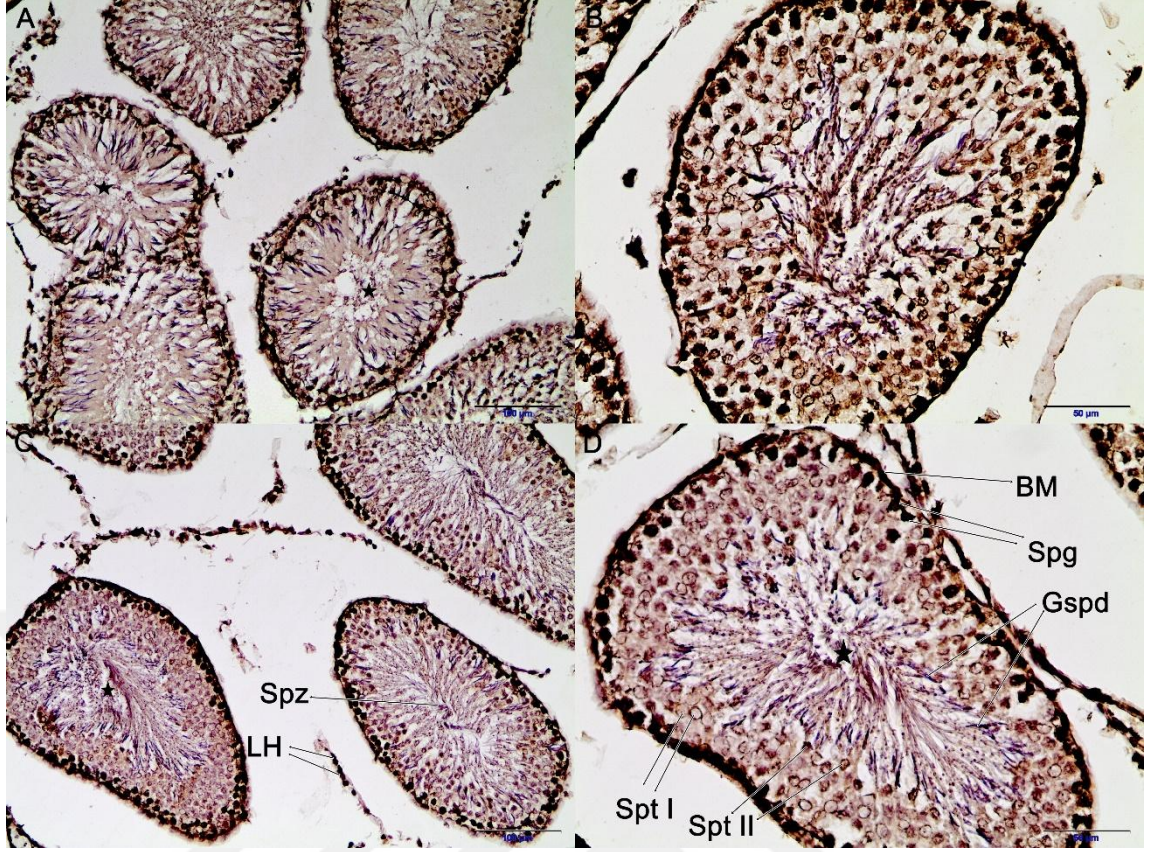
**Şekil 46** BVUS Stro-1 IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatozoidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücreleri (LH), bazal membran (BM))

C-Kit: BVKS grubunda hem sağ hem sol testiste zayıf pozitif C-Kit ekspresyonu gözlemlendi. Bununla birlikte bazı tübüllerde geç tipte spermatidlerde kuvvetli pozitif boyama olurken bazılarında boyanma gözlenmedi. Boyanmalar hücre membranlarında izlendi. Spermatogonyumlar orta derece pozitif ekspresyon gösterirken, primer ve sekonder spermatozoidler ve erken evre spermatidler zayıf pozitif ve negatifti. Bununla birlikte Leyding hücreleri kuvvetli pozitif boyandı. BVUS grubunda sağ ve sol testis hücreleri ekspresyon bakımından kontrol grubuna benzerlik göstermektedir. Bu grupta kısa süreli gruba oranla spermatogonyumlarda daha kuvvetli pozitif boyanma görülürken, spermatozoidlerde ve erken evre spermatidlerde zayıf pozitif boyanma gözlemlendi. Leyding ve Sertoli hücreleri pozitif boyanma gösterdi.



**Şekil 47** BVKS C-Kit IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (SPG), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), erken ve geç spermatidler (Spd ve Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))





**Şekil 48** BVUS C-Kit IHCp Sonuçları: A, B sol testis enine kesiti. C, D sağ testis enine kesiti (spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatozoidler (Spt I ve Spt II), geç spermatidler (Gspd), spermatozoa (Spz), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM))

**Tablo 4.4.1** Kısa süreli bilateral varikosel grubu testis seminifer tübüllerinde THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA, Stro-1 ifadesi.

Kısa Süreli Etki Grubu (30 gün)														
	THY1 (CD90)		C kit		Sox3		PLZF		DAZL		VASA		Stro-1	
	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis
<b>Spg</b>	+++	-	+++	+++	-	+	-	+	-	-	+	+++	-	-
<b>Spt I</b>	+++	-	-	+	+/-	-	-	+	-	-	+	+++	-	-
<b>Spt II</b>	++	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	+	++	-	-
<b>Spd</b>	+	-	-	+	+/-	-	-	-	-	-	+	++	-	-
<b>Gspd</b>	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	-	+++	-	-	-
<b>SH</b>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<b>LH</b>	++	-	+++	++	-	-	-	+	-	-	+++	+++	-	-
<b>BM</b>	+++	-	+++	+++	-	+	-	++	-	-	+	+++	-	-

spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatositler (Spt I ve Spt II), erken spermatidler (Spd), geç spermatidlerin (Gspd), Sertoli Hücresi (SH), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM), (+++): kuvvetli boyanma, (++) : orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok

**Tablo 4.4.2** Uzun süreli bilateral varikozel grubu testis seminifer tübüllerinde THY1 (CD90), C kit, Sox3, PLZF, DAZL, VASA, Stro-1 ifadesi.

Uzun Süreli Etki Grubu (100 gün)														
	THY1 (CD90)		C kit		Sox3		PLZF		DAZL		VASA		Stro-1	
	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis	Sol Testis	Sağ Testis
<b>Spg</b>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	+++	+++	-	-
<b>Spt I</b>	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	-	-	+++	+++	-	-
<b>Spt II</b>	++	+++	++	++	-	++	-	++	-	-	+	+++	-	-
<b>Spd</b>	++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-
<b>Gspd</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>SH</b>	++	+++	++	+++	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-
<b>LH</b>	+++	+++	++	+++	+	+	-	+++	-	-	++	+++	-	-
<b>BM</b>	+++	+++	+++	+++	++	+	+	++	-	-	+++	+++	-	-

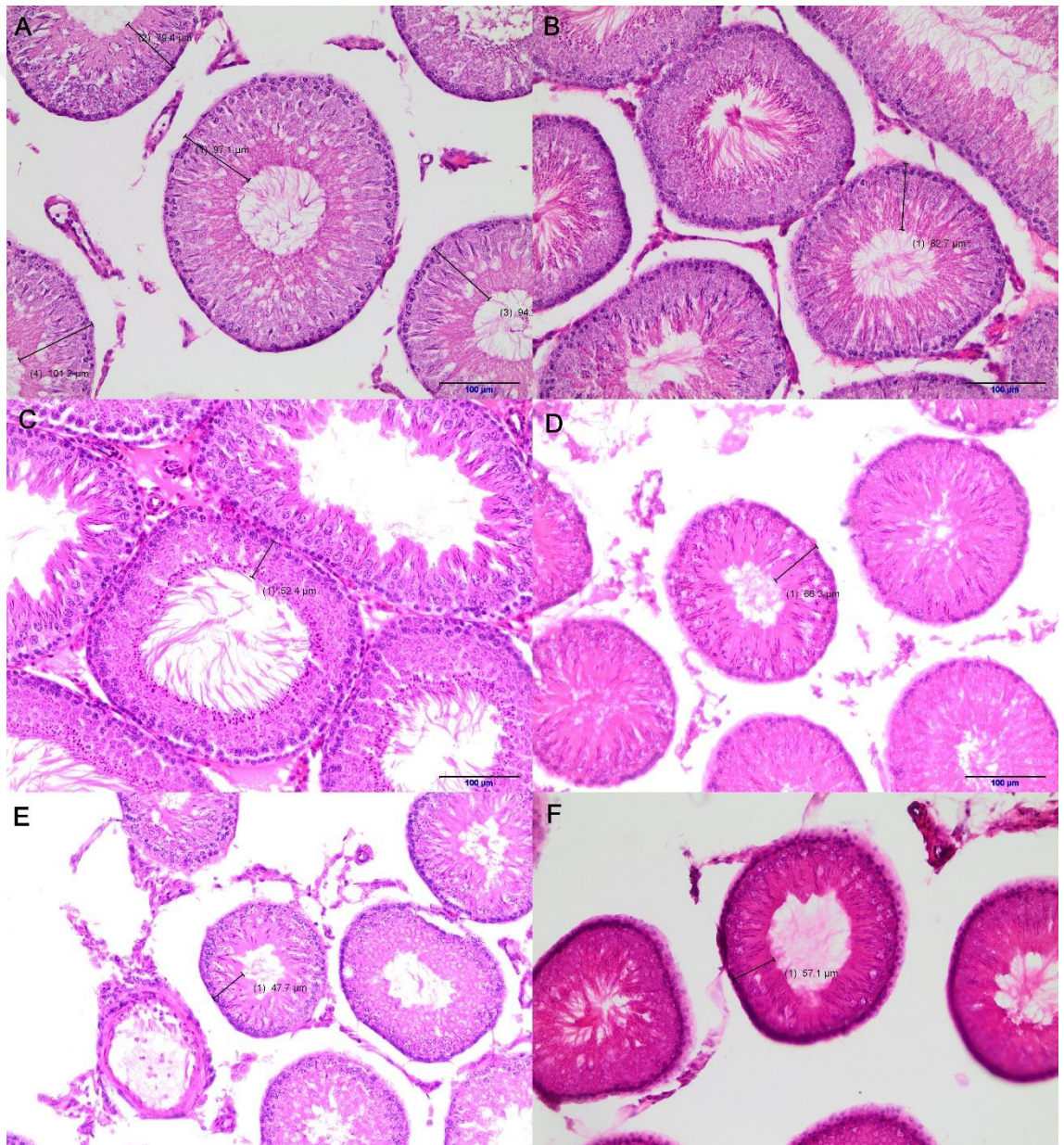
spermatogonyumlar (Spg), primer ve sekonder spermatositler (Spt I ve Spt II), erken spermatidler (Spd), geç spermatidlerin (Gspd), Sertoli Hücresi (SH), Leyding Hücresi (LH), bazal membran (BM), (+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok



## 4.5. Morfometrik Ölçümlerin Değerlendirilmesi

### 4.5.1 Modifiye Johnson Skorlarının Değerlendirilmesi

Her hayvanın sol testisinden alınan enine kesitinde, 30 adet yuvarlak tübüler enine kesit seminiferöz epitelin kalitesi açısından değerlendirildi. Değerlendirme sonrası Johnson Skoru ortalamaları, kontrol grubunda 11,184 (Şekil 49-A), sham grubunda 10,765 (Şekil 49-B), kısa süreli sol varikozel grubunda 8,190 (Şekil 49-C), uzun süreli sol varikozel grubunda 7,478 (Şekil 49-D), kısa süreli bilateral varikozel grubunda 8,099 (Şekil 49-E) ve uzun süreli bilateral varikozel grubunda 8,065 (Şekil 49-F) olarak saptandı (Tablo 4.5.1).



**Şekil 49** Tüm Grupların Seminifer Epitel Kalınlıkları Ölçümü. A) Kontrol Grubu B) Sham Grubu C) SVKS Grubu D) SVUS Grubu E) BVKS Grubu F) BVUS Grubu



**Tablo 4.5.1.1** Morfolojik Parametre Ortalamaları

Gruplar	Ortalama Johnsen Skorları	Seminifer Tübül Alanı ( $\mu\text{m}^2$ )	Seminifer Epitel Kalınlığı ( $\mu\text{m}$ )
<b>Kontrol</b>	11,184	79809	80,98
<b>Sham</b>	10,765	71954	77,56
<b>SVKS</b>	8,190	43378	52,60
<b>SVUS</b>	7,478	35891	52,57
<b>BVKS</b>	8,099	29329	50,84
<b>BVUS</b>	8,065	48083	62,25

P < 0,001 (SD= 5, F= 43,46, P=0,000) olduğu için gruplar arasında Johnson skorlaması açısından istatistiksel bir fark gözlenmiştir. Gruplar arasındaki farkın anlaşılması için Tukey testi ile devam edilmiştir (Tablo 4.5.1.1). Tukey testi sonuçlarına göre kontrol ve sham grupları arasında fark gözlenmezken SVKS, SVUS, BVKS, BVUS gruplarının kontrol ve sham grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı oldukları fakat kendi aralarında anlamlı istatistiksel bir farka sahip olmadıkları sonucuna ulaşılmıştır (Tablo 4.5.1.2).

**Tablo 4.5.1.2** Grupların Johnsen skoru ortalamalarının kontrol grubu (99,54) ile karşılaştırılması

	Alt Limit	Orta	Üst Limit
SHAM	-1,341	-0,419	0,503
SVKS	-3,951	-2,993	-2,036
SVUS	-4,847	-3,706	-2,564
BVKS	-3,938	-3,085	-2,233
BVUS	-4,160	-3,119	-2,079

#### 4.5.2 Seminifer Epitel Kalınlıklarının Değerlendirilmesi

Her hayvanın sol testisinden alınan enine kesitinde, 30 adet yuvarlak tübüler enine kesit seminifer epitel kalınlıkları açısından değerlendirildi. Değerlendirme sonrası seminifer epitel kalınlıkları ortalamaları, kontrol grubunda 80,98  $\mu\text{m}$  (Şekil 49-A), sham grubunda 77,56  $\mu\text{m}$  (Şekil 49-B), kısa süreli sol varikozel grubunda 52,60  $\mu\text{m}$  (Şekil 49-C), uzun süreli sol varikozel grubunda 52,57  $\mu\text{m}$  (Şekil 49-D), kısa süreli bilateral varikozel grubunda 50,84  $\mu\text{m}$  (Şekil 49-E) ve uzun süreli bilateral varikozel grubunda 62,25  $\mu\text{m}$  (Şekil 49-F) olarak saptandı (Tablo 4.5.1.1)

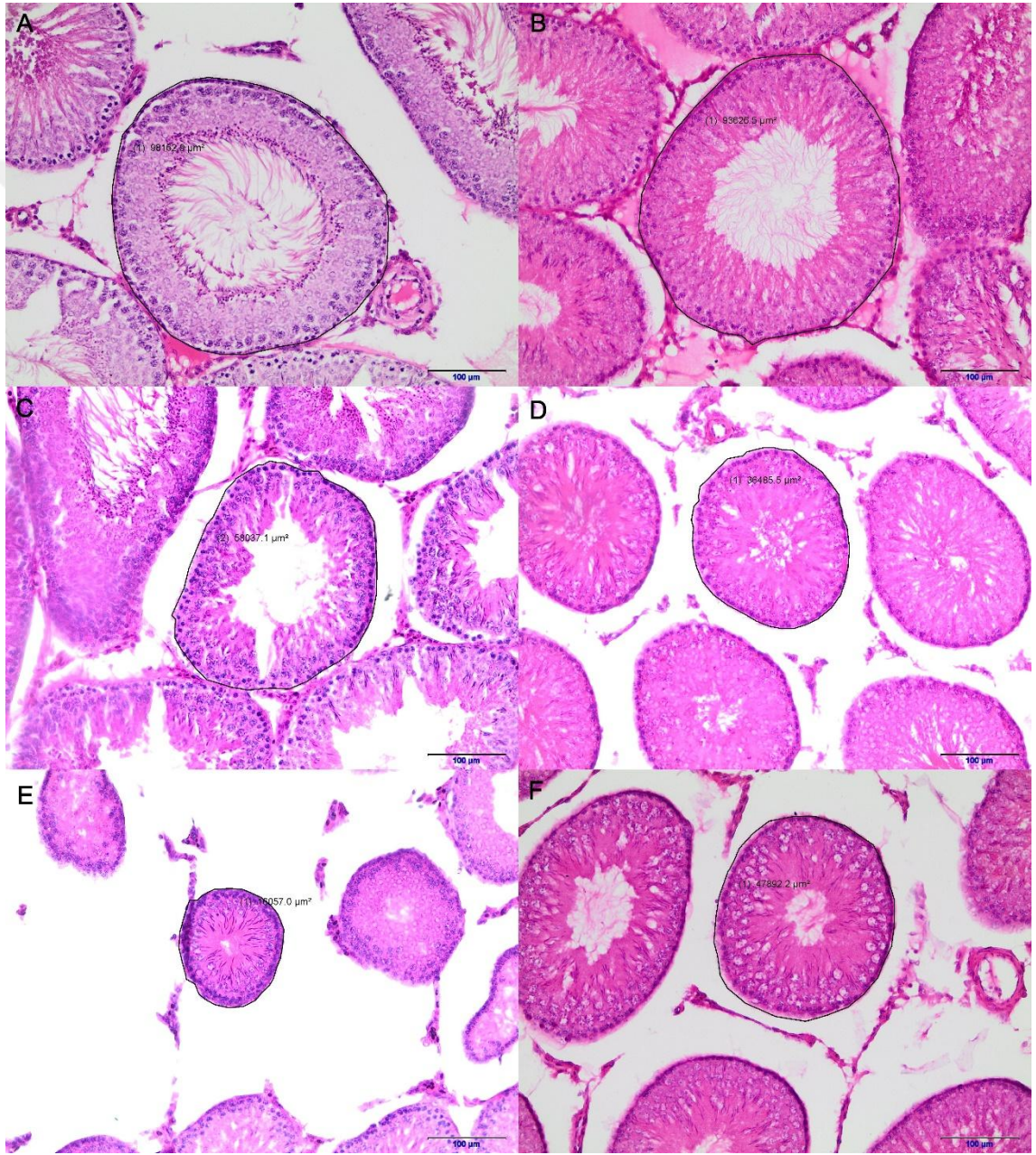
$P < 0,001$  ( $SD= 5$ ,  $F= 22,68$ ,  $P=0,000$ ) olduğu için gruplar arasında seminifer epitel kalınlığı açısından istatistiksel bir fark gözlenmiştir. Gruplar arasındaki farkın anlaşılması için Tukey testi ile devam edilmiştir (Tablo 4.5.1). Tukey testi sonuçlarına göre kontrol ve sham grupları arasında fark gözlenmezken SVKS, SVUS, BVKS, BVUS gruplarının kontrol ve sham grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı oldukları görülmüş ve kendi aralarında da anlamlı istatistiksel bir farka (Tablo 4.5.2) sahip oldukları sonucuna ulaşılmıştır.

**Tablo 4.5.2** Tukey testine göre grup ortalamalarının seminifer epitel kalınlıkları açısından karşılaştırılması

Gruplar	Ortalamaların farkı	Farkın standart Hatası	%95 Güven Aralığı	T-Değeri	Ayarlanmış P- Değeri
BVUS - BVKS	11,41	3,88	( 0,16; 22,66)	2,94	0,045
SVKS - BVKS	1,76	3,88	( -9,49; 13,01)	0,45	0,998
SVUS - BVKS	1,73	4,86	(-12,36; 15,83)	0,36	0,999
SHAM - BVKS	26,72	3,80	( 15,70; 37,75)	7,03	0,000
KONTROL - BVKS	30,14	3,97	( 18,63; 41,66)	7,59	0,000
SVKS - BVUS	-9,65	3,79	(-20,63; 1,33)	-2,55	0,119
SVUS - BVUS	-9,68	4,79	(-23,56; 4,21)	-2,02	0,338
SHAM - BVUS	15,31	3,71	( 4,57; 26,06)	4,13	0,001
KONTROL - BVUS	18,73	3,88	( 7,49; 29,98)	4,83	0,000
SVUS - SVKS	-0,03	4,79	(-13,91; 13,86)	-0,01	1,000
SHAM - SVKS	24,96	3,71	( 14,22; 35,71)	6,73	0,000
KONTROL - SVKS	28,38	3,88	( 17,14; 39,63)	7,32	0,000
SHAM - SVUS	24,99	4,73	( 11,29; 38,69)	5,29	0,000
KONTROL - SVUS	28,41	4,86	( 14,31; 42,51)	5,84	0,000
KONTROL - SHAM	3,42	3,80	( -7,60; 14,44)	0,90	0,946

#### 4.5.3 Seminifer Tübül Alanlarının Değerlendirilmesi

Her hayvanın sol testisinden alınan enine kesitinde, 30 adet yuvarlak tübüler enine kesit seminifer tübül alanları açısından değerlendirildi. Değerlendirme sonrası seminifer tübül alanları ortalamaları, kontrol grubunda  $79809 \mu\text{m}^2$  (Şekil 50-A), sham grubunda  $71954 \mu\text{m}^2$  (Şekil 50-B), kısa süreli sol varikosel grubunda  $43378 \mu\text{m}^2$  (Şekil 50-C), uzun süreli sol varikosel grubunda  $35891 \mu\text{m}^2$  (Şekil 50-D), kısa süreli bilateral varikosel grubunda  $29329 \mu\text{m}^2$  (Şekil 50-E) ve uzun süreli bilateral varikosel grubunda  $48083 \mu\text{m}^2$  (Şekil 50-F) olarak saptandı (Tablo 4.5.1.1)



**Şekil 50** Tüm Grupların Seminifer Tübül Alanları Ölçümü. A) Kontrol Grubu B) Sham Grubu C) SVKS Grubu D) SVUS Grubu E) BVKS Grubu F) BVUS Grubu

$P < 0,001$  ( $SD= 5$ ,  $F= 59,03$ ,  $P=0,000$ ) olduğu için gruplar arasında seminifer tübül alanı açısından istatistiksel bir fark gözlenmiştir. Gruplar arasındaki farkın anlaşılması için Tukey testi ile devam edilmiştir (Tablo 4.5.1). Tukey testi sonuçlarına göre kontrol ve sham grupları arasında fark gözlenmezken SVKS, SVUS, BVKS, BVUS gruplarının kontrol ve sham grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı oldukları görülmüş ve kendi aralarında da anlamlı istatistiksel bir farka (Tablo 4.5.3) sahip oldukları sonucuna ulaşılmıştır.

**Tablo 4.5.3** Tukey testine göre grup ortalamalarının seminifer tübül alanları açısından karşılaştırılması

Gruplar	Ortalamaların farkı	Farkın standart Hatası	%95 Güven Aralığı	T-Değeri	Ayarlanmış P- Değeri
BVUS - BVKS	18754	3394	( 8866; 28642)	5,53	0,000
SVKS - BVKS	14049	3784	( 3026; 25073)	3,71	0,005
SVUS - BVKS	6563	3130	( -2557; 15682)	2,10	0,298
SHAM - BVKS	42625	3555	( 32268; 52982)	11,99	0,000
KONTROL - BVKS	50480	3883	( 39167; 61794)	13,00	0,000
SVKS - BVUS	-4705	3740	(-15601; 6191)	-1,26	0,807
SVUS - BVUS	-12191	3077	(-21156; -3227)	-3,96	0,002
SHAM - BVUS	23871	3509	( 13650; 34092)	6,80	0,000
KONTROL - BVUS	31726	3841	( 20537; 42916)	8,26	0,000
SVUS - SVKS	-7487	3502	(-17690; 2717)	-2,14	0,277
SHAM - SVKS	28576	3887	( 17252; 39899)	7,35	0,000
KONTROL - SVKS	36431	4189	( 24227; 48635)	8,70	0,000
SHAM - SVUS	36062	3254	( 26583; 45542)	11,08	0,000
KONTROL - SVUS	43918	3610	( 33402; 54434)	12,17	0,000
KONTROL - SHAM	7855	3984	( -3750; 19461)	1,97	0,366



## 5. TARTIŞMA

Varikosel vakalarında literatürde eşey hücre hatları üzerindeki etkileri araştıran sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır. Nishiyama H. vd (1998), varikoselli insan testisinde yaptıkları immünohistokimyasal analizler sonucu eşey hücrelerinin normal testislerdekine kıyasla daha az soğuk indüklenbilir RNA bağılı proteini (Cirp- Cold-Inducible RNA-binding protein) ekspresyona ettiğini ortaya koymuştur. Bu durum varikoseldeki testikuler sıcaklık artışı ile ilişkilidir ve artan sıcaklık Cirp ekspresyonunu down-regule etmektedir.

Son yıllarda yapılan bir diğer çalışma ise benzer şekilde skrotal hiperterminin testiküler eşey hücresi proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu artırdığını göstermektedir (Kanter M vd 2013).

Deneysel varikoselin p53 bağımlı apoptozu doğrudan primer spermatositlerdeki  $\gamma$ -H2AX aktivasyonunu sağlayarak indüklediği de bilinmektedir (Chang I.Y vd 2010).

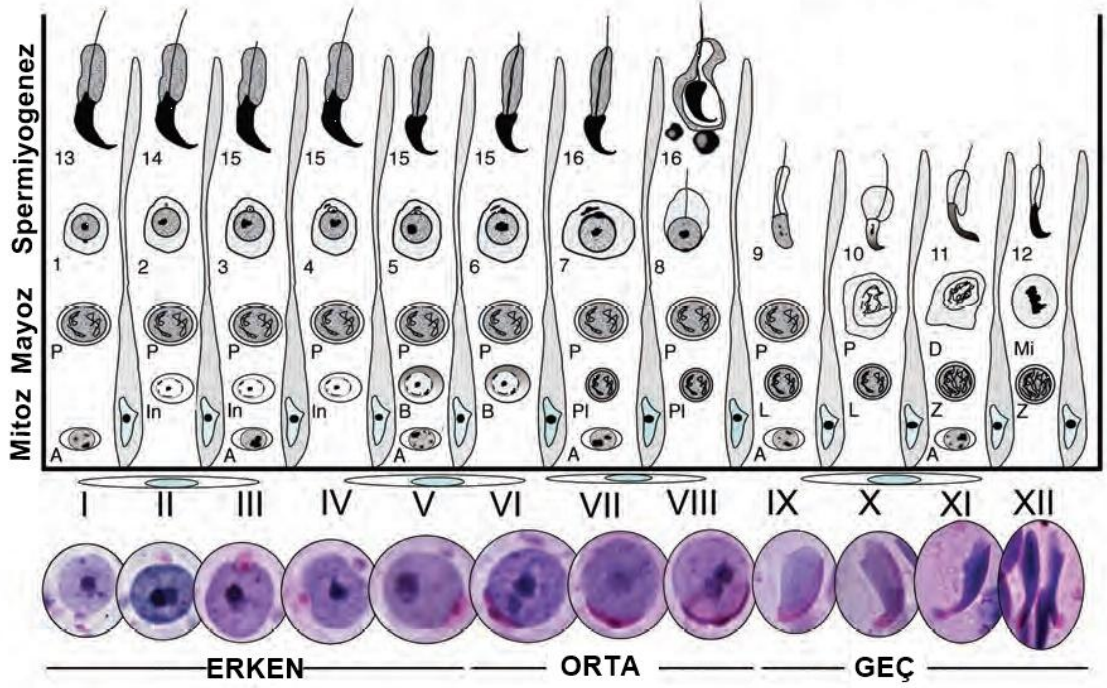
Spermatogoniyal kök hücre (SKH)'ler diğer doku spesifik kök hücreler gibi oldukça nadir olarak bulunmaktadır. Sıçan testisindeki sayıları total kök hücre havuzunun % 0.03 ünü oluşturmaktadır (Tegelenbosch ve de Rooji, 1993, Phillips BT vd 2010). SKH'ler fetal gelişim sırasında primordiyal eşey hücrelerinden köken alan gonositlerden gelişmektedirler.

Primordiyal eşey hücre (PEH)'leri embriyoda ilk olarak birleşme sonrası yaklaşık 7-8 günler arasında epiblast evresindeki bir grup alkalik fosfat pozitif hücre olarak gözlenmektedir. PEH özelleşmesi ekstraembriyonik ektodermden salınan kemik morfojenik proteini 4 ve 8b (BMP4 ve BMP8b, Bone Morphogenic Protein 4 and 8b) ye bağlıdır (Ginsburg vd 1990, Lawson vd 1999, Ying vd 2001, Philips BT vd 2010). PEH'leri, farelerde birleşme sonrası 8.5-12.5 gün aralığında allantoin formasyonu sırasında arka bağırsaktan farklılaşmamış gonadlara göç etmeden önce embriyodan dışarı pasif olarak süpürülürler. Bu göç esnasında replikasyon ile genital kabartılarda yaklaşık 3000 PEH'si kolonize olur (Bendel-Stenzel vd 1998, Philips BT vd 2010). Erkek gonadlarında birleşme sonrası 13.5 günde PEH'leri, sertoli öncül hücreleri ve peritübüler miyoid hücreleri ile örtülü gonositleri oluşturur.

Gonositler üç alt gruba kategorize edilebilir, mitotik (M)-prospematogonya, T1-prospematogonya ve T2-prospematogonya (McCarey 1993, Philips BT vd 2010). Farelerde M-prospematogonyalar bazal membrandan uzakta testikular kordun merkezine konuşlanmış olup, birleşme sonrası 16.5inci güne, T1-prospematogonyaları oluşturup G0 mitotik tutuklanmaya kadar, proliferasyona devam ederler (McLaren

2003, Tohonen vd 2003, Philips BT vd 2010). Gonositler doğum sonrası ilk hafta proliferasyonu sürdürerek T2-prospermatogonyalara dönüşümlerine devam ederken bir yandan da seminifer tübül bazal membranına göç ederler (Clermont ve Perey 1957, Philips BT vd 2010). T2-prospermatogonyalar bazal membranda kolonize olarak SKH havuzunu oluşturmaya başlarlar(Kluin ve de Rooji, 1981, McCarrey 1993, Yoshida vd 2006, Philips BT vd 2010).

Spermatojenik soy gelişimi her canlıda farklı sayıda evreden oluşan belli bir düzene sahip komplike bir süreçtir(Clermont 1972). Farelerde spermatojenik döngü seminifer epitelin 12 evresinden oluşurken, sıçanlarda 14 ve insanlarda 12 evreden oluşmaktadır (Oakberg 1956a,b, Leblond ve Clermont 1952a,b, Muciaccia B., 2013). Her bir evre farklı tipteki birçok spermatogonya, spermatozoid ve spermatid kombinasyonunun senkronize olarak ilerlediği bir spermatojenik süreç ile karakterizedir.



**Şekil 51** Fare spermatogenez ve seminifer epitel döngüsü. (Hess RA ve Renato de Franca L. 2008)

Fare seminifer epitel döngüsü evreleri (Hess RA ve Renato de Franca L., 2008),

I. Evre: Yuvarlak ve uzamış spermatidlerden mevcuttur. Yuvarlak spermatidlerin nükleusleri izleyen evredekilere kıyasla daha küçüktür ve büyük merkezi yerleşimli nükleoluslara sahiptirler. Aynı zamanda Golgileri de küçüktür ve PAS+ granular materyalleri yoktur.

II. Evre: Yuvarlak spermatidlerin nukleuslarına tutunmuş Golgi aparatlarında küçük PAS+ proakrozomal granüller görülmektedir.

III. Evre: Yuvarlak spermatidlerin nukleusuna girinti yapmış şekilde büyük yuvarlak bir Golgi vezikülünde bir akrozomik granül görünür.

IV. Evre: Akrozomik granül yassılaşılmaya başlar.

V. Evre: Akrozomik sistem net bir şekilde görünür haldedir. Akrozomik granül, PAS+ koyu çizgisinde uzanarak vezikül tarafından çevrelenmiş yuvarlak spermatid nukleusunu örten kesin bir hat oluşturmaktadır. Bazal membran boyunca B tip spermatogonyalar çıkmaya başlar.

VI. Evre: Akrozomik sistem yayılmaya başlar, fakat hala kalındır ve granüller hala net olarak ayırt edilebilmektedir. Bu evrede B tip spermatogonyalar mitozu girerek preleptoten spermatositleri oluştururlar. Uzamış spermatidler lümene doğru göçe başlamaktadır.

VII. Evre: Akrozomik sistem akrozom boyunca yayılır, incilir ve sentral akrozomik granülün akrozomik vezikül üzerinde çıkıntı oluşturmalarını sağlar. Uzamış spermatidler lümene yakın köşelerde lokalize olmuştur, fakat sitoplazması sperm baş kısmını ve yaklaşık kuyruğun yarısını örter haldedir.

VIII. Evre: Akrozom yassılaştırmış ve yuvarlak spermatid nukleusunun neredeyse yarısını örter hale gelmiştir. Spermatid nukleuslarının birçoğu sitoplazmik plasmalemmaya göç etmiş ve akrozomik sistem bazal membrana yönelmiş olabilir. Spermatidlerin fazlalık sitoplazmaları 16. evre spermatidlerin baş kısımları altında büyük koyu kitleler ile geniş sitoplazmik loblar halinde şekillenirken, uzamış spermatidler spermiyasyon adı verilen bir süreç ile lümene salıverilirler.

IX. Evre: IX-XII evreleri arasında yuvarlaktan uzamış spermatidlere değişen sadece bir spermatid jenerasyonu bulunmaktadır. 9. Evre spermatidleri nukleusları enine kesitlerde oblong halde, merkezden tepeye kadar ve nukleusun kaudal bölgesine kadar uzanan ince PAS+ (periyodik asit shift +) akrozomik sistem ile uzamaya başlamış halde görülür.

X. Evre: Spermatid baş formu keskin hatlarla belirgin bir çıkıntı oluşturmuş haldedir. Sadece çıkıntının ventral kısmı PAS+ akrozom ile kaplıyken dorsali tamamen nukleusu kaudal yüzeyi ile kaplıdır. Pakiten spermatosit nukleusları diploten öncesi ulaşabilecekleri maksimum ölçülerdedir.

XI. Evre: 11. Evre spermatid nukleusları iyice incelmış daha fazla uzamış ve daha yoğun boyanır haldedir. Diploten spermatosit nukleusları oldukça genişleyip nuklear zarlarını kaybederek mayoz 1 in diyakinez safhasına hazır hale gelmişlerdir.

XII. Evre: Bu evrede en karakteristik özellik mayotik ve sekonder spermatositlerin olmayışıdır. 12. Evre spermatidlerinin nukleusları çok incelmıştır ve en kaudal bölgeleri haricinde yoğun koyu boyanırlar. PAS+ akrozomik sistem kanat şeklinde apikal çıkıntının ventral ve dorsalini örter.

Çalışmamızda uyguladığımız Johson skorlaması bu seminifer epitel evrelerine göre yapılmıştır. Johnson skorları açısından her sıçanın sol testisinden alınan enine kesitlerde yuvarlak seminifer tübüller değerlendirilmiştir. Kontrol ve sham grupları arasında fark gözlenmezken SVKS, SVUS, BVKS, BVUS gruplarının kontrol ve sham grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı oldukları fakat kendi aralarında anlamlı istatistiksel bir farka sahip olmadıkları sonucuna ulaşılmıştır. Literatürdeki bulguları destekler nitelikte olan bulgularımız ışığında varikoselin seminifer epitel gelişimini olumsuz yönde etkilediğini ve ileri evre spermatogonyal hücrelerin miktarını azalttığını söyleyebiliriz.

Spermatogonya seminifer tübül bazal membranında bulunan primitif diploid eşey hücreleridir. Nüklear morfolojilerine göre üç tip spermatogonya tarif edilmiştir (Roosen-Runge ve Giesel, 1950, Clermont ve Leblond 1953, Monesi 1962, Philips BT vd 2010). A tipi spermatogonya spermatogonyal hücrelerin ilk oluşan tipi olarak tarif edilir çünkü diğer tüm farklılaşmamış hücreler gibi nukleuslarında heterokromatin bölgeden yoksundurlar. Ara spermatogonyalarda az miktarda heterokromatin bölgeye rastlanırken, B tipi spermatogonyada büyük oranda heterokromatin bölge mevcuttur. Seminifer tübül boyuna kesitinde farklılaşmamış tip A spermatogonyum seminifer tübül bazal membranındaki topografik dizinimi ile farklılık gösteren üç temel alt grupta incelenebilir,  $A_{\text{tekil}} (A_t)(A_{\text{single}})$ ,  $A_{\text{eşli}} (A_e)(A_{\text{paired}})$  ve  $A_{\text{hizalı}} (A_h)(A_{\text{aligned}})$  spermatogonya.  $A_t$  spermatogonya bölünerek  $A_e$  spermatogonyumu oluşturur.  $A_e$  spermatogonya ya sitokinezini tamamlayarak iki yeni  $A_t$  spermatogonya oluşturur ya da intraselüler sitoplazmik köprü ile bağlı kalmaya devam ederek bir dörtlü zincir  $A_h$  spermatogonyumu verir. Daha sonraki bölünmeler ile  $A_h$  spermatogonyum 8,16 ve bazen 32 hücreli zincirler oluşturabilir. 4-16 hücre zincirli  $A_h$  spermatogonya genellikle farklılaşma sürecine başlangıç olarak nitelendirilir. Böylelikle  $A_t$  ve en azından bazı  $A_e$  spermatogonya kök hücre havuzunda sayılabilmektedir (Huckins 1971, Oakberg 1971, Yoshida vd 2007, Morimoto vd 2009, Philips BT vd 2010).



$A_t$  modeline alternatif olarak  $A0/A1$  ve  $A_{koyu}$  ( $A_{dark}$ ) ve  $A_{soluk}$  ( $A_{pale}$ ) SKH kendini yenileme sistemleri de tanımlanmıştır (Clermont ve Leblond, 1959, Clermont ve Buston-Obregon, 1968, Dym ve Clermont 1970, Clermont ve Antar, 1973, Clermont ve Hermo 1975, Philips BT vd 2010).  $A0/A1$  modeli ve  $A_{koyu/soluk}$  modeli birbirine oldukça benzerdir. Özetle,  $A0$  spermatogonya tekil ve eşli halde seminifer epitelin her evresinde görünmektedir. Mitotik ifade bu hücrelerde nadiren görülür bu yüzden bunlar spermatogeneze katılan hücreler olarak değil de kök hücre kaynağı olan hücreler olarak tanımlanır. Bu depo kök hücreler sadece spermatogenezin herhangi bir toksik saldırı ile tahribinde aktive olurlar. Aktive olan kök hücreler  $A1-A4$  spermatogonyaları oluşturur.  $A4$  spermatogonya bölündüğünde ya yeni  $A1$  spermatogonyayı oluşturularak kendini yenileyebilir ya da ara spermatogonyaları oluşturularak değişim evresine geçebilirler.  $A_t$  ve  $A0/A1$  modeli esasları hakkında tartışmalar hala devam ediyor olsa da birçok araştırmacı tarafından en çok tercih edilen sistem  $A_t$  modelidir.

Kemirgen testisinde gözlemlenen  $A_{koyu/soluk}$  ve B tipi spermatogonya insan testislerinde de tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarla  $A_{koyu}$  spermatogonya geri dönüşümlü (reverse) kök hücreler olarak tanımlanırken,  $A_{soluk}$  spermatogonya değişen (renewing) kök hücreler olarak tanımlanmıştır (Clermont, 1963, 1966a,b, 1972). Bunun dışında insan SKHleri için diğer bir görüş ise insan SKHlerinin ya  $A_{koyu}$  ya da  $A_{soluk}$  spermatogonyanın bir alt popülasyonu olduğu yönündedir (ehmcke ve Schlatt, 2006).

Çalışmamızda parafin blok immünohistokimyasal analiz ile SKHler de spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, erken spermatid, geç spermatid ve spermatozoa şeklinde ancak morfolojik ayırım yapılabildiğinden ekspresyon düzeyleri spermatogonyumların alt grupları seviyesinde değil ana gruplar seviyesinde kıyaslanmıştır.

SKH'ler, özgün kök hücrelerdir çünkü genetik bilgiyi sonraki nesillere aktaran yetişkin kök hücreleridir. Bilgi aktarımını sağlayabilmeleri için SKHler kendini yenileyip değişime uğrayarak erişkin spermleri verdikleri spermatogenez adı verilen kompleks bir süreçten geçerler. Bu süreç erkek gamet memeli grupları arasında bazı benzerlikler ve farklılıklara sahiptir. Kemirgenlerde spermatogenez postnatal süreçte 5-7 günde başlarken, insanda 13-15 yaşları arasında başlamaktadır. Farelerde spermatogenez 34 gün sürerken insanda 70 günde tamamlanmaktadır (Guo Y vd 2014). Bunlar dışında SKHleri özgün kılan diğer özelliklerini genel olarak şöyle sıralayabiliriz (Guo Y vd 2014),

SKHler yetişkin kök hücreleridir ve genetik materyalin nesilden nesile aktarımını sağlarlar. Böylelikle genom veya gen dizilimi manipülasyonları ile bize doğum defektlerini engelleyebilme şansı sunarlar.

Fare ve insan SKHleri gen transfeksiyonu olmadan pluripotent hale gelip üç embriyonik germ hattına sahip tüm hücre hatlarına dönüşebilen embriyonik kök hücre benzeri hücreler haline gelebilirler (Kanatsu-Shinohara vd 2004a, Seandel vd 2007, Conrad vd 2008, Izadyar vd 2008, Streckfuss-Bomeke vd 2009, Guo Y vd 2014).

SKHler erkek infertilitesi tedavisinde kullanılabilir. Azospermi hastalarında ve kanser hastalarında kemoterapi veya radyoterapi sonrası fertilitenin onarımında kullanılabilirler.

SKHler küçük molekül inhibitörleri kullanılarak erkek kontraseptifleri geliştirilmesinde yeni bir yöntem haline gelebilir.

SKHler kök hücrelerin kendini yenilemesi ve diğer hücrelere dönüşmesinin altında yatan moleküler mekanizmanın anlaşılması açısından mükemmel bir model teşkil etmektedir.

Geçmişte yapılan araştırmalar ışığında fare SKH'lerin yüzey fenotipi  $\alpha 6$ -Integrin (CD49f)<sup>+</sup>,  $\beta 1$ -Integrin (CD29)<sup>+</sup>, THY-1 (CD90)<sup>+</sup>, CD9<sup>+</sup>,GFRa1<sup>+</sup>, CDH1<sup>+</sup>,  $\alpha v$ -Integrin (CD51)<sup>-</sup>, c-KIT(CD117)<sup>-</sup>, major histocompatibility complex class I(MHC-I)<sup>-</sup>, CD452 proteinlerini içermektedir (Shinohara vd 1999, 2000, Kubota vd 2003, Kanatsu-Shinohara vd 2004, Buageaw vd 2005, Fujita vd 2005, Hofmann vd 2005, Lo vd 2005, Tokuda vd 2007, Philips BT vd 2010). Pozitif ve negatif belirteçler kombine halde kullanılarak SKH'leri belirlemek az da olsa mümkünmüş gibi görünse de bu belirteçlerin veya kombinasyonlarının hiçbiri doğrudan saf SKH popülasyonuna özgül değildir(Oatley JM, 2008, Ning L, 2012, Guo Y vd 2014).

Kemirgenlerle yapılan araştırmalar ışığında SKHler ile ilgili çok daha fazla veriye ulaşmak mümkünken insan testis dokusunda çalışmalar etik problemler doğurduğundan ve insan kaynaklı materyallere ulaşmak zor olduğundan insanda biyokimyasal belirteçlerle çalışmak kısıtlı kalmaktadır. Bu sebeple yapılan çalışmalar ortak belirteçler kullanılarak sürdürülmektedir. İnsan ve kemirgen SKH fenotiplerinden birtakım farklılıklar olsa da paylaştıkları ortak belirteçler de mevcuttur. Kemirgen ve insan SKHleri fenotipinde yer alan ikisinin de ekspere ettiği bazı proteinler GPR125, ITGA6(CD49f), PLZF, UCHL I, GFRA I, ve THY I dir(He vd 2010, Guo Y vd 2014).

Guo Y ve ark. (2014)'nın yayınlamış olduğu değerlendirmede insan ve fare SKH'lerinde pozitif veya negatif ifadeleri saptanan bazı yüzey proteinleri aşağıdaki tablo resminde (Şekil 51) yer almaktadır.

Shinohara ve arkadaşlarının 1999 yılında yayınlamış olduğu bulgular ışığında SKH'ler özgül olarak laminin kaplı tabaklara tutunmaktadır. SKH'lerin çoğaltılabilmesi için yüzey molekülü olarak kullanılan laminin bağlı hücreler  $\beta 1$  integrin ile zenginleştirilmiştir (Shinohara vd 1999, Philips BT vd 2010). Literatürdeki bulgular testis fraksiyonlarında  $\beta 1$  integrin ve  $\alpha 6$  integrin eksprese edildiğini fakat  $\alpha 6$  integrin ve c-Kit reseptör kinaz için negatif olduklarını göstermektedir (Shinohara vd 1999, 2000, Philips BT vd 2010).

Yaptığımız çalışma SKH'leri saptamada Sox3, PLZF, Thy1, VASA, c-Kit, DAZL ve Stro-

Markers	mouse	human	Refs.
b1-integrin (CD29)	+	+	Lim et al. (2010), Schaller et al. (1993), Shinohara et al. (1999)
CD9	+	+	Kanatsu-Shinohara et al. (2004b), Zohni et al. (2012)
CD133	?	+	Conrad et al. (2008)
CDH1	+	?	Tokuda et al. (2007)
CHEK2	?	+	Bartkova et al. (2001)
ID4	+	?	Oatley et al. (2011)
GPR125	+	+	Dym et al. (2009), Seandel et al. (2007)
GFRA1	+	+	Conrad et al. (2008), Meng et al. (2000)
ITGA6 (CD49f)	+	+	Conrad et al. (2008), Shinohara et al. (1999)
KIT	+	-/+	Rajpert-De Meyts et al. (2003), Yoshinaga et al. (1991)
LIN28	+	+	Aeckerle et al. (2012), Zheng et al. (2009)
MEAGA4	?	+	Rajpert-De Meyts et al. (2003)
Nanog	+	+	zadyar et al. (2011), Kuijk et al. (2010), Liu et al. (2012), Suzuki et al. (2009)
NANOS2	+	-	Jorgensen et al. (2012), Lolicato et al. (2008), Sada et al. (2009)
NANOS3	+	?	Jorgensen et al. (2012), Lolicato et al. (2008), Sada et al. (2009)
Neurogenin3	+	?	Yoshida et al. (2004)
OCT-4 (POU5F1)	+	-/+	Liu et al. (2012), Looijenga et al. (2003), Ohbo et al. (2003)
PLZF (ZBTB16)	+	+	Buaas et al. (2004), He et al. (2010)
RET	+	+	Izadyar et al. (2011), Naughton et al. (2006)
SALL4	+	+	Eildermann et al. (2012), Gassei and Orwig (2013)
SOHLH1 and SOHLH2	-	?	Ballow et al. (2006), Suzuki et al. (2012)
SOX3	+	+	Chen et al. (2009), Raverot et al. (2005)
SSEA4	?	+	Izadyar et al. (2011)
STRA8	+	?	Giuli et al. (2002)
THY1 (CD90)	+	+	Conrad et al. (2008), Kubota et al. (2003)

**Tablo 5** İnsan ve fare SKH'lerinde pozitif veya negatif ifadeleri saptanan bazı yüzey proteinleri (Guo Y vd 2014)

1 belirteçleri kullanılmıştır. Stro-1 hariç bu belirteçlerin bazıları SKHlerin farklı evrelerinde eksprese olurken bazıları SKHler ve sonrasında uzamış spermatidlere kadar tüm evrelerde eksprese olmaktadır. Stro-1 fibroblast benzeri hücreler ve mezeneşimal kök hücrelerde ekspresyonu literatürdeki çalışmalarla gösterilmiş olsa da SKHlerde ekspresyonuna dair henüz bir bilgi bulunmamaktadır(Lin G vd 2011). Bunun

dışında perivasküler alanda ve vasküler endotelde Stro 1<sup>+</sup> ifadesine rastlanmıştır (Rolf HJ vd 2008, Ning H vd 2011). Çalışmamızda Stro 1 negatif belirteç olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda stro-1 reaksiyonu tüm gruplarda negatif izlenmiştir.

### 5.1 C-Kit Ekspresyonu

C-Kit bir tirozin kinaz reseptörüdür ve aynı zamanda bir proto-onkogen olan c-Kit, fare W(white spotting locus) lokusunda ifade edilmektedir (Manova K. vd 1990, 1991, 1993, Yoshinaga K, vd 1991, Schrans-Stassen, B. vd 1999, Shinora vd 2000, Robinson, L. vd 2001, Gkountela vd 2013) . Bu genin mutasyonu germ hücrelerinin, bazı hemapoetik hücrelerin ve melanositlerin yok olmasına sebep olmuştur. İn situ hibridizasyon analizi ile farklı yaşlardaki fare testislerinin 6. gün ve sonrasında spermatogonyada c-Kit ekspresyonları incelenmiştir. Elde edilen bulgular ışığında c-Kit ekspresyon periodunun tip A spermatogonya, tip B spermatogonya ve preleptoten spermatositlere kadar olduğu saptanmıştır. Leyding hücreleri tüm semifer epitel evrelerinde pozitifdir (Manova K. vd 1990).

Manova ve arkadaşlarının (1991) daha sonraki çalışmalarında, eşey hücrelerinin 7.5 günlük embriyoda ilk ortaya çıkışlarında düşük miktarda c-Kit ekspresyonu gösterdiklerini ve erken proliferasyon safhası ve gonadlara göçlerine kadar bu durumu sürdürdüklerini söylemektedir. Göç sırasında çevre dokularında c-Kit eksprese ettikleri bulgularında yer almaktadır (Manova K. vd 1991).

Yapılan bir diğer çalışmada ise C-kit in gametogenezdeki rolünü saptamak amacıyla postnatal evrede dişi ve erkek eşey hücrelerinde anti-c-kit monoklonal antikoru (ACK2) kullanılmıştır. ACK2 c-Kit in antagonistik engelleyicisidir. Yapılan immünohistokimyasal analizler sonucunda ACK2nin intravenöz enjeksiyonu sonrası 24-36 saat aralığında farklılaşmış tip spermatogonyalarının tamamen yok olurken farklılaşmamış A tipi spermatogonyaların bu durumdan etkilenmediği sonucuna varılmıştır. ACK2 gonositlerin veya primitif tip A spermatogonyanın mitozunu etkilemezken farklılaşan tip A spermatogonyumların mitozunu engellemiştir. Kısaca farklılaşmış tip spermatogonyanın hayatta kalması veya proliferere olması c-Kit bağımlıdır (Yoshinaga, K. vd 1991).

C-Kit ve ligandı Kit-ligand (KL), primordiyal eşey hücrelerinin yanı sıra eşey hücrelerinin postnatal gelişimi için de gerekmektedir. KL ekspresyonunun yoğunluğunu tübüllerdeki spermatojenik hücre sayısı artışıyla azalmaktadır (Manova K. vd 1993). Schrans-Stassen, B. ekibi (1999), vitamin A eksikliği(VAD-Vitamin A deficiency) olan fare modeli



ile yapılan çalışmasında, farklılaşmış ve farklılaşmamış tip A spermatogonyanın mRNA ve protein ekspresyonlarına bakmıştır. VI, VII, IX/X ve XII. epitelyal evredeki immün pozitif tip A spermatogonyal hücrelerin c-Kit ekspresyonu ile farklılaşmış tip A spermatogonyadaki ekspresyonu arası korelasyonu araştırmıştır. Elde edilen sonuçlara göre farklılaşmamış tip A spermatogonya az miktarda c-Kit mRNA'sı eksprese ederken, daha büyük nükleuslu tip A spermatogonyalarda c-Kit proteini ekspresyonu gözlenmiştir. Bu hücrelerin A1 spermatogonyalara indüksiyonunun ardından c-Kit mRNA ekspresyonu artmıştır. C-Kit ekspresyona eden tip A spermatogonya yüzdesi bu süreçte değişmemiştir. Bu çalışmadan yola çıkarak c-Kit için tip A spermatogonyaların farklılaşma belirteci olarak kullanılabilmesi sonucuna varılmaktadır (Schrans-Stassen, B. vd 1999).

Yapılan bir diğer çalışmada çoklu parametre seçim stratejisi kullanarak in vitro floresan-aktif hücre ayırma (FACS) tekniği ile in vivo kriptorşid testis modelinde alfa6-integrin yüzey molekülü ve c-Kit reseptörlerinin ekspresyonlarını araştırmıştır. Yetişkin kriptorşid erkek testisi SKH'lerinin ya çok az miktarda c-Kit ekspresyonu ya da hiç ekspresyonun olmadığı sonucuna varılmıştır (Shinora vd 2000).

Robinson, L ve arkadaşları (2001) gebelik periyodunun 13-21. haftalarında insan fetal ovaryum ve testislerinde, c-kit mRNA ve protein ekspresyonları araştırmıştır. Testislerde mitotik olarak aktif gonositlerde C-kit mRNA ekspresyonu, reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu(RT-PZR) tekniği kullanılarak saptanmıştır. C-kit protein ekspresyonu ise immunositokimyasal tespitler kullanılarak gösterilmiş ve immünblotting tekniği ile desteklenmiştir. C-kit hücre membranında lokalize olduğu görülmüştür. Bu durum, c-kit mRNA ve protein ekspresyonunun, insan fetal gonatlarında eşey hücrelerinin hayatta kalması ve proliferasyonunda önemli role sahip olduğunu göstermektedir (Robinson, L. vd 2001).

Çalışmamızda BVKS, SVKS ve SVUS gruplarında, spermatogonyum, spermatozoid serisi ve sertoli hücrelerinde zayıfken, bazı tübüllerde gec evre spermatidlerde yoğun ekspresyon izlendi. Genel anlamda c-Kit ekspresyonu BVUS grubu hariç diğer deney gruplarında azaldığı görülmüştür. BVUS grubunun kontrolle aynı boyanma paternine sahip olması oldukça ilginçti. C-kit, erişkin spermde kapasitasyon sırasında ve/veya akrozom reaksiyonu sırasında da salınmaktadır (Feng, H. L., vd 2005). Na/K ATPaz'ın inhibisyonu anormal şekilde in vitro ortamda ve testiste sperm kapasitasyonunu başlatmaktadır (Newton, L. D vd 2010). Yüksek testis sıcaklığı Na/K ATPaz salınımını azaltmasına sebep olmaktadır (Thundathil, J. C. vd 2012). Bu bilgilerden yola çıkarak testis kesitlerinde c-kit pozitif erişkin spermilerin anormal spermatogenez sonucu erken kapasitasyon kazanmış olan anormal yapıdaki spermiler olabileceği düşünülmektedir.

## 5.2 DAZL Ekspresyonu

DAZL (Deleted in Azospermia-Like) geni RNA ilişkili, spermatogenezi etkileyen Y kromozomu DAZ geninin 17. Kromozom üzerinde tek kopya halinde bulunan otozomal homoloğudur (Cooke vd 1996, Sexena vd 1996, Niedeberger, C. vd 1997, Ruggiu, M. vd 1997, Lifschitz-Mercer, B. vd 2002, Teng, Y. vd 2002, Becherini, L. vd 2004, Kuo, P.L., vd 2004, Maratou, K. vd 2004, Fox, M. vd 2005, Reynolds, N. vd 2005, Yu, Z. vd 2009).

DAZ geninin Y kromozomunun uzun kolu üzerinde bulunan azospermik faktor (AZF) bölgesinde çoklu kopyalarına rastlanmıştır(Reijo vd 1995, Saxena vd 1996). Azospermi vakalarında yapılan araştırmalarda ortak bulgu olarak Yq delesyonuna ve AZF bölgesi eksikliğine rastlanılmıştır (Tiepolo ve Zuffardi 1976, Ma, K. vd 1992, Kobayashi vd 1994, Najmabadi vd 1996, Vogt vd 1996).

DAZL1 geni Y kromozomunda lokalize olmuş DAZ geninin insan 3. kromozomundaki otozomal homoloğudur. DAZL1 proteini ekspresyonu, bazı intratubuler seminomalarda olduğu gibi, tüm tanımlanamamış intratubuler eşey hücreleri neoplazi tiplerinde de dağılmış hücre gruplarında gözlenmiştir (Lifschitz-Mercer, B, 2002).

DAZL geni ekzon içeren genomik DNA segmentlerinin tek zincir konformasyon polimorfizmi analizi ile 160 Tayvan'lı infertil erkek hasta üzerinde inceleme yapılmış ve şiddetli oligozoospermi ve nonobstruktif azospermi gözlenmiştir. A-G tranzisyonu ile DAZL gen dizisinde mutasyon oluşturulmuş ve Thr54-Ala değişimi (T54A) sağlanmıştır. Heterozigot T54A polimorfizmi, hypospermatogenezden, gelişim baskılanmasına ve Sertoli cell only sendromuna kadar çeşitli fenotipler sergilemektedir. DAZ geni delesyonu ve T54A polimorfizmi birlikte fenotipi daha da kötüleştirmektedir. Bu durum otozomal DAZL geninin insan spermatogenezindeki rolünü gösteren güçlü bir kanıttır (Teng, Y. N. vd 2002, Kuo, P. L. vd 2004).

DAZL eşey hücre farklılaşmasını kontrol eden kilit gen görevindedir ve DAZL'in ektopik ekspresyonu fare embriyonik kök hücrelerinin in vitro ortamda gametlere farklılaşmasını yönlendirmektedir (Yu, Z., 2009).

Çalışmamızda DAZL ekspresyonunun sham grubunda kontrole kıyasla azaldığı görülürken diğer tüm deney gruplarında tamamen ortadan kalktığı görülmüştür. Bu durum DAZL ekspresyonunda, varikozel patogenezi ile birlikte deneysel varikozel oluşturma işleminden kaynaklanan stresin de etkili olduğunu göstermektedir.

### 5.3 PLZF Ekspresyonu

PLZF (Promyelocytic leukaemia zinc finger) proteini ilk olarak akut promiyelositik lösemi vakasında Zfp145 gen bölgesinde tanımlanmıştır. Krüppel-benzeri çinko parmak protein ailesinin bir üyesidir (Chen vd 1993, Chowdhury vd 1987).

Hücre döngüsünün kontrolünü, uzuvların gelişimini, miyeloid hücrelerin farklılaşmasını ve spermatogenezi kapsayan birçok olayda transkripsiyonel represör protein olduğu literatürde yer almaktadır (Fahnenstich, J. vd 2003, Buaas, F. W. vd 2004, Costoya, J. A. vd 2004, Filipponi, D. vd 2007, Petrie, K. vd 2008, Savage, A. K. vd 2008, Grisanti, L. vd 2009, Cheung, M. vd 2010, Ching, Y. vd 2010, Odumade, O. A. vd 2010, Wiebe, M. S. vd 2010, Peppi, M. vd 2011, Seidel, K. vd 2011).

Buaas FW vd (2004) çalışmalarında faredeki mutant luksoidin eşey hücre hattında kendini yenileme sürecini etkilediğini göstermişlerdir. Luksoid mutant fareler farklılaşmamış hücrelerin epigenetik evresini regule eden transkripsiyonel PLZF represörünü kodlayan gene bölgesinde anlamsız bir mutasyon içerir ve bu PLZFnin farklılaşmamış spermatogonyada Oct4 ile koeksprese olduğunu göstermektedir.

Costoya JA vd (2004) çalışmalarında PLZF transkripsiyonel represörünü kodlayan Zfp145 eksikliğinde farelerin yaşla ilerleyen spermatogonyaya kaybı, apoptozda artış ve tubul yapısında bozulma olduğunu saptamış ve PLZFnin spermatogonyaya özgül bir transkripsiyon faktörü olduğu ve kök hücre havzunun varlığını sürdürmesi, kendini yenileyebilmesi için gerekli olduğu sonucuna varmışlardır.

PLZF doğrudan kit geninin transkripsiyonunu baskılaması spermatogonyaya farklılaşmasında karakterizedir. Plzf hem endojen kit ekspresyonunu hem de kit promotör bölgesinin kontrolündeki reportör genin ekspresyonunu baskılar. Kit promotöründeki Plzf-aracılı kit transkripsiyon baskılanması için gerekli 3 baz çiftlik ayrı bir gen dizisindeki mutasyonun in vivo ve in vitro ortamda PLZF bağımlılığı gösterilmiş ve kit promotörünün PLZF baskılanmasındaki yanıtını ortadan kaldırdığı bulgusuna ulaşılmıştır. Bu durum PLZFnin SKH havuzunu devam ettirebilmesi, doğrudan kit ekspresyonunun baskılanması ile ilişkilidir düşüncesini ortaya çıkarmıştır (Filipponi, D. vd 2007).

Testiste PLZF ekspresyonu At, Ae ve Ah farklılaşmamış spermatogonyalarla sınırlıdır (Costoya vd 2004). PLZF nin hematopoetik prekürsör hücrelerdeki rolüne benzer şekilde spermatogonyalardaki rolüde farklılaşmamış evrenin sürdürülebilmesidir (Reid vd 1995, Filipponi vd 2007).

Literatürdeki çalışmaların aksine çalışmamızda PLZF ekspresyonu kontrol grubunda çok zayıf izlenirken özellikle BVUS ve SVUS gruplarında spermatogonyumlarda ve primer spermatozoidlerde PLZF ekspresyonunun kuvvetli olduğu gözlemlendi. Kontrol grubuna kıyasla PLZF ekspresyonunun sham grubunda ortadan kalktığı görülmüştür. Bu durum PLZF ekspresyonunda, varikozel patogenezi ile birlikte deneysel varikozel oluşturma işleminden kaynaklanan stresin de etkili olduğunu göstermektedir.

#### 5.4 Sox-3 Ekspresyonu

Sox3 geni SRY ilişkili HMG-Box (SOX) ailesine dahil bir transkripsiyon faktörüdür. Hipotalamo-hipofizer aks formasyonunda, pronöral proteinlerin aktivitesini önleyerek nöral hücre farklılaşmamış halde tutup, nöral farklılaşmayı baskılanmasında, farenjiyal epitelde kraniofasial morfogenezde olmak üzere birçok role sahiptir. Granuloza hücrelerinin yanısıra daha çok prekürsor Sertoli hücrelerini gelişiminde etkili olarak erkek eşey karakterin belirlenmesinde önemli role sahiptir (Laudet, V. vd 1993, Kuhlbrodt, K. vd 1998, Osaki, E vd 1999, Sasai, Y. 2001, Bylund, M vd 2003, Raverot, G. vd 2005, Moalem, S. vd 2012, Abdelalim, E. M vd 2014, Takehana, Y. vd 2014).

Geçmişte yapılan knock-out çalışma modelleri ile Sox3'ün erken evre eşey hücrelerinin (At, Ae, Ah spermatogonya) farklılaşmasında rol aldığını göstermiştir. Devamında ise Ngn3 ekspresyonunun SOX3 bağımlı olduğu ve SOX3 ün doğrudan veya dolaylı olarak Ngn3ü etkileyerek spermatogonyal farklılaşmayı regule ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Raverot, G. vd 2005).

Bizim çalışmamızda kontrol grubunda spermatogonyumlarda ve bazı primer spermatozoidlerde yoğun nükleer eksprese olan sox3 proteini kısa süreli varikozel gruplarında ekspresyonunun çok aza indiği gözlemlendi. Bu durum varikozeldeki spermatogonyal defektlerin, sox 3 proteininin down regülasyonu sonucu spermatogonyal farklılaşma regülasyonundaki bozulmadan kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Bu gruplarda ilginç olarak bazı tübüllerde geç tipte spermatidlerin yoğun boyanması dikkat çekiciydi çünkü literatürde sox 3 ün spermatidlerdeki ekspresyonuna dair bir bulguya rastlanılmamıştır. Diğer bir ilginç bulgu ise BVUS grubunda spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatozoidler ve erken evre spermatidlerde pozitif reaksiyon izlenirken SVUS grubunda sadece spermatogonyumlarda zayıftan orta dereceye doğru bir boyanma izlenmesiydi.



## 5.5 Thy-1 Ekspresyonu

Thy-1 (Thymocyte differentiation antigen 1) ya da CD90 (Cluster of Differentiation 90) ilk olarak timik antijen olarak keşfedilmiştir. Çeşitli kök hücrelerde belirteç olarak kullanıldığı gibi, erişkin nöronların aksonal gelişiminde de role sahiptir. Ekspere oldukları hücreler türlere göre çeşitlilik gösterse de genellikle timositler ve protimositler, nöronlar, mezenşimal kök hücreler, hematopoetik kök hücreler, NK hücreleri, T lenfositler, yüksek endotelial venüller endoteli, renal glomerüller mezenşimal hücreler, sirküle metastazik melanoma hücreleri, foliküler dendritik hücreler, bir kısım fibroblast ve miyofibroblastlar olmak üzere birçok hücrede ekspresyona sahiptirler (Reif, A. E. ve J. M. V. Allen 1964, Ades, E. W. vd 1980, McKenzie, J. L. ve J. W. Fabre 1981, Kemshead, J. T vd 1982, Pont, S. 1987, Kubota, H. vd 2003, Wu, J. vd 2013, Valli, H. vd 2014, Zheng, Y. 2014).

Kubota vd (2003) SKHlerin fenotipik karakterlerini saptamak için yaptığı çalışmasında kriptorşid fare testisinin MHC-1<sup>-</sup>Thy-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>-</sup> hücre fraksiyonunda oldukça zengin kök hücre aktivitesine rastlanmıştır. MHC-1<sup>-</sup>Thy-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>-</sup> SKHlerinin antijenik fenotipini ise α6-integrin<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>, α6-integrin<sup>-</sup>Sca1<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup> olarak saptamışlardır. Thy-1 bir erkek üreme hattı kök hücreleri (male germline stem cell-mGSCs) belirteçidir. Kubota vd (2003)'nin elde ettiği bulgulara göre SKHlerde Thy-1 ekspresyonu farklılaşmamış A<sub>t</sub>, A<sub>e</sub>, A<sub>n</sub> spermatogonyalarla sınırlı kalmaktadır.

Wu, J. vd (2013)'nin keçi testisi üzerinde yaptıkları çalışmada Thy-1 pozitif ve negatif hücrelerin Thy1, CD49f, Plzf, Oct4, Gfra1 ve Vasa transkripsiyonları ve ekspresyonlarını kıyaslamıştır ve Thy-1 pozitif hücrelerde daha yüksek olduklarını bulmuşlardır. Ayrıca Thy-1 pozitif hücrelerin üreme hattı kök hücresi özelliklerini sürdürdüklerini, negatif hücrelerden daha hızlı yetiştiklerini ve içerdikleri alkalın fosfataz pozitif hücre yüzdesinin Thy-1 pozitif erkek üreme hattı kök hücrelerinde negatiflere oranla daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızda yukarıda bahsedilen çalışmalara paralel olarak spermatogonyumlarda kuvvetli nükleer pozitif reaksiyon izledik. Kontrol grubundan alınan kesitlerde ekspresyonun primer spermatositlerde de devam ettiğini gözlemledik. Thy-1 ekspresyonunun kısa süreli varikozel gruplarında azaldığı uzun süreli gruplarda ise kontrol grubuna benzer şekilde ekspresyonun yeniden arttığı izlendi. Bu grupta sox-3 ve c-kit ekspresyonuna benzer şekilde bazı tübüllerde geç evre spermatidlerin pozitif boyandığı gözlemlendi.

## 5.6 VASA Ekspresyonu

Castrillon, D.H. vd (2000) çalışmalarında Northern blot analizi ile fetal ve yetişkin dokularında insan Vasa geninin ekspresyonunu ovaryum ve testislerle sınırlı olduğundan somatik dokularda saptanamadığından söz etmişlerdir. VASA proteini sitoplazmik proteindir ve gelişimin çeşitli evrelerinde, gonadal kabartıda göç etmekte olan primordiyal kök hücrelerde VASA ekspresyonu gösterilmiştir.

Fare VASA homolog (MHV-Mouse VASA Hololog) geni ile yapılan lokalizasyon çalışmalarında embriyonik gonadlara kolonizasyonundan hemen sonra primordiyal eşey hücrelerinde ve gametojenik sürece giren hücrelerde post-mayotik evreye kadar hem erkek hem de dişi ekspresyonu gösterilmiştir (Toyooka, Y. vd 2000).

VASA ile yapılan literatür çalışmaları VASA geninin gonadal gelişimin farklı evrelerinde ve SKSlerden yuvarlak spermatidler dahil uzamış spermatidlere kadar tüm spermatojenik seri hücrelerinde ( $A_t$ ,  $A_e$ ,  $A_h$ , A1-4, Ara, B tipi spermatogonyalar, spermatozitler, yuvarlak spermatidler) eksprese olduğunu göstermektedir (Fujiwara, Y vd 1994, Castrillon, D. H. vd 2000, Tanaka, S. S. vd 2000, Toyooka, Y. vd 2000, Zeeman, A.-M. vd 2002, Ando, M. 2012, Gkountela, S. vd 2013, Rzepkowska, M. ve T. Ostaszewska 2014).

Çalışmamızda VASA ekspresyonu literatüre paralel bir patern izlemiştir. BVKS, SVKS ve SVUS grubunda ekspresyon oldukça azalmıştır. BVUS grubunda ise VASA ekspresyonunda kontrole kıyasla bir değişim gözlenmemiştir.

## 6. SONUÇLAR

Varikozel C-kit, DAZL, PLZF, Sox-3, Thy-1 ve VASA ekspresyonuna etki etmektedir. Kısa süreli varikozel gruplarında c-kit ekspresyonu spermatogonyum ve primer spermatositlerde çok azalırken spermatid grubunda pozitifleşti. Genel olarak c-Kit ekspresyonu SVKS, SVUS ve BVKS gruplarında azalırken BVUS grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. C- Kit ile birlikte Thy-1, Sox-3, VASA ekspresyonlarında da kontrol grubuna kıyasla kısa süreli gruplarda azalırken ilginç olarak uzun süreli gruplarda kontrol grubuna benzer şekilde tekrar ekspresyon kazandıkları görülmüştür. Ayrıca bu 4 belirteçte sham grubunda ve kısa süreli gruplarda ilginç olarak geç tipte spermatidlerde de boyanma gözlendi. DAZL ekspresyonu kontrol grubunda spermatogonyumlarda zayıf izlenirken hem uzun süreli hem kısa süreli varikozel gruplarında izlenmedi. PLZF kontrol grubunda spermatogonyumlarda negatif ekspresyonun uzun süreli gruplarda pozitif döndüğü görülmüştür. Negatif belirteç olarak kullanılan stro-1 ekspresyonu tüm gruplarda negatif izlenmiştir.

Johnson skorları, seminifer epitel kalınlıkları ve seminifer tübül alanları açısından SVKS, SVUS, BVKS ve BVUS gruplarının ortalama değerleri, kontrol ve sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıkmıştır.

## 7. KAYNAKLAR

Abdelalim EM, Emara MM and Kolatkar PR. "The SOX transcription factors as key players in pluripotent stem cells." ***Stem Cells Devn*** 2014; 23(22): 2687-2699.

Ades EW, Zwerner RK, Acton RT and Balch AM. "Isolation and partial characterization of the human homologue of Thy-1." ***The Journal of Experimental Medicine*** 1980; 151(2): 400-406.

Agarwal S. Vascular morphology in testes of infertile males with varicocele. ***Indian J Med Res*** 1991; 94: 228-231.

Aggar P and Johnsen SG. Quantitative evaluation of testicular biopsies in varicoceles. ***Fertil Steril***1978; 29: 52-57.

Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N et al. Phlebography in varicocele scroti (Abstract). ***Acta Radiol Diag*** 1966; 4: 517-528.

Ahlberg NE, Bartley O. Right and left gonadal veins: Anatomical and statistical study. ***Acta Radiol Diag***.1966; 4: 596-601.

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: 490-493.

Akcar N, Turgut N, Adapinar B, Ozkan IR. Intratesticular arterial resistance and testicular volume in infertile men with subclinical varicocele. ***J Clin Ultrasound***.2004; 32: 389-393

Alukal JP, Zurakowski D, Atala A, et al. Testicular hypotrophy does not correlate with grade of adolescent varicocele. ***J Urol***. 2005; 174:2367-2370.

Ando, M, Yamaguchi, K. Chiba, H. Miyake and M. Fujisawa. "Expression of VASA mRNA in testis as a significant predictor of sperm recovery by microdissection testicular sperm extraction in patient with nonobstructive azoospermia." ***J Androl*** 2012; 33(4): 711-716.

Arıncı K. and Ellah A. Anatomi. Ankara, ***Güneş Kitabevi Ltd. Şti***. 1995.

Barqawi A, Caruso A et al. "Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat." ***J Urol*** 171(1): 2004 ; 501-503.

Becherini L, Guarducci E, Degl'Innocenti S, Rotondi M, Forti G and Krausz C. "DAZL polymorphisms and susceptibility to spermatogenic failure: an example of remarkable ethnic differences." ***Int J Androl*** 2004; 27(6): 375-381.

Beck EM, Schlegel PN, Goldstein M. Intraoperative varicocele anatomy: A macroscopic and microscopic study. ***J Urol*** 1992; 148:1190-1195.

Bendel-Stenzel M, Anderson R, Heasman J & Wylie C. The origin and migration of primordial germ cells in the mouse. ***Semin. Cell Dev. Biol.*** 1998; 9, 393–400.

Braedel HU, Steffens J, Ziegler M et al. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. ***J Urol*** 151: 1994; 62-66.



Buaas FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG and Braun RE. "Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal." **Nat Genet** 2004; 36(6): 647-652.

Buageaw A, Sukhwani M, Ben-Yehudah A, Ehmcke J, Rawe VY, Pholpramool C, Orwig KE & Schlatt S. GDNF family receptor alpha1 phenotype of spermatogonialstem cells in immature mouse testes. **Biol. Reprod.** 2005; 73, 1011–1016. (doi:10.1095/biolreprod.105.043810).

Bylund M, Andersson E, Novitsch BG and Muhr J. "Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity." **Nat Neurosci** 6(11): 2003; 1162-1168.

Cameron DF, Snyder FE. The blood-testis barrier in men with varicocele: a Lanthanum tracer study. **Fertil Steril** 1980; 34: 255-258.

Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C and Crum CP. "The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage." **Proc Natl Acad Sci U S A** 97(17):2000; 9585-9590.

Chang IY, Kim JH, Park KH and Yoon SP. "Experimental varicocele induces p53-dependent germ cell apoptosis through activation of gamma-H2AX." **Urol Int** 85(2): 2010; 216-220.

Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S and Zelent A. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor- $\alpha$  locus due to a variant t(11,17)translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. **EMBO J.**1993; 12,1161-1167.

Cheng CY and Mruk DD. "The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception." **Pharmacological Reviews** 2012; 64(1): 16-64.

Cheung M, Pei J, Pei Y, Jhanwar SC, Pass HI and Testa JR. "The promyelocytic leukemia zinc-finger gene, PLZF, is frequently downregulated in malignant mesothelioma cells and contributes to cell survival." **Oncogene**2010; 29(11): 1633-1640.

Ching Y, Wilson L. and Schimenti J. "An allele separating skeletal patterning and spermatogonial renewal functions of PLZF." **BMC Developmental Biology** 2010; 10(1): 1-9.

Chowdhury K, Deutsch U and Gruss PA. Multigene family encoding several 'finger' structures is present and differentially active in mammalian genomes. **Cell**,1987 ; 48, 771-778.

Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. **Am J Anat** 1963; 112:35–51.

Clermont Y. Renewal of spermatogonia in man. **Am J Anat** 1966a; 118:509–524.

Clermont Y. Spermatogenesis in man. A study of the spermatogonial population. **Fertil Steril** 1966b; 17:705–721.

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: Seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiol Rev** 1972; 52:198–236.

Clermont Y & Antar M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey, *Macaca arctoides*. **Am. J. Anat.** 1973; 136,153–165. (doi:10.1002/aja.1001360204).

Clermont Y & Bustos-Obregon E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted 'in toto'. **Am. J. Anat.** 1968; 122,237–247. (doi:10.1002/aja.1001220205).

Clermont Y & Hermo L. Spermatogonial stem cells in the albino rat. **Am. J. Anat.** 1975; 142, 159–175. (doi:10.1002/aja.1001420203).

Clermont Y & Leblond CP. Renewal of spermatogonia in the rat. **Am. J. Anat.** 1953; 93, 475–501. (doi:10.1002/aja.1000930308).

Clermont Y & Leblond CP. Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*. **Am. J. Anat.** 104, 1959; 237–273. (doi:10.1002/aja.1001040204).

Clermont Y & Perey B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **Am. J. Anat.** 1957; 100, 241–267. (doi:10.1002/aja.1001000205).

Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiol. Rev.** 1972; 52, 198–236.

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.

Comhaire F, Vermeulen A. Varicocele sterility: cortisol and catecholamines. **Fertil Steril** 1974; 25: 88-95

Cooke HJ, Lee M, Kerr S and Ruggiu M. "A Murine Homologue of the Human Daz Gene Is Autosomal and Expressed only in Male and Female Gonads." **Human Molecular Genetics** 1996; 5(4): 513-516.

Coolsaet BLRA. The varicocele syndrome: venography determining the optimal level for surgical management. **J Urol** 1980; 124: 833-926.

Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ and Pandolfi PP. "Essential role of Plzf in maintenance of spermatogonial stem cells." **Nat Genet** 2004; 36(6): 653-659.

Çam HK. Varikosel patogenezinde serbest oksijen radikalleri ve apoptozisin rolünün rat modelinde araştırılması ve E vitaminin koruyucu etkileri. Uzmanlık tezi. **Marmara U. Tıp Fak. Üroloji**. 1988.

Çayan S, Akbay E, Bozlu M, Doruk E, Yıldız A, Acar D, Kanık EA, Ulusoy E. Diagnosis of pediatric varicoceles by physical examination and ultrasonography and measurement of testicular volume: using the prader orchidometer versus ultrasonography. **Urol Int** 2002; 69(4): 293-296.

Çayan S, Kadioğlu A, Orhan I, Kandıralı E, Tefekli A, Tellaloglu S: The effect of microsurgical varicocelectomy on serum follicle stimulating hormone, testosterone and free testosterone levels in infertile men with varicocele. **BJU Int** 1999; 84(9): 1046-1049.

Çayan S, Kadioğlu A. Varikoselin Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. **Türk Üroloji Dergisi** 2005; 31 (1): 57-63.

Dahl HV, Hendrick JF. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. **Surg Gynecol Obstet** 1959; 108: 697-705.

De Stefani S, Silingardi V et al. "Experimental varicocele in the rat: early evaluation of the nitric oxide levels and histological alterations in the testicular tissue." **Andrologia** 2005; 37(4): 115-118.

Delilbasi L, Ed. In vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri. Ankara, **Güneş Tıp Kitabevleri**.2008.

Doğan F. Deneysel Sıçan Varikosel Modelinde Varikoselin Oluşturduğu Testiküler Hasar Üzerine Diosminhesperidinin Etkileri Uzmanlık tezi, **Süleyman Demirel Üniversitesi**.2011.

Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and the results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. **Fertil Steril** 1970, 21: 606.

Dym M & Clermont Y. Role of spermatogonia in therepair of the seminiferous epithelium following xirradiationof the rat testis. **Am. J. Anat.**1070; 128, 265–282.(doi:10.1002/aja.1001280302).

Ehmcke J, Schlatt S. A revised model for spermatogonial expansion in man: Lessonsfrom non-human primates. **Reproduction** 2006; 132:673–680.

Etriby A, Girgis SM, Hefnawy H et al. Testicular changes in subfertile males with varicoceles. **Fertil Steril** 1967; 18: 666-671.

Fahnenstich J, Nandy A, Milde-Langosch K, Schneider-Merck T, Walther N and Gellersen B. "Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) is a glucocorticoid- and progesterone-induced transcription factor in human endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells." **Mol Hum Reprod** 2003; 9(10): 611-623.

Feng HL, Sandlow JI and Zheng LJ. "C-kit receptor and its possible function in human spermatozoa." **Mol Reprod Dev** 2005; 70(1): 103-110).

Filipponi D, Hobbs RM, Ottolenghi S, Rossi P, Jannini EA, Pandolfi PP and Dolci S. "Repression of kit expression by Plzf in germ cells." **Mol Cell Biol** 2007; 27(19): 6770-6781.

Fox M, Urano J and Reijo Pera RA. "Identification and characterization of RNA sequences to which human PUMILIO-2 (PUM2) and deleted in Azoospermia-like (DAZL) bind." **Genomics** 2005; 85(1): 92-105.

Francis XS, Mark FB. Varicocele. Abnormalities of the Testes and Scrotum and their Surgical. **Campbell's Urology**. 1998 (Walsh P C, Retik A B, Vaughan E D, Wein A J, editors), Philadelphia, W.B. Saunders Company.

Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K et al. Biochemical changes in testicular varicocele. **Arch Androl** 1989; 22: 149-159.

Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O. Desoxyribonucleic acid polymerase activity in the testis of the infertile man with varicocele. **Fertil Steril** 1988; 50: 795-800.

Fujita K, Ohta H, Tsujimura A, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Matsumiya K, Wakayama T & Okuyama A. Transplantation of spermatogonialstem cells isolated from leukemic mice restores fertilitywithout inducing leukemia. **J. Clin. Invest.** 2005; 115, 1855–1861. (doi:10.1172/JCI24189).

Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Sato M, Fujimoto M, Furusawa M and Noce T. "Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of Drosophila

vasa and its specific expression in germ cell lineage." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91(25): 12258-12262.

Ginsburg M, Snow MH & McLaren A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 1990; 110, 521–528.

Gkountela S, Li Z, Vincent JJ, Zhang KX, Chen A, Pellegrini M and Clark AT. "The ontogeny of cKIT+ human primordial germ cells proves to be a resource for human germ line reprogramming, imprint erasure and in vitro differentiation." *Nat Cell Biol* 2013; 15(1): 113-122.

Grasso LF, Pepe P, Panella P et al. Volocimetric evaluation of spermatic vessels with echo color Doppler in patients with idiopathic varicocele. *Minerva Urol Nefrol* 1997; 49: 179-182.

Green KF, Turner TT et al. "Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair." *J Urol* 1984; 131(6): 1208-1211.

Grillo-Lopea AJ. Primary right varicocele. *J Urol* 1979;105:540-544.

Grisanti L, Falciatori I, Grasso M, Dovere L, Fera S, Muciaccia B, Fuso A, Berno V, Boitani C, Stefanini M and Vicini E. "Identification of spermatogonial stem cell subsets by morphological analysis and prospective isolation." *Stem Cells* 2009; 27(12): 3043-3052.

Guo Y, Hai Y, Gong Y, Li Z, He Z. Characterization, isolation, and culture of mouse and human spermatogonial stem cells. *J Cell Physiol*. 2014;229(4):407-13.

Hans 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.

He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod* 2010; 82:363–372.

Hess RA, Renato de Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. *Adv Exp Med Biol*. 2008;636:1-15.

Hofmann MC, Braydich-Stolle L & Dym M. Isolation of male germ-line stem cells, influence of GDNF. *Dev. Biol*. 2005; 279, 114–124. (doi:10.1016/j.ydbio.2004.12.006).

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.

Huckins C. The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. *Anat. Rec.* 1971; 169, 533–557. (doi:10.1002/ar.1091690306).

Hudson RW, Crawford VA, McKay DE. The gonadotropin response of men with varicoceles to a four-hour infusion of gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 1981; 36: 633-637.

Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr*. 1999; 61: 393-399.

Ito H, Fuse H, Minagawa H, Kawamura K, Murakami M, Shimazaki J. Internal Spermatic Vein Prostaglandins in Varicocele Patients. *Fertil Steril*. 1982; 37: 218-221



Jarrow JP and Sanzone JJ. Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol* 1992; 148: 1805-1807.

Jefferson KP, Persad RA, Holly MP. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol* 2000; 86: 598-606.

Kadioğlu A, Köksal T. Skrotum ve kapsamı hastalıkları. Temel Üroloji. (Anafarta K, Göğüs O, Arıkan N, Bedük Y, Editörler). *Güneş Kitabevi*, Ankara: 1998; 949-960.

Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S & Shinohara T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 2004; 70, 70–75. (doi:10.1095/biolreprod.103.020867).

Kantartzi PD, Goulis Ch D et al. "Male infertility and varicocele: myths and reality." *Hippokratia* 2007; 11(3): 99-104.

Kanter M, Aktas C and Erboğa M. "Heat stress decreases testicular germ cell proliferation and increases apoptosis in short term: an immunohistochemical and ultrastructural study." *Toxicology and Industrial Health* 2013; 29(2): 99-113.

Kass EJ, Stork BR, Steinert BW. Varicocele in adolescence induces left and right testicular volume loss. *BJU Int.* 2001; 87: 499-501.

Kemshead JT, Ritter MA, Cotmore SF and Greaves MF. "Human Thy-1: expression on the cell surface of neuronal and glial cells." *Brain Res* 1982; 236(2): 451-461.

Kendirici 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; 427-439.

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.

Kluin PM & de Rooij DG. A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Int. J. Androl.* 1981; 4, 475–493. (doi:10.1111/j.1365-2605.1981.tb00732.x).

Kobayashi K, Mizuno K, Hida A, Komaki R, Tomita K, Matsushita, Namiki M, et al PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1965-1967.

Kohler FP. On the etiology of varicocele. *J Urol* 1967; 97: 741-742.

Ku JH, Son H, Kwak C, et al. Impact of varicocele on testicular volume in young men: significance of compensatory hypertrophy of contralateral testis. *J Urol.* 2002; 168:1541-1544.

Kubota H, Avarbock MR and Brinster RL. "Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(11): 6487-6492.

Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I and Wegner M. "Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells." *J Neurosci* 1998; 18(1): 237-250.

Kumagai A, Kodama H, Kumagai J. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(2):118-23.

Kuo PL, Wang ST, Lin YM, Lin YH, Teng YN and Hsu CC. "Expression profiles of the DAZ gene family in human testis with and without spermatogenic failure." **Fertil Steril** 81(4): 2004; 1034-1040.

Laudet V, Stehelin D and Clevers H. "Ancestry and diversity of the HMG box superfamily." **Nucleic Acids Res** 1993; 21(10): 2493-2501.

Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP & Hogan BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. **Genes Dev.** 1999; 13, 424–436. (doi:10.1101/gad.13.4.424)

Leblond CP & Clermont Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfuric acid technique. **Am. J. Anat.** 1952a; 90,167–215. (doi:10.1002/aja.1000900202).

Leblond CP & Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann.N.Y. Acad. Sci.** 1952b; 55, 548–573. (doi:10.1111/j.1749-6632.1952.tb26576.x).

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.

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.

Lifschitz-Mercer B, Elliott DJ, Issakov J, Leider-Trejo L, Schreiber L, Misonzhnik F, Eisenthal A and Maymo BB. "Localization of a specific germ cell marker, DAZL1, in testicular germ cell neoplasias." **Virchows Arch** 2002; 440(4): 387-391.

Lin G, Liu G, Banie L, Wang G, Ning H, Lue TF, et al. Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. **Stem Cells Dev.** 2011; 20(10):1747-52.

Lipschultz LI, Corriere JN. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. **J Urol** 1977; 117:175-180.

Lo KC, Brugh VM, Parker M & Lamb DJ. Isolation and enrichment of murine spermatogonial stem cells using rhodamine 123 mitochondrial dye. **Biol. Reprod.** 2005; 72, 767–771. (doi:10.1095/biolreprod.104.033464).

Lund L, Hahn-Pedersen J, Hljihus J. Varicocele testis evaluated by CT scanning. **Scand J Urol Nephrol** 1997; 31(2): 179-182.

Lund L, Nielsen KT. Varicocele, testis and testicular temperature. **Br J Urol** 1996; 78: 113-115.

Ma K, Sharkey A, Kirsch S, Vogt P, Keil R, Hargreave TB, McBeath S, vd Towards the molecular localisation of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. **Hum Mol Genet** 1992; 1:29-33.

Manova K and Bachvarova RF. "Expression of c-kit encoded at the W locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblasts." **Dev Biol** 1991; 146(2): 312-324.

Manova K, Huang EJ, Angeles M, De Leon V, Sanchez S, Pronovost SM, Besmer P and Bachvarova RF. "The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice

supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia." *Dev Biol* 1993; 157(1): 85-99.

Manova K, Nocka K, Besmer P and Bachvarova RF. "Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse." *Development* 1990; 110(4): 1057-1069.

Maratou K, Forster T, Costa Y, Taggart M, Speed RM, Ireland J, Teague P, Roy D and Cooke HJ. "Expression profiling of the developing testis in wild-type and Dazl knockout mice." *Mol Reprod Dev* 2004; 67(1): 26-54.

Marmar JL. "The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information." *Hum Reprod Update* 2001; 7(5): 461-472.

McCarrey J. Development of the germ cell. In Cell and molecular biology of the testis (eds C. Desjardins & L. Ewing), pp. New York: *Oxford University Press* 1993; 58–89.

McKenzie JL and Fabre JW. "Human thy-1: unusual localization and possible functional significance in lymphoid tissues." *J Immunol* 1981; 126(3): 843-850.

McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev. Biol.* 2003; 262, 1–15. (doi:10.1016/S0012-1606(03)00214-8).

McLean DJ. "Spermatogonial stem cell transplantation, testicular function, and restoration of male fertility in mice." *Methods Mol Biol* 2008; 450: 149-162.

Moalem S, Babul-Hirji R, Stavropolous DJ, Wherrett D, Bagli DJ, Thomas P and Chitayat D. "XX male sex reversal with genital abnormalities associated with a de novo SOX3 gene duplication." *Am J Med Genet A* 2012; 158a(7): 1759-1764.

Monesi V. Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J. Cell Biol.* 1962; 14, 1–18. (doi:10.1083/jcb.14.1.1).

Moore KL and Persaud TVN. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology, *Saunders Elsevier*. 2008.

Morimoto H, Kanatsu-Shinohara M, Takashima S, Chuma S, Nakatsuji N, Takehashi M & Shinohara T. Phenotypic plasticity of mouse spermatogonial stem cells. *PLoS One* 2009; 4, e7909. (doi:10.1371/journal.pone.0007909).

Moro E, Marin P et al. "Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele." *Mol Cell Endocrinol* 2000; 161(1-2): 67-71.

Muciaccia B, Boitani C, Berloco BP, Nudo F, Spadetta G, Stefanini M, et al. Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. *Biol Reprod.* 2013; 89(3): 60.

Nagler HM, Luntz RK, Martinis FG: Varicocele. *St. Louis. Mosby Year Book* 1997; 336–359.

Najmabadi H, Huang V, Yen P, Subbarao MN, Bhasin D, Banaag L, Naseeruddin S, et al. Substantial prevalence of Microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 84: 1347-1352.

Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Varicocele and male infertility: Part II. *Hum Rep Update* 2001; 7(5): 473-481.

Newton LD, Krishnakumar S, Menon AG, Kastelic JP, van der Hoorn FA and Thundathil JC. "Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase regulates sperm capacitation through a mechanism involving kinases and redistribution of its testis-specific isoform." *Mol Reprod Dev* 2010; 77(2): 136-148.

Niederberger C, Agulnik AI, Cho Y, Lamb D and Bishop CE. "In situ hybridization shows that Dazla expression in mouse testis is restricted to premeiotic stages IV-VI of spermatogenesis." *Mamm Genome* 1997; 8(4): 277-278.

Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Behre HM. Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod* 1998; 13(8):2147-50.

Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011; 413(2):353-7.

Ning L, Goossens E, Geens M, Saen DV, Tournaye H. Spermatogonial stem cells as a source for regenerative medicine. *Middle East Fertility Society Journal*. 2012; 17(1):1-7.

Nishiyama H, Danno S, Kaneko Y, Itoh K, Yokoi H, Fukumoto M, Okuno H, Millan JL, Matsuda T, Yoshida O and Fujita J. "Decreased expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in male germ cells at elevated temperature." *Am J Pathol* 1998; 152(1): 289-296.

Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am. J. Anat.* 1956a; 99,391–413. (doi:10.1002/aja.1000990303).

Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am. J. Anat.* 1956b; 99, 507–516. (doi:10.1002/aja.1000990307).

Oakberg EF. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anat. Rec.*1971; 169, 515–531. (doi:10.1002/ar.1091690305).

Oatley JM, Brinster RL. Regulation of Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in Mammals. *Annual review of cell and developmental biology*. 2008;24:263-86.

Odumade OA, Weinreich MA, Jameson SC and Hogquist KA. "Krüppel-Like Factor 2 Regulates Trafficking and Homeostasis of  $\gamma\delta$  T Cells." *The Journal of Immunology* 2010; 184(11): 6060-6066.

Oğuz I. Varikozel oluşturulan ratlarda germ hücre apoptozisini önleyici bir alternatif medikal tedavi etkinliğinin immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemlerle araştırılması [Uzmanlık Tezi]. Mersin: *Mersin Üniversitesi*, 2007.

Oktar T, Ahmedov İ, Kadioğlu A. Varikozel tedavisi: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi (Editörler: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B ve ark.). *Türk Androloji Derneği yayını*, İstanbul, 2004; 463-472.

Onur R, Semercioz A, Orhan I, Yekeler H. The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urol Res* 2004; 32: 204-8.

Osaki E, Nishina Y, Inazawa J, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ohsugi M, Tezuka T, Yoshida M and Semba K. "Identification of a novel Sry-related gene and its germ cell-specific expression." *Nucleic Acids Res* 1999; 27(12): 2503-2510.



Paduch DA, Skoog SJ. Current management of adolescent varicocele. *Rev Urol* 2001; 3(3): 120-133.

Peppi M, Kujawa SG and Sewell WF. "A corticosteroid-responsive transcription factor, promyelocytic leukemia zinc finger protein, mediates protection of the cochlea from acoustic trauma." *J Neurosci* 2011; 31(2): 735-741.

Petrie K, Guidez F, Zhu J, Howell L, Owen G, Chew YP, Parks S, Waxman S, Licht J, Mittnacht S and Zelent A. "Retinoblastoma protein and the leukemia-associated PLZF transcription factor interact to repress target gene promoters." *Oncogene* 2008; 27(39): 5260-5266.

Pinto KJ, Kroovand Jarow JP. Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. *J Urol* 1994;152(2 Pt 2):788-90.

Pont S. "Thy-1: a lymphoid cell subset marker capable of delivering an activation signal to mouse T lymphocytes." *Biochimie* 1987; 69(4): 315-320.

Raifer J. Varicocele. Congenital anomalies of the scrotum and testis. CAMPBELL'S UROLOGY. (Walsh P C, Retik A B, Vaughan E D, Wein A J, editors), Philadelphia, **W.B. Saunders Company**,1998; 2186-2195.

Rajeev K and Rupin S. "Varicocele and male infertility : current status." *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India* 2005; 55(6): 505-516.

Rajfer J, Turner TT, Rivera F. Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. *Biol Reprod* 1987; Abstract 36: 933-937.

Raverot G, Weiss J, Park SY, Hurley L and Jameson JL. "Sox3 expression in undifferentiated spermatogonia is required for the progression of spermatogenesis." *Dev Biol* 2005; 283(1): 215-225.

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.

Reif AE and Allen JMV. "The AKR Thymic Antigen and Its Distribution in Leukemias and Nervous Tissues." *The Journal of Experimental Medicine* 1964; 120(3): 413-433.

Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC Severe oligozoospermia resulting from deletions of the Azoospermia Factor gene on the Y chromosome. *Lancet* 1996; 347:1290-1293.

Reynolds N and Cooke HJ. "Role of the DAZ genes in male fertility." *Reprod Biomed Online* 2005; 10(1): 72-80.

Robinson LL, Gaskell TL, Saunders PT and Anderson RA. "Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad." *Mol Hum Reprod* 2001; 7(9): 845-852.

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.

Rolf HJ, Kierdorf U, Kierdorf H, Schulz J, Seymour N, Schliephake H, et al. Localization and Characterization of STRO-1(+) Cells in the Deer Pedicle and Regenerating Antler. *PLoS One*. 2008; 3(4):e2064.

Roosen-Runge EC & Giesel Jr LO. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am. J. Anat.* 1950; 87, 1–30. (doi:10.1002/aja.1000870102).

Ross MH and Pawlina W. *HISTOLOGY: A Text and Atlas 6/E*, Lippincott **Williams & Wilkins/Wolters Kluwer Health, Inc.** 2014.

Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J and Cooke HJ. "The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis." *Nature* 1997; 389(6646): 73-77.

Rzepkowska M and Ostaszewska T. "Proliferating cell nuclear antigen and Vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon." *Reviews in Aquaculture* 2014; 6(2): 75-88.

Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. Baltimore, Maryland 21202, USA, **Williams & Wilkins Company**. 1995.

Salama N, Bergh A Damber JE. The changes in testicular vascular permeability during progression of the experimental varicocele. *Eur Urol* 2003; 43: 84-91.

Salisz JA, Kass EJ, Steinert BW. The significance of elevated scrotal temperature in an adolescent with a varicocele. *Adv Exp Med Biol* 1991; 286: 245-251.

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.

Sasai Y. "Roles of Sox factors in neural determination: conserved signaling in evolution?" *Int J Dev Biol* 2001; 45(1): 321-326.

Savage AK, Constantinides MG, Han J, Picard D, Martin E, Li B, Lantz O and Bendelac A. "The transcription factor PLZF directs the effector program of the NKT cell lineage." *Immunity* 2008; 29(3): 391-403.

Saxena R, Brown LG, Hawkins T, Alagappan RK, Skaletsky H, Reeve MP, Reijo R, et al. Origins of the DAZ gene cluster on human Y chromosome: an autosomal gene was transposed, then repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* 1996; 14:292-299.

Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED, Jr. Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 1981;68(1):39-45.

Saypol DC. Varicocele. *J Androl.* 1981; 2: 61-67.

Schiff I, Wilson E, Newton R et al. Serum luteinizing hormone, folliclestimulating hormone and testosterone responses to gonadotrophin-releasing factor in males with varicoceles. *Fertil Steril* 1976; 27: 1059-1061.

Schrans-Stassen BH, van de Kant HJ, de Rooij DG and van Pelt AM. "Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia." *Endocrinology* 1999; 140(12): 5894-5900.

Seidel K, Kirsch S, Lucht K, Zaade D, Reinemund J, Schmitz J, Klare S, Li Y, Schefe JH, Schmerbach K, Goldin-Lang P, Zollmann FS, Thone-Reineke C, Unger T and Funke-Kaiser H. "The promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) protein exerts neuroprotective effects in neuronal cells and is dysregulated in experimental stroke." *Brain Pathol* 2011; 21(1): 31-43.

Shafik A, Mofteh A, Olfat S, Mohi-el-Din M, el-Sayed A. Testicular veins: anatomy and role in varicocelegenesis and other pathologic conditions. **Urology** 1990;35(2):175-82.

Shafik A, Wali MA, Abdel Azis YE et al. Experimental model of varicocele. **Eur Urol** 1989; 16: 298-303.

Shafik A. Venous tension patterns in cord veins II after varicocele correction. **J Urol** 1983; 129: 749-751.

Sharpe RM. Intratesticular factors controlling testicular function. **Biol Reprod** 1984; 30(1): 29-49.

Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. beta1- and alpha6-integrin are surfacemarkers on mouse spermatogonial stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:5504–5509.

Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR & Brinster RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparametersselection of mouse testis cells. **Proc. NatlAcad. Sci. USA** 2000; 97, 8346–8351. (doi:10.1073/pnas.97.15.8346).

Shiraishi K, Matsuyama H et al. "Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology." **International Journal of Urology** 2012; 19(6): 538-550.

Sigman M, Howards SS. Male Infertility. "Campbell's Urology. (Walsh P C, Retik A B, Vaughan E D, Wein A J, editors), Philadelphia, **W.B. Saunders Company**, 1, 43, 1998; 1287-1330.

Simsek F, Türkeri L, Cevik İ, Kamuran B, Akdas A. Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. **Arch Esp Urol**.1998; 51: 947-950.

Singh SR, Burnicka-Turek O et al. "Spermatogonial stem cells, infertility and testicular cancer." **J Cell Mol Med** 2011; 15(3): 468-483.

Snell RS. **Clinical Anatomy**. Washington.1995.

Sofitikis N, Takahashi C, Kadowaki H, et al. Surgical repair vs medical treatment of varicocele in the rat: Pharmacological manuplation of the varicocele testicle. **Eur Urol** 1992; 22: 44-52.

Steen O, Koumans J, De Moor P7. Adrenal cortical hormones in the spermatic vein of 95 patients with left varicocele. **Andrology** 1976; 8: 101-104

Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C et al. Microvascular pressure distribution in the hamster testis. **Am J Physiol** 1991; 260: 1581-1589.

Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, Suster ML, Kawakami K, Shin IT, Kohara Y, Kuroki Y, Toyoda A, Fujiyama A, Hamaguchi S, Sakaizumi M and Naruse K. "Co-option of Sox3 as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*." **Nat Commun** 2014;5: 4157.

Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama and Noce T. "The mouse homolog of Drosophila Vasa is required for the development of male germ cells." **Genes Dev** 2000; 14(7): 841-853.

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.

Tegelenbosch RA & de Rooij DG. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat. Res.* 1993; 290, 193–200.

Teng YN, Lin YM, Lin YH, Tsao SY, Hsu CC, Lin SJ, Tsai WC and Kuo PL. "Association of a single-nucleotide polymorphism of the deleted-in-azoospermia-like gene with susceptibility to spermatogenic failure." *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(11): 5258-5264.

Thomas JC, Elder JS. Testicular growth arrest and adolescent varicocele: does varicocele size make a difference. *J Urol.* 2002; 168:1689-1691.

Thundathil JC, Rajamanickam GD, Kastelic JP and Newton LD. "The effects of increased testicular temperature on testis-specific isoform of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> -ATPase in sperm and its role in spermatogenesis and sperm function." *Reprod Domest Anim 47 Suppl* 2012; 4: 170-177.)

Tiepolo L, Zuffardi O Localization of factor controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34:119-124.

Tohonen V, Ritzen EM, Nordqvist K & Wedell A. Male sex determination and prenatal differentiation of the testis. In *The developing testis*, vol. 5 (ed. O. Soder), pp. 1–23. Basel, Switzerland: *Karger*.2003.

Tokuda M, Kadokawa Y, Kurahashi H & Marunouchi T. CDH1 is a specific marker for undifferentiated spermatogonia in mouse testes. *Biol. Reprod.* 2007; 76, 130–141. (doi:10.1095/biolreprod.106.053181).

Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M and Noce T. "Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development." *Mechanisms of Development* 2000; 93(1–2): 139-149.

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.

Turner TT, 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.

Turner TT. The study of varicocele through the use of animal models. *Hum Rep Update* 2001, 7(1): 78-84.

Valli H, Sukhwani M, Dovey SL, Peters KA, Donohue J, Castro CA, Chu T, Marshall GR and Orwig KE. "Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells." *Fertil Steril* 102(2): 566-580.e567.2014.

Varicocele and male infertility: Part II. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Human Reproduction Update* 2001; 7(5): 473 – 481.

Varikosel Kılavuzu, *Türk Androloji Derneği Yayınları*, 2004; 29-35.

Virgil P, Wohler C, Bustos-Obregon E et al. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* 1994; 26: 55-60.

Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn FM, et al Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. **Hum Mol Genet** 1996; 5:933-943.

WEB\_1. (t.y, 15.11.2014). "Erkek Üreme Sistemi Histolojisi." from <http://www.dicle.edu.tr/Contents/01baef8f-7b2e-4395-afc0-3132c45538c9.pdf>.

WEB\_2 Allen L. B, University of New England College of Osteopathic Medicine sitesi. <http://faculty.une.edu/com/abell/histo/histolab2.htm> (Alındığı tarih: 18.05.2015)

WEB\_3 MedCell@Yale: Male reproductive system photo gallery. [http://medcell.med.yale.edu/image\\_gallery/male\\_reproductive.php](http://medcell.med.yale.edu/image_gallery/male_reproductive.php) (Alındığı tarih: 18.05.2015)

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.

Wiebe MS, Nichols RJ, Molitor TP, Lindgren JK and Traktman P. "Mice deficient in the serine/threonine protein kinase Vrk1 are infertile due to a progressive loss of spermatogonia." **Biol Reprod** 2010; 82(1): 182-193.

Wishahi MM. Detailed anatomy of the internal spermatic vein and the ovarian vein. Human cadaver study and operative spermatic venography: clinical aspects. **J Urol** 1991; 145(4):780-4.

Wright EJ, Young GP, Goldstein M. Reduction in testicular temperature after varicocelelectomy in infertile men. **Urology** 1997; 50: 257-259.

Wu J, Song W, Zhu H, Niu Z, Mu H, Lei A, Yang C, Peng S, Li X, Li G and Hua J. "Enrichment and characterization of Thy1-positive male germline stem cells (mGSCs) from dairy goat (*Capra hircus*) testis using magnetic microbeads." **Theriogenology** 2013; 80(9): 1052-1060.

Yaman Ö, Özdiler E. Varikozel. **Klinik Androloji**. Ankara 2000;537-46

Ying Y, Qi X & Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. **Proc. Natl Acad. Sci. USA** 2001; 98, 7858–7862. (doi:10.1073/pnas.151242798)

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.

Yoshida S, Nabeshima Y & Nakagawa T. Stem cell heterogeneity: actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. **Ann. N.Y. Acad.** 2007; Sci.1120, 47–58. (doi:10.1196/annals.1411.003).

Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T & Nabeshima Y. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. **Development** 2006; 133, 1495–1505. (doi:10.1242/dev.02316).

Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T and Nishikawa S. "Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function." **Development** 1991; 113(2): 689-699.



Yu Z, Ji P, Cao J, Zhu S, Li Y, Zheng L, Chen X and Feng L. "Dazl Promotes Germ Cell Differentiation from Embryonic Stem Cells." *Journal of Molecular Cell Biology* 2009;1(2): 93-103.

Zeeman A.-M, Stoop H, Boter M, Gillis AJM, Castrillon DH, Oosterhuis JW and Looijenga LHJ. "VASA Is a Specific Marker for Both Normal and Malignant Human Germ Cells." *Lab Invest* 2002; 82(2): 159-166.

Zheng Y, He Y, An J, Qin J, Wang Y, Zhang Y, Tian X and Zeng W. "THY1 is a surface marker of porcine gonocytes." *Reprod Fertil Dev* 2014; 26(4): 533-539.

Zini A, Buckspan M, Berardinucci D, et al. Loss of left testicular volume in men with clinical left varicocele: correlation with grade of varicocele. *Androl.* 1998; 41: 37-41.

Zini A, Buckspan M, Berardinucci D, et al. The influence of clinical and subclinical varicocele on testicular volume. *Fertil Steril.* 1997; 68: 671-674.

Zorgniotti AW, MacLeod J. Studies in the temperature, human semen quality and varicocele. *Fertil Steril* 1973; 24: 295-301.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Semih TAN 1987 Nisan ayında Sakarya'da doğmuştur. İlköğretimini Ahmet Akkoç İlköğretim okulunda tamamlayıp, Yabancı Dil Ağırlıklı Atatürk Lisesinde öğrenimine devam etmiştir. 2010 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden Mezun olmuştur. Mezuniyetinin ardından ilk yüksek lisans eğitimine Akdeniz Üniversitesi Biyoloji bölümünde başlayıp, etholoji alanında eğitim almış ve Konrad Lorenz Davranış Enstitüsünde (Viyana) araştırmacı olarak görev almıştır. 2012 Yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programına başlamış, 2014 Ocak ayında Araştırma Görevlisi olarak öğrenimine devam etmiştir.

