

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI



**DENEYSEL VARİKOSEL MODELİ OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
TESTİKÜLER HASAR ÜZERİNE LİPOİK ASİTİN ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sümeyye TUTUK

Danışman

Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN

HATAY – 2019

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**DENEYSEL VARİKOSEL MODELİ OLUŞTURULMUŞ RATLARDA
TESTİKÜLER HASAR ÜZERİNE LİPOİK ASİTİN ETKİLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sümeyye TUTUK

Danışman

Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 16347 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY – 2019

TEŞEKKÜR

Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki yüksek lisans eğitimim boyunca, bana emeği geçen, mesleki deneyim ve tecrübelerini bizlerden esirgemeyen, kendisini örnek almaktan onur duyduğum değerli katkı ve destekleri ile tüm yaşamım boyunca bana yol gösterecek olan, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Abdullah ARPACI'ya, yüksek lisans eğitimimin ilk gününden itibaren bilgi ve deneyimlerinden daima yararlandığım, tez konusu seçiminden basım aşamasına kadar her türlü destek ve emeğini eksik etmeyen, alçak gönüllü, anlayışlı, sabrını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman esirgemeyen, kendisinden yeni bilgiler öğrendikçe zevk aldığım tez danışmanım Doç. Dr. Oğuzhan ÖZCAN'a

Tez çalışmamın deney aşamasında her türlü bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan değerli abim Uz. Suphi BAYRAKTAR'a, tezime değerli katkılarından dolayı Dr. Öğr. Ü. Enver Ahmet DEMİR'e, tezimin her aşamasında yanımda olan ve desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Hatice DOĞAN'a, tez çalışmamın laboratuvar deneyleri aşamasında yanımda olan Nilüfer BİLGİÇ'e, yüksek lisans eğitimim sırasında laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden dolayı birlikte çalıştığım yüksek lisans arkadaşlarıma

Sonsuz Teşekkürler.

Tez çalışmamı destekleyen Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) 'a teşekkür ederim.

Ayrıca hayatım boyunca maddi-manevi desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen her daim onlarla beraber kendimi güçlü hissettiğim, her şeyden önce duruşu olan, insanlara ve doğaya saygı duyan bir insan olarak beni yetiştiren kıymetli annem, babam, abim ve ablalarıma

Tezimin ön çalışması, deneysel aşama ve verilerin istatistiksel analizleri gibi her aşamasında bana katkı sağlayarak her zaman destek olan, seçmiş olduğum bu yolda tüm zorluklara karşın her daim yanımda olan düşüğümde kaldıran, benden çok daha fazla emek veren, en büyük destekçim yol arkadaşım sevgili eşim Arş. Gör. Dr. Okan'a ve tezimin uzamasının sevimli sebebi minik mucizemiz kızım Maysa'ya sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Kabul ve Onay.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
ÇİZELGELER DİZİNİ	X
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
ÖZET	XIV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Varikosel.....	3
2.1.1.Varikosel Epidemiyolojisi ve Klinik Faktörler.....	4
2.1.2. Varikoselin Etiyolojisi.....	5
2.1.3. Varikoselin Patofizyolojisi ve Testiküler Hasar.....	6
2.1.3.1. Skrotal Hipertermi.....	7
2.1.3.2. Renal ve Adrenal Metabolitlerin Reflüsü.....	7
2.1.3.3. Epididimal Cevap.....	7
2.1.3.4. Apoptozis.....	8
2.1.3.5. Hormonal Disfonksiyon.....	8

2.1.3.6. Testiküler Hipoksi.....	8
2.1.3.7. İnfertilite Etkisi.....	9
2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri.....	10
2.2.1. Serbest Radikaller.....	10
2.2.2. Reaktif Oksijen Türleri.....	11
2.2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$).....	11
2.2.2.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2).....	12
2.2.2.3. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$).....	12
2.2.2.4. Nitrik Oksit (NO).....	13
2.2.2.5. Alkoksil (LO^{\cdot}) ve Peroksil (LOO^{\cdot}) Radikalleri.....	13
2.2.2.6. Singlet Oksijen (1O_2).....	13
2.3. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri.....	14
2.3.1. Lipitler Üzerine Etkileri.....	14
2.3.2. Proteinlere Etkileri.....	16
2.3.3. DNA Üzerine Etkisi.....	17
2.4. Oksidatif Stres.....	18
2.4.1. Varikosel ve Oksidatif Stres.....	18
2.4.2. Erkek İnfertilitesinde Oksidatif Stres.....	19
2.5. Testiste Oksidatif Stres.....	19
2.6. Varikosel ve Sitokin Cevabı.....	20
2.6.1. İnterlökin 6 (IL-6).....	21
2.6.2. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α).....	22

2.7. Testosteron.....	22
2.8. Nükleer Faktör Kappa-B (NF- κ B).....	23
2.9. Varikoselde Tanı ve Tedavi.....	24
2.9.1. Varikoselde Tanı.....	24
2.9.2. Varikoselde Tedavi.....	24
2.10. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Antioksidan Savunma Mekanizmaları..	25
2.10.1. Endojen Antioksidanlar.....	25
2.10.1.1.Enzimatik Antioksidanlar.....	25
2.10.1.2. Enzim Yapıda Olmayan Antioksidanlar.....	26
2.10.2. Ekzojen Antioksidanlar.....	27
2.11. Alfa Lipoik Asit.....	27
2.11.1. Alfa Lipoik Asidin Fonksiyonları.....	27
2.11.1.1. Alfa Lipoik Asidin Kofaktör Rolü.....	28
2.11.1.2. Alfa Lipoik Asit ve Antioksidan Rolü.....	28
2.11.1.3. Alfa Lipoik Asit ve Antiinflatuar Etkisi.....	29
2.11.1.4. Alfa Lipoik Asit ve Metallerin Şelatlanması.....	30
2.11.2. Alfa Lipoik Asit ve Klinikte Kullanımı.....	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	31
3.1. Deney Hayvanları Seçimi.....	31
3.2. Deneysel Çalışma Gruplarının Oluşturulması	31
3.3. Varikosel Modelinin Oluşturulması.....	32
3.4. Kan ve Doku Örneklerin Alınması ve Saklanması.....	33

3.4.1. Doku Homojenizasyonu.....	33
3.4.1.1. Fosfat Tamponunun Hazırlanması.....	33
3.4.1.2. Bıçaklı Homojenizatör ile Doku Homojenizasyonu.....	34
3.5. Biyokimyasal Analizler.....	34
3.5.1. Protein Tayini.....	34
3.5.2. Stok Standart ve Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	35
3.5.3. Standart Çözeltilerin Protein Ölçümü.....	35
3.5.4. Örneklerin Protein Ölçümü.....	36
3.5.5. Dokuda Yapılan Analizler.....	36
3.5.5.1. Malondialdehid (MDA) Miktar Tayini.....	36
3.5.5.2. MDA Standart Çözeltilerinin Hazırlanması.....	38
3.5.5.3. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	38
3.5.5.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	39
3.5.6. Serumda Yapılan Analizler.....	41
3.5.6.1. ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Analizleri.....	41
3.5.6.2. ELİSA Analizlerinin Hesaplanması.....	42
3.6. Histopatolojik Yöntem.....	43
3.6.1. Işık Mikroskopik İncelemede Doku Takip Protokolü.....	43
3.6.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	43
3.6.3. Testis Dokusunun Histomorfolojik Değerlendirilmesi.....	44
3.7. İstatistiksel Analiz.....	44
3.7.1. Histopatolojik Değerlendirmelerin İstatistiksel Analizi.....	44

3.7.2. Biyokimyasal Değerlendirmelerin İstatistiksel Analizi.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. BSA ile Hazırlanan Protein Standart Grafiği ve Testis Doku Protein Konsantrasyonları.....	46
4.2. MDA Standart Grafiği, Testis Doku MDA Miktarları ve Grupların Karşılaştırılması.....	47
4.3. Doku GSH-Px Aktiviteleri ve Grupların İkili Karşılaştırılması.....	49
4.4. Doku CAT Aktiviteleri ve Grupların İkili Karşılaştırılması.....	50
4.5. Serum Testosteron Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması.....	51
4.6. Serum NF- κ B Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması.....	52
4.7. Serum TNF- α Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması.....	53
4.8. Serum IL-6 Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması.....	54
4.9. Grupların Doku MDA, CAT, GSH-Px Miktarları ve Grupların İkili Karşılaştırılması	55
4.10. Grupların Serum Testosteron, NF- κ B , TNF- α , IL-6 Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması.....	56
4.11. Histopatolojik İnceleme Bulguları.....	56
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇ.....	65
7. KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Sol Internal Spermatik Ven Anatomisi.....	3
Şekil 2.2. Varikoselin erkek üreme potansiyeli üzerine zararlı etkisi.....	6
Şekil 2.3. Serbest radikallerin oluşum mekanizması ve enzimatik detoksifikasyonu.....	10
Şekil 2.4. Alfa lipoik asitin yapısı.....	27
Şekil 2.5. α LA /DHLA' nın etki mekanizmaları.....	27
Şekil 3.1. Varikosel grubu sol testis ve kontrol grubu sol testis görüntüsü.....	33
Şekil 3.2. BSA ile hazırlanan stok çözeltinin dilüsyonu.....	35
Şekil 3.3. MDA' nın TBA ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleks (TBA-MDA) yapısı.....	36
Şekil 4.1. Bradford Standart Grafiği.....	46
Şekil 4.2. MDA Standart Grafiği.....	47
Şekil 4.3. Grupların doku MDA miktarlarının karşılaştırılması.....	48
Şekil 4.4. Grupların GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması.....	49
Şekil 4.5. Grupların CAT aktivitelerinin karşılaştırılması.....	50
Şekil 4.6. Grupların testosteron düzeylerinin karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.7. Grupların NF- κ B düzeylerinin karşılaştırılması.....	52
Şekil 4.8. Grupların TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması.....	53
Şekil 4.9. Grupların IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.10. Grupların histoloji verilerinin karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.11. Grupların histolojik kesitlerinin karşılaştırılması.....	58

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 4.1. BSA ile hazırlanan stok standart çözeltinin seyreltilmesi.....	46
Çizelge 4.2. Testis dokusunda ölçülen protein miktarları.....	47
Çizelge 4.3. Testis doku MDA miktarları ve grupların ikili karşılaştırılması	48
Çizelge 4.4. Testis doku GSH-Px aktivitesi.....	49
Çizelge 4.5. Testis doku CAT enzim aktivitesi.....	50
Çizelge 4.6. Serum testosteron değerleri ve grupların karşılaştırılması.....	51
Çizelge 4.7. Serum NF- κ B değerleri ve grupların karşılaştırılması.....	52
Çizelge 4.8. Serum TNF- α değerleri ve grupların karşılaştırılması.....	53
Çizelge 4.9. Serum IL-6 değerleri ve grupların karşılaştırılması.....	54
Çizelge 4.10. MDA ve antioksidan enzim miktarları ve gruplar arası karşılaştırma.....	55
Çizelge 4.11. Testosteron, NF- κ B, TNF- α , IL-6 değerleri ve gruplar arası karşılaştırma.....	56
Çizelge 4.12. Histolojik Johnsen skorlama sonuçlarının istatistiksel verileri.....	57

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

·OH: Hidroksil Radikali

¹O₂: Singlet Oksijen

8-okso-dG: 8-hidroksi-2-deoksiguanozin

αLA: Alfa Lipoik Asit

AP: apuridik / apyrimidinik

AP1: Aktivatör Protein 1

BSA: Bovine Serum Albumin

CAT: Katalaz

-CH₂- :Metilen

Cu: Bakır

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

ELİSA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ETZ: Elektron Transfer Zinciri

Fe: Demir

GR: Glutasyon Redüktaz

GSH: Gulutasyon

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

GSSH: Okside Glutasyon

GST: Glutasyon S-Transferaz

H· :Hidrojen Atomu

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HIF1A : Hipoksi-İndüklenebilir Faktör-1A

IFN- γ :İnterferon-gama

IL-1 β :İnterlökin-1 beta

IL-6: İnterlökin-6

IL-8: İnterlökin-8

I κ B: İnhibitör kapaB

iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

İR: İskemi Reperfüzyon

L \cdot : Lipit Radikali

LO \cdot : AlkoksilRadikali

LOO \cdot :Lipit Peroksit Radikali

LOO \cdot : Peroksil Radikali

LPS: Lipopolisakarit

MAPK: Mitojen ile Aktive olan Protein Kinaz

MDA: Malondialdehit

MTX: Metotreksat

NAD⁺ : Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

NO: Nitrik Oksit

NO₂ : Azot Dioksit

NO₂⁺ : Nitronyum İyonu

Nrf2: Nükleer Faktör Eritroid 2-İlişkili Faktör 2

NF-κβ: Nükleer Faktör Kappa-B

O₂⁻: Süperoksit Anyonu

O₂: Moleküler Oksijen

OD: Optik Dansite

ONOO⁻: Peroksinitrit

ONOOH: Peroksinitrit

OS: Oksidatif Stres

PDH: Piruvat Dehidrogenaz

PHGPx: Fosfolipit HidroperoksitGlutatyon Peroksidaz

PUFA: Poliansature Yağ Asidi

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

Se: Selenyum

SOD: Süperoksit Dismutaz

TBA: Tiyobarbitürik Asit

TCA: Trikloroasetikasit

TNF-α: Tümör Nekrozis Faktör alfa

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VKİ: Vücut Kitle İndeksi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

Zn: Çinko

α-KGDH: α-Ketoglutarat Dehidrogenaz

ÖZET

Deneysel Varikosel Modeli Oluşturulmuş Ratlarda Testiküler Hasar Üzerine Lipoik Asitin Etkileri

Varikosel (V), spermatik kordtan gelen venöz pampiniform pleksusun patolojik bir dilatasyonudur. Alfa lipoik asit (α LA) bir serbest radikal temizleyici ve güçlü bir biyolojik antioksidandır. İnsanlarda karaciğer, kalp ve böbreklerde sentezlenir ve hem su hem de yağda çözünebilir olması, hücrel membranlardaki lipid peroksidleri de içeren serbest radikalleri azaltmada, temizlemede ve ayrıca normal antioksidan enzim profilini yeniden kazandırmada oldukça etkilidir. Çalışmamızda deneysel varikosel modeli oluşturularak sıçanlarda lipoik asitin testiküler hasar üzerine koruyucu etkilerini inceledik.

Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan onay alınan bu çalışmada ortalama 300-400 gr ağırlığında Wistar Albino cinsi 40 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 10 adet olacak şekilde 4 farklı gruba rastgele olarak ayrıldı. Grup I (Kontrol), Grup II (Sham), Grup III (V), Grup IV (V+ α LA 100 mg/kg/gün 6 hafta intraperitoneal olarak verildi). Grup III ve IV'ün hayvanlarında fındıkkıran fenomenine uygun olarak deneysel varikosel modeli oluşturuldu.

Doku homojenatlarından malondialdehit (MDA), homojenattan elde ettiğimiz süpernatanlarda ise antioksidan enzimlerden glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (CAT) aktivitelerinin tayini spektrofotometrik olarak yapıldı. Varikosel grubunda MDA düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksekken ($P=0,001$) GSH-Px ve CAT düzeyleri anlamlı derecede düşük bulundu ($P=0,001$). V grubuna kıyasla, V+ α LA grubunda ise MDA düzeyleri anlamlı derecede düşük bulunurken ($P=0,001$) GSH-Px ve CAT düzeylerinin anlamlı derecede arttığı görüldü ($P=0,001$). Serumda testis hasarını gösteren NF- κ B, TNF- α ve IL-6 düzeyleri; hormonal disfonksiyonu belirlemek için testosteron düzeyleri tespit edildi. NF- κ B, TNF- α ve IL-6 düzeylerinin varikosel grubunda kontrole kıyasla anlamlı derecede arttığı (sırasıyla; $P=0,004$ $P=0,001$ $P=0,001$), testosteron seviyelerinin ise azaldığı ($P=0,001$) görüldü, bunun yanısıra tedavi grubunda ise V grubuna kıyasla testosteron düzeylerinin anlamlı derecede arttığı ($P=0,001$); NF- κ B, TNF- α ve IL-6 düzeylerinin ise anlamlı derecede azaldığı (sırasıyla; $P=0,001$ $P=0,001$ $P=0,001$) tespit edildi. Histopatolojik incelemede diğer tüm gruplara kıyasla varikosel grubunda bozulmuş seminifer tübül yapısı ile spermatogenezde tama yakın kayıp tespit edilmiştir. V grubuna kıyasla V+ α LA grubunda ise spermatogenez ve morfolojide düzelme gözlenmiştir.

Sonuç olarak; varikosele bağlı testis hasarında α LA, hem doku hasarını önleyici hem de testosteron düzeylerini iyileştirici etkileri ile bir tedavi seçeneği olarak düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: Varikosel, Lipoik Asit, İnfertilite, Sitokin, Antioksidan Enzim

ABSTRACT

Effects of Lipoic Acid on Testicular Damage in Rats with Experimental Varicocele Model

Varicocele (V) is the pathological dilation of panpiniform venous plexus which drains the testes and epididymides.

Alpha lipoic acid (α LA) is a free radical scavenger and a strong biological antioxidant. It is synthesized in liver, heart and kidneys in human, and owing to it being soluble in both water and lipid, it is highly efficient in reducing and scavenging free radicals such as lipid peroxides in cellular membranes and also, maintaining normal antioxidant enzyme profile. In this study, we investigated protective effects of lipoic acid on the testicular injury by generating an experimental varicocele model in rats.

Forty male Wistar Albino rats weighing 300-400 g were used in this study which has been approved by Mustafa Kemal University Animal Experiments Local Ethics Committee. Rats were randomly divided into 4 diverse groups as each group had 10 animals. Group I (Control), Group II (Sham), Group III (V), Group IV (V+ α LA 100 mg/kg/day, i.p. for 6 weeks). An experimental varicocele model corresponding to the nutcracker phenomena was established in Group III and IV animals.

Malondialdehyde (MDA) in tissue homogenates, and the antioxidant enzymes glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) in supernatants were estimated spectrophotometrically. MDA levels were found to be significantly higher ($P=0,001$) but GSH-Px and CAT levels were lower ($P=0,001$) in the varicocele group than control and sham groups. Compared to the V group, MDA levels were significantly lower ($P=0,001$) whereas GSH-Px and CAT levels were found to be increased ($P=0,001$) in the V+ α LA group. NF- κ B, TNF- α and IL-6 levels were measured in the serum to anticipate the testicular injury and testosterone levels to determine the hormonal dysfunction. NF- κ B, TNF- α and IL-6 levels were significantly increased (respectively; $P=0,004$ $P=0,001$ $P=0,001$) and testosterone levels were decreased ($P=0,001$) in the varicocele group compared to the control group. Besides, as compared to the V group, NF- κ B, TNF- α and IL-6 levels were found to be significantly decreased (respectively; $P=0,001$ $P=0,001$ $P=0,001$) and testosterone levels were increased ($P=0,001$) in the treatment group. A near-total loss of spermatogenesis alongside disturbed seminiferous tubular structure, compared to all other groups, was observed in the varicocele group in histopathological examination. In the V+ α LA group, spermatogenesis and the morphology were found to be improved as compared to the V group.

Conclusively, In the testicular injury due to varicocele, α LA can be considered as a treatment option with both tissue damage prevention and healing effects of testosterone.

Keywords: Varicocele, Lipoic acid, Infertility, Cytokine, Antioxidant enzyme

1. GİRİŞ

Varikosel, spermatik kord içinde pampiniform pleksusun anormal vasküler genişlemesi olarak tanımlanır ve erkeklerde infertilitenin başlıca nedeni olarak düşünülür (Zhang ve ark. 2016). Genel popülasyonda %15 insidansı olan varikoselin, infertil erkeklerde oranı %35'den daha yüksektir (Ning ve ark. 2018). Varikoselin progresif ve zamanla artan testis hasarına yol açtığı bilinmektedir (Missassi ve ark. 2017). Varikosel ilerleyici testis hasarı ile seyrederek testis gelişiminde gerilemeye ve spermatogenezi bozarak infertiliteye neden olmaktadır (Sheehan ve ark. 2014). Bununla birlikte varikosel, erkek infertilitesinin cerrahi olarak en sık düzeltilbilir nedeni olarak düşünülmektedir (Cho ve ark. 2016).

Klinik varikosel tanısı fiziki muayene ile yapılır ve varikosel cerrahi endikasyonları arasında testiküler hipotrofi, infertilite ve skrotal ağrı bulunur. Varikosellerin düzeltilmesi için yöntemler açık cerrahi, laparoskopik veya perkütan tekniklerdir (Rotker ve Sigman 2016).

Varikosel patofizyolojisinde, kabul edilen pek çok teori bulunmaktadır. Bu teoriler arasında testiküler hipoksi ve hipertermi, toksik adrenal ve renal metabolitlerin reflüsü, hormonal disfonksiyon, apoptozis, kadmiyum (Cd) birikmesi ve artan oksidatif stres yer almaktadır (Missassi ve ark. 2017). Erkek üreme sisteminde önemli bir rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROS), spermin fonksiyonel olgunluğa eriştiği (kapasitans, hiperaktivasyon ve akrozomal reaksiyon gibi) tüm süreçler için gereklidir. Ayrıca, membran lipitlerinin ROS aracılı lipit peroksidasyonu, fertilizasyon işleminde oosite sperm adezyonunu kolaylaştırır. Ancak, ROS'taki seviyelerin fizyolojik koşulların dışındaki düzeylere yükselmesi oksidatif strese yol açmaktadır (Sheehan ve ark. 2014).

Varikoselli erkeklerde yüksek düzeyde ROS ve malondialdehit (MDA) gibi lipit peroksidasyon ürünleri bulunur ve bununla birlikte azalan antioksidan savunma sonucu oluşan oksidatif stres (OS)'nin varikosel ilişkili infertilitede temel neden olduğuna inanılır (Missassi ve ark. 2017). Varikoselde artmış venöz hidrostatik basınca bağlı olarak testiküler iskemi ortaya çıkabilir; bu da proinflatuar sitokinlerin (Tümör Nekrozis Faktör alfa, TNF- α , İnterlökin-6, IL-6, vb.) artan ekspresyonuna yol açar. Bunun sonucunda artan sitokinler ROS oluşumunu

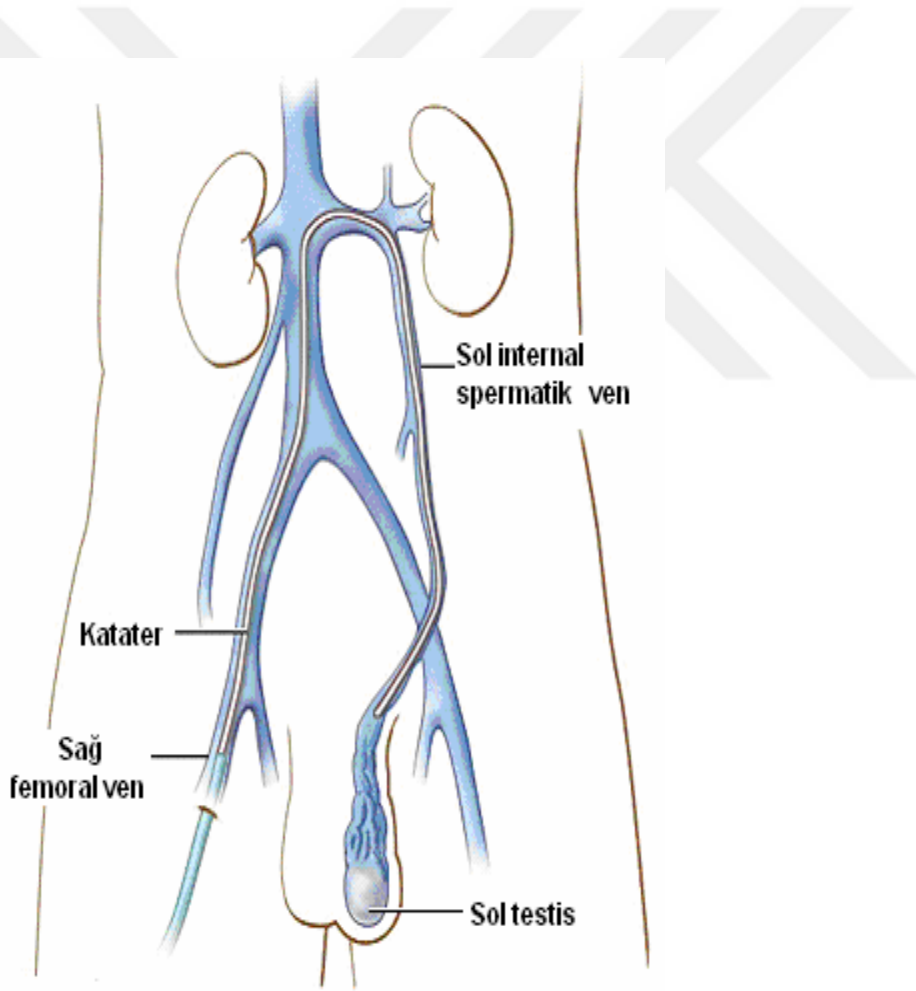
indükleyerek fertilitiyi bozar. Bu nedenle oksidatif stresi azaltmaya yardımcı olan antioksidan tedavi, varikozel ilişkili infertiliteyi düzeltebilir (Garg ve Kumar 2016).

Alfa Lipoik Asit (α LA) yağda ve suda çözülebilen güçlü bir antioksidandır. Ispanak, brokoli, domates, karaciğer, böbrek gibi besinlerde doğal olarak bulunan α LA'nın yararları son yıllarda birçok araştırmanın merkezi konusu haline gelmiştir (Gomes ve Negrato 2014, Kasnak ve Palamutoğlu 2015). α LA; hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlenebilen doğal bir bileşik olup oksitlenmiş ya da indirgenmiş halde iki sülfür molekülü içermektedir. Bu özellik α LA'nın, birçok önemli enzimin kofaktörü olarak görev yapmasını sağlamaktadır (El-Beshbishy ve ark. 2014, Seifar ve ark. 2017). Lipoik asit oral yolla alımın ardından hızla absorbe edilir ve vücudun pek çok dokusunda, indirgenmiş formu olan dihidrolipoik asite (DHLLA) kolayca çevrilebilir. α LA'nın hem okside formu hem de indirgenmiş formu antioksidan aktivite göstermektedir. Lipid ve sulu ortamda etkili olan α LA'nın okside ve redükte formları hidroksil (OH) ve nitrik oksit (NO) radikalleri, peroksinitrit anyonları (ONOO⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂)'in yakalanması ve singlet oksijen atomu (¹O₂)'nun söndürülmesi ile bilinirler (Ozbal ve ark. 2012, Lebda ve ark. 2014). DHLLA, dihidroaskorbik asidi yeniden askorbik aside çevirebilir; direkt olarak C vitamininin, dolaylı olarak ise E vitamininin yeniden oluşumunu sağlayabilir. α LA /DHLLA redoks çifti iyi bir antioksidan olarak kabul edilir ve α LA'nın, iskemi reperfüzyon hasarı, diyabet, katarakt oluşumu, nörodejenerasyon, yaşlanma ve radyasyon hasarı gibi birçok durumda yararlı olduğu gösterilmiştir (Ozbal ve ark. 2012, Ambrosi ve ark. 2018). α LA ve DHLLA doğal olarak fizyolojik sistemlerde bulduklarından ideal terapötik antioksidan olduğu düşünülebilir. Oluşturduğumuz deneysel varikozel modelinde önemli bir role sahip olan oksidatif stres parametrelerinin ve sitokin düzeylerinin incelenmesiyle; α LA tedavisinin, hem varikozel sebepli infertiliteye hem de oluşan infertilitenin patofizyolojisinde oksidatif stres parametreleri üzerine etkilerinin incelenmesi açısından önemli bir yer tutmaktadır. Yaptığımız çalışmayla ilgili literatürde benzer bir araştırmaya rastlamadığımızdan dolayı çalışmamız özgündür. Varikozelin erkek infertilitesinin saptanabilen en sık nedenlerinden biri olmasını da göz önünde bulundurduğumuzda, sonuçları itibarıyla bu konunun aydınlatılması varikozel tedavisinde yeni bilgilere ışık tutarak cerrahi müdahaleye gerek kalmadan alternatif bir tedavi potansiyeli olması açısından önem arz etmektedir. Bu noktada biz de oluşturduğumuz deneysel varikozel modeliyle gerçekleşen testis hasarı üzerine lipoik asidin koruyucu etkilerini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Varikosel

Varikosel, testis venöz drenaj sisteminin vasküler bir anomalisidir. Pampiniform ve / veya kremasterik venöz pleksusun anormal derecede genişlemesi ve kıvrımlı venlerin kümelenmesiyle kendini gösterir. Erkek infertilitesinin %35'ini oluşturan varikosel, erkeklerde primer ve sekonder infertilitenin en yaygın nedeni olarak gösterilir. Ayrıca varikoselin erkek infertilitesinin cerrahi olarak en sık düzeltilabilir sebebi olduğu düşünülmektedir (Cho ve ark. 2016).



Sekil2.1. Sol Internal Spermatic Ven Anatomisi (John Yesko 2001)

2.1.1.Varikosel Epidemiyolojisi ve Klinik Faktörler

Varikosel genel erkek popülasyonun yaklaşık %15'ini etkileyen bir sağlık sorunudur. Varikosel üzerinde yapılan ilk epidemiyolojik çalışmaların çoğu genç erkeklerde bu durumun yaygınlığını değerlendirmiş ve yaşın varikosel prevalansının önemli bir belirleyicisi olmadığını göstermiştir. Ancak yapılan bir çalışmada 6-9 yaşlarında 188 erkek çocukta hiçbir varikoselin tespit edilmediğini, ancak 10-14 yaşlarındaki erkeklerde artan sıklıkta tespit edildiğini belirterek bu durumu varikosellerin ergenlik döneminde geliştiğine dair güçlü bir delil olarak göstermektedir (Alsaikhan ve ark. 2016). Bununla birlikte Akbay ve arkadaşları 2-19 yaşları arasındaki 4052 erkekte varikosel prevalansını değerlendirmiş ve varikosel prevalansının 2-10 yaş erkeklerde <%1, 11-14 yaş arasındaki erkeklerde %7.8 ve 15-19 yaşlarındaki erkeklerde %14.1 olduğunu bildirmişlerdir (Akbay ve ark. 2000). Bu epidemiyolojik gözlemler, varikoselle karakterize olan venöz yetersizliğin öncelikle testiküler gelişim sırasında ortaya çıktığını göstermektedir. Daha ileri analizlerde varikosel prevalansının yaşamın her on yılı için yaklaşık %10 arttığı ve böylece varikosel prevalansının 30-39 yaş arasında %18, 40-49 yaşlarında %24, 50-59 yaşlarında %33, 60-69 yaşlarında %42, 70-79 yaşlarında %53 ve 80-89 yaşlarında %75 olduğu bildirilmiştir. Bu epidemiyolojik gözlemler, testis venöz yetmezliğinin, yaşla birlikte arttığını, muhtemelen venöz kapakların yaşlanmasının bir sonucu olduğunu göstermektedir.

Genel varikosel prevalansının yanı sıra infertil erkek popülasyonunda varikosel prevalansı %25-35 arasındayken sekonder infertilitesi olan erkeklerde bu oran %50-80 arasındadır. Bu varikosel prevalansındaki artış sekonder infertilitesi olan bazı erkeklerin, primer infertilitesi olan erkeklere göre daha yaşlı olmasıyla ilişkilendirilmiştir. 1992 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 12 aylık bir süre boyunca 34 merkezde gerçekleştirdiği geniş çaplı bir çalışmada 9034 erkeği infertilite bakımından değerlendirmiş ve anormal semen analizi yapılan erkeklerin %25.4'ünün varikosel olduğunu aynı çalışmada, normal semen analizi yapılan erkeklerde ise varikosel prevalansının %11.7 olduğunu bildirmiştir. Varikosel prevalansının kalıtsal faktörlere bağlı olduğunu gösteren bir çalışmada varikoseli olan erkeklerin birinci derece akrabalarında varikosel görülme oranının %34-56 arasında olduğu saptanmıştır. Obez erkeklerde varikosel ve vücut kitle indeksi (VKİ) arasında ters bir ilişki olduğu, varikoseli olan erkeklerin varikoseli olmayan erkeklere göre daha düşük VKİ'ye sahip oldukları veya VKİ arttıkça varikosel prevalansının azaldığı gösterilmiştir (Alsaikhan ve ark. 2016).

2.1.2.Varikoselin Etiyolojisi

Varikosel etiyolojisi karmaşık olmakla beraber birçok değişken göz önüne alınarak varikosele neden olduğu düşünülen 3 teori belirtilmiştir (Naughton ve ark. 2001).

1.Sağ ve sol testiküler venlerdeki anatomik farklılıklar: Sol testiküler ven, sağdakine göre 8-10 cm daha uzundur ve dikey olarak sağ renal ven içine doğru açı yapar oysa sağ testiküler ven, inferior vena kava içine süzülür. Sol testiküler ven, dik konumda uzun bir hidrostatik sütun gibi hareket ederek yüksek türbülanslı akış ve geri basınç anatomisiyle sol spermatik kordda venöz dilatasyon insidansını arttırmaktadır. Varikosel vakalarının %78-93 'ünü yaygın olarak sol varikosel oluştururken retroperitoneal veya pelvik kompresif kitle gibi obstrüktif bir lezyon varlığı ile ilişkilendirilen sağ varikosel hastaların sadece %2'sinde bulunur.

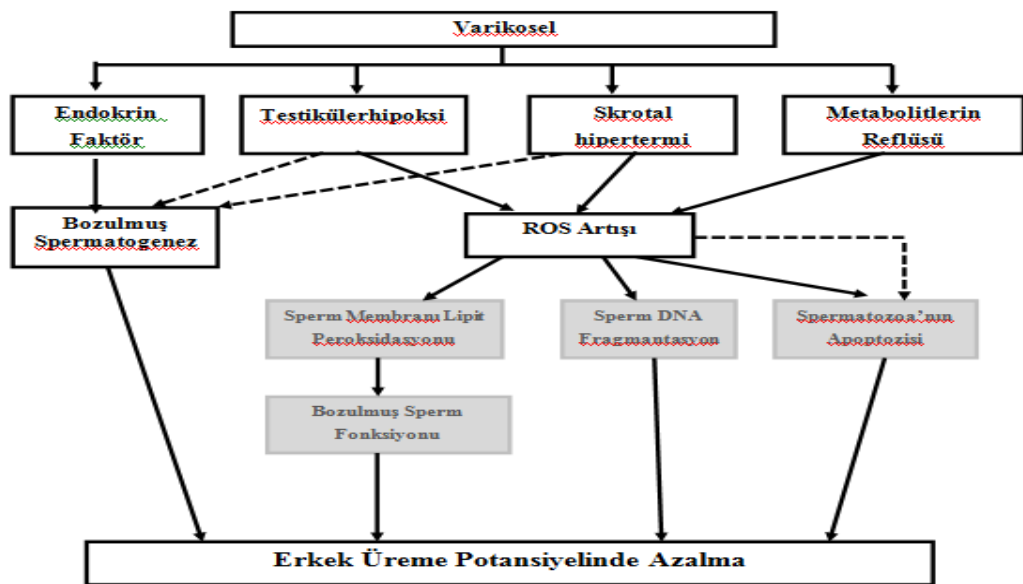
2.Venöz kanın reflüsü ile sonuçlanan kompetan venöz kapakçıkların olmayışı: Sol renal ven yoluyla Sol adrenal bezden katekolaminlerin reflüsü ile sol testiküler venin vasküler daralması, sol varikoselin gelişmesine bir faktör olarak ileri sürülmüştür. Bu veriler varikoseli ccuyumludur (Gat ve ark. 2006).Varikoseli olan hastalarda testiküler venlerde valflerin olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, diğer araştırmacılar, uygun kapak sistemine sahip hastaların %26.2'sinin halen varikoselli olduğunu göstermektedir. Bazı araştırmacılara göre kapakların yokluğu ya da uygun olmaması varikosellerin sebebi olabilir fakat bunlar tek başına neden değildir (Cho ve ark. 2016).

3.Mümkün olduğu düşünülen diğer bir faktörde, aort ve üst mezenterik arter arasında sol renal venin kompresyonu olan "fındıkkıran fenomeni" dir. Fındıkkıran sendromu, abdominal aort ve superior mezenterik arter arasında oluşan bir açı arasında giderken, sol renal venin daraldığı olağandışı bir sorundur. Sol renal venin bu daralması böbrek dolaşımındaki venöz basıncın artmasına ve böbrek pelvis ve üreterin varyasyonlarının gelişmesine yol açarak hematüri oluşmasına neden olabilir. Fındıkkıran sendromu ile ilişkili semptomlar arasında ortostatik proteinüri, yan ağrısı, sol taraflı varikosel, pelvik tıkanıklık ve kronik yorgunluk bulunur (Wang ve ark. 2009). Özetle, varikoselin etiyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır ve bahsi geçen hipotezlerin hiçbiri bazı hastalarda bilateral varikosellerin oluşumunu açıklayamamaktadır.

2.1.3. Varikoselin Patofizyolojisi ve Testiküler Hasar

Varikoselli hastalarda bozulan testiküler fonksiyonun mekanizması henüz tam olarak bulunamamıştır. Olası nedenler arasında testiküler ve skrotal sıcaklık artışı, venöz staz, testiküler hipoksi, testis venindeki adrenal hasarlı ürünlerinin reflüsü, alt intratestik testosteron ve androjen reseptör kusurları gösterilmektedir (Ning ve ark. 2017). Çeşitli çalışmalar varikosel vakalarının yaklaşık %35-40'ında hasarlı seminifer tübüller, leydig hücre dağılımında gözle görülür azalma, artan hücresel apoptoz ve anormal spermatogenez sonucu insan ve hayvanlarda testosteron azalması gibi testiküler disfonksiyonu göstermiştir (Razi ve Malekinejad 2015). Varikoselin en iyi bilinen testiküler patolojik özelliği ise germ hücrelerinin olgunlaşmasını durdurarak, olgunlaşmamış germ hücrelerinin seminifer epitel lümenine erken dökülmesine sebep olup spermatogenez bozmasıdır (Ning ve ark. 2017). Diğer bulgular retrograd kan dolaşımını takiben endokrin sistem hasarı, biyokimyasal değişiklikler ve oksidatif stres gibi çoklu patofizyolojik bozulmaların varikosele bağlı hasarı arttırdığını göstermiştir (Razi ve Malekinejad 2015).

Birçok yıldır çalışılmasına rağmen varikoselin altında yatan fizyopatolojik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak hipoksi ve testiküler hipertermi, toksik adrenal ve renal metabolitlerin reflüsü, hormonal disfonksiyon ve artan oksidatif stresi kapsayan bazı teoriler ileri sürülmüştür (Missassi ve ark. 2017). Varikosel patofizyolojisini açıklamada olası hipotezleri birkaç başlık altında incelemek gerekmektedir (Cho ve ark. 2016).



Şekil2.2. Varikoselin erkek üreme potansiyeli üzerine zararlı etkisi (Cho ve ark. 2016)

2.1.3.1.Skrotal Hipertermi

Varikosel sonucu oluştuğu kabul gören en yaygın teorilerin başında gelmektedir. Varikoselin, internal spermatik venlerin yetersiz kapakıklarından ve kremasterik venlerden pampiniform pleksus içine sıcak karın kanının reflsyle skrotal sıcaklığın yükselmesine neden olduğu düşünülmektedir. Testiküler sıcaklıktaki belirgin yükselme sonucu intratestiküler testosteron düzeylerinde ve Sertoli hücre salgılama fonksiyonunda azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Artan testiküler sıcaklığın ayrıca Leydig hücre salgı fonksiyonu üzerine de zararlı etkisi gösterilmiştir. Yapılan deneysel bir çalışmada varikosel ve kontrol grubu erkeklerde sol testiküler sıcaklık ve sperm sayımı arasında anlamlı farklılık olduğu bulunmuş ve varikoselektominin testiküler sıcaklıkları düşürdüğü ne srlmştir. Isı stresi spermatogenesisin bozulmasına sebep olabilir çünkü spermatogenez optimum i vücut sıcaklığından 2.5°C daha dşkte gerçekleşmelidir. Isı maruziyeti ve ROS retimi arasındaki doğrudan sıcaklığa bağlı ilişki çeşitli çalışmalarda gösterilmiş ve varikosel düzeyi seminal ROS düzeyi ile ilişkilendirilmiştir. Sıcaklık stresinde mitokondriyal, plazma membranı, stoplazma ve peroksizomdan ROS üretiminin arttığı da bildirilmiştir (Cho ve ark. 2016).

2.1.3.2.Renal ve Adrenal Metabolitlerin Reflüsü

Renal venöz kan reflüsünün bir sonucu olarak varikoselli hastaların spermatik venöz kanında prostaglandinlerin arttığı bildirilip adrenal katekolaminlerin testis venine retrograf akışının spermatogenezise zarar verdiği gösterilmiştir. Bununla birlikte literatür, sol testiküler ven üzerinden retrograd kan akışının varikosele bağlı infertilitenin başlıca nedeni olduğu teorisini açıkça desteklememektedir. Patogenezdeki reflü rolü belirsiz olmasına rağmen prostaglandinlerin, renal ve adrenal metabolitlerin çeşitli insan hücre kültürlerinde hüresel oksidatif stresi (OS) indükleyebildiği tespit edilmiştir (Cho ve ark. 2016).

2.1.3.3. Epididimal Cevap

Epididimis, sperm olgunlaşması ve taşınmasıyla ilgilidir. Epididimal tübülleri kaplayan çeşitli hücre tipleri ROS üretebilirken hipoksi ve hipertermi de, epididimal tüplerde ROS ve antioksidan arasındaki dengesizliğin tetikleyicileri olabilir. Deneysel varikosel modeli oluşturulmuş bir çalışmada epididimal hücrelerin ultrayapısal değişikliklerinin, apoptozisin ve

bozulmuş spermatogenezin patogeneğinde hem testiküler hem epididimal ilişki gösterilmiştir (Cho ve ark. 2016).

2.1.3.4. Apoptozis

Apoptoz, vücudun homeostazını muhafaza etmekte önemli bir rol oynayan fizyolojik bir olaydır. Bir dizi hücrese, morfolojik ve biyokimyasal değışiklikleri içeren bir genetik mekanizmaya dayanan programlanmış bir hücre ölümü sürecidir (Ning ve ark. 2017). Normalde, spermatogenez sırasında, sinyal iletim yolunun düzenlenmesi yoluyla normal üreme fonksiyonunu korumak için spermatojenik hücrenin ~% 25-75'inde apoptoz olurken yapılan bir araştırmaya göre, testiküler fonksiyon bozukluğuna ve erkek infertilitesine neden olan sıçan varikozel modelinde spermatojenik hücrelerin apoptozu artmaktadır (Barqawi ve ark. 2004).

2.1.3.5. Hormonal Disfonksiyon

Varikozel yapılmış hayvan modellerinde testiküler sıcaklıktaki belirgin yükselmenin intratestiküler testosteron düzeylerinde ve Sertoli hücre salgılama işlevinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Cho ve ark. 2016). Leydig hücrelerinin başlıca fizyolojik rolü seminifer epitel büyümesi ve normal sperm aktivitesi için gerekli testosteron üretmektir (Habibi ve ark. 2015). Bununla birlikte artan testiküler sıcaklığın Leydig hücre salgı fonksiyonu üzerine zararlı etkisi olduğu da gösterilmiştir (Cho ve ark. 2016). Varikozelde spermatogenez üzerindeki olumsuz etkilerin çoğu Sertoli ve germ hücre hareketlerine dayandırılır. Ancak varikozellerin hormonal etkileri, Leydig hücreleri ve bozulmuş testosteron üretimini içeren bir pantestiküler etki göstermektedir (Lundy ve Sabanegh 2017).

2.1.3.6. Testiküler Hipoksi

Testis nispeten iyi vaskülerize olan bir organdır. Ancak venöz sırt basıncı, akış ve oksijenlenmeyi sınırlayarak arteriyel akış basıncını aşarsa testis hipoksik hale gelebilir. Testiküler torsiyona eşlik eden akut iskemiden farklı olarak, varikozelde hipoksi kronik bir süreçtir ve testis içinde kompensatuvar değışiklikler ile sonuçlanır. Bu alandaki en iyi çalışılan gen, eritropoez, anjiyogenez ve mitokondriyal solunumla ilgili bir transkripsiyon faktörü olan hipoksi-indüklenebilir faktör-1a'dır (HIF1A). 2000'li yılların ortalarında çeşitli çalışmalarda, HIF1A ve başka bir anjiyogenik protein olan vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) varikozel varlığında önemli derecede upregüle olduğu gösterilmiştir (Lundy ve Sabanegh 2017).

2.1.3.7. İnfertilite Etkisi

Varikoselli hastalarda bozulan testiküler fonksiyonun mekanizması henüz bulunamamıştır (Agarwal ve ark. 2009). Testiküler ve skrotal sıcaklık artışı, venöz staz ve hipoksi sonucu testis venindeki adrenal hasarlı ürünlerin reflüsü, alt intratestik testosteron ve androjen reseptör kusurları olası nedenler arasındadır. Spermatogenez sıcaklığa duyarlıdır ve optimal olarak erkeklerde 35°C' de ilerlemektedir. İç spermatik arter (pampiniform pleksusla çevrili) testisleri, vücut sıcaklığından 2.2°C daha düşük seviyede (35°C' de) tutar. Varikosel skrotal sıcaklığın ortalama 2.6°C yükselmesine neden olur. Deneysel çalışmalarda yüksek skrotal sıcaklık sonuçları tartışmalıdır ve varikoselli infertil erkeklerde skrotal sıcaklıkların aralığı ile fertil erkekler arasındaki sıcaklık aralığı arasında belirgin bir örtüşme olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, insanlardaki varikosel onarımının testiküler sıcaklığı düşürdüğü de iyi bilinmektedir (Naughton ve ark. 2001).

Varikoselin varlığı testis hacmindeki azalma ve varikoselin derecesi ile ilişkilidir. Varikoselin bazen olgunlaşmayı durdurmasıyla birlikte, olgunlaşmamış germ hücrelerinin seminifer epitel lümenine erken dökülmesi nedeniyle spermatogenezi azalttığı en çok bilinen testiküler patolojik özelliğidir. Varikosel olan tüm erkeklerin sperm kalitesi zayıftır ve bu hastaların eşlerinde gebelik olmadığı bildirilmiştir (Agarwal ve ark. 2009).

Varikoselli erkeklerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan kadmiyum OS'yi indükleyerek, sperm kafa aktininde bozulmaya sebep olur ve morfolojik açıdan anormal sperm oluşur. Ayrıca, varikoselli erkeklerde sperm kalsiyum kanallarının alfa-1 alt biriminin mikrolezyonları, anormal akrozomal fonksiyona neden olan bir genetik defekte sebep olur. Bu, varikoselli tüm erkeklerin neden infertil olmadıklarını açıklayabilir. Verilerin büyük çoğunluğu, varikoselli infertil hastalarda önemli sperm fonksiyonlarının da bozulduğunu ortaya koymuştur. Sperm-servikal mukus etkileşimindeki bozukluklar, kadın genital bölgedeki sperm sağkalımı, sperm zonabinding yeteneği, akrosin aktivitesi, kapasitasyon zorluğuna yanıtın azalması ve tirozin fosforilasyon ve akrozom egzozitozunun görülme sıklığının daha düşük olduğu da bildirilmiştir (Agarwal ve ark. 2009).

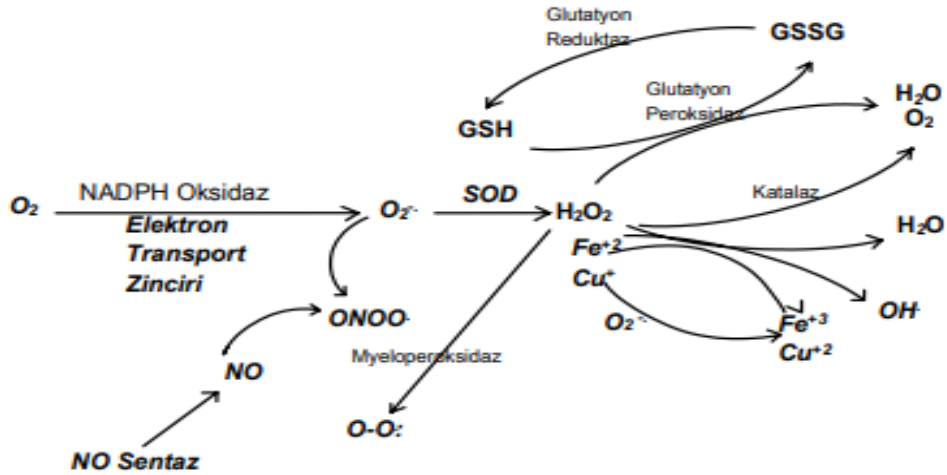
2.2. Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri

2.2.1. Serbest Radikaller

Elektronlar orbital denem yörüngelerde döner ve normal şartlarda her orbital biri diğerine zıt yönde dönen iki elektron içerir. Ortaklanmamış elektron içeren serbest radikaller; çoğunlukla elektron transport zincirinde oluşan elektronların transferi veya oksidazlar vasıtasıyla tek elektron transferi ve homolitik bağ yıkımı sonucu oluşur. Ayrıca serbest radikaller organizmanın iyonize radyasyona, bazı ilaçlar gibi oksitleyici özellik taşıyan ajanlara maruz kaldığı durumlarda da meydana gelirler (Young ve Woods'de 2001, Cherubini ve ark. 2005).

Serbest radikaller normalde hücrel metabolizmanın ara basamaklarında oluşur ve bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron varlığına bağlı olarak kararsız olup aminoasitler, lipitler ve nükleik asitlerin varlığında çok reaktiflerdir ve normal koşullarda antioksidan savunma, biyolojik sistemleri serbest radikal toksisitesinden korumaktadır (Cho ve ark. 2016).

Biyolojik öneme sahip birçok atomda ortaklanmamış elektron bulunabilir bunlar; sülfür, karbon, fosfor, hidrojen veya nitrojen merkezli radikallerdir. Bu atomların yanı sıra moleküler oksijene (O_2) fazladan bir elektron eklendiğinde süperoksit anyon radikali (O_2^-) oluşur. Süperoksit anyonu, nispeten kararlı ve güçlü oksidan olan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi diğer nonradikal maddelere dönüştürülebilir. NO, NO_3^- , NO^- , N_2O ve HNO_3 te olduğu gibi nitrojen atomları içeren bazı reaktif oksijen türleri de, insan semendeki yaygın serbest radikallerdir ve kolektif reaktif oksijen türleri olarak bilinirler (Cho ve ark. 2016).



Şekil2.3. Serbest radikallerin oluşum mekanizması ve enzimatik detoksifikasyonu (Vincent ve ark. 2004).

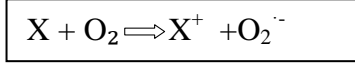
2.2.2. Reaktif Oksijen Türleri

Reaktif oksijen türleri; DNA hasarı, lipid peroksidasyonu, protein peroksidasyonu, antioksidan enzimlerin ve enzimatik olmayan antioksidan moleküllerin tükenmesi gibi çeşitli mekanizmalarla doku ve hücrel hasara neden olan süperoksit, hidroksil, peroksil, alkoksil ve hidroperoksil gibi radikalleri içerir (Aly ve ark. 2009).

2.2.2.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Aerobik organizmaların başlıca serbest radikal kaynağı olan moleküler oksijenin elektron alıp indirgenmesiyle oluşur (Özcan ve ark. 2015). Süperoksit anyonunun ($O_2^{\cdot-}$) yaygın kaynağı, hücrel solunum sırasında mitokondriyal elektron transfer zinciri (ETZ)'de nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) tarafından sağlanan elektronlardır. ETZ' nin sağladığı elektronlarla moleküler oksijenin bir elektron kaybetmesi sonucu süperoksit radikali oluşur. Ayrıca flavoproteinler ve bazı redoks enzimleri tarafından O_2 'nin indirgenmesiyle ya da indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu sonucu da süperoksit radikali oluşabilir (Özcan ve ark.2015, Liguori ve ark. 2018).

Süperoksit radikal oluşumunun temel reaksiyonu;

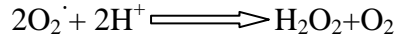


X: Bir elektron kaynağı (sitokrom, kinon, hemoglobin ve redoks metalleri olabilir)

Süperoksit serbest radikal olmasına rağmen organizmaya doğrudan fazla zararı yoktur, bu radikalın asıl önemli özelliği geçiş metali iyonlarının indirgeyicisi ve H_2O_2 kaynağı olmasıdır (Memişoğulları 2005). Bununla birlikte süperoksit radikalının serbest radikal olan nitrik oksit (NO^{\cdot}) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit ($ONOO^-$) meydana gelir. Nitrik oksitin (NO^{\cdot}) zararlı etkilerinden sorumlu olan peroksinitrit, azot dioksit (NO_2), hidroksil radikali ($\cdot OH$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir (Liguori ve ark. 2018).

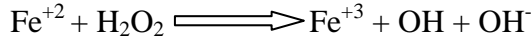
2.2.2.2. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Moleküler oksijen başka bir molekülden iki elektron alırsa peroksit molekülü, bu molekülden iki hidrojenle birleşirse H₂O₂ oluşur. Biyolojik sistemlerde H₂O₂ kendiliğinden veya süperoksit dismutaz (SOD) katalizli süperoksidin dismutasyonu sonucu oluşur.

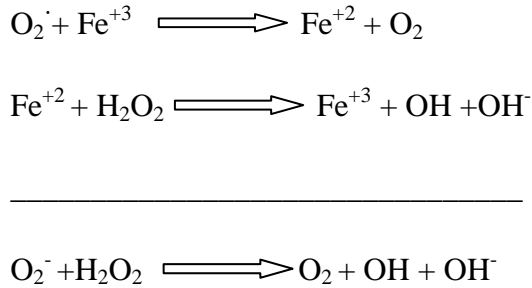


H₂O₂ bir radikal olmamasına rağmen üretildiği yerde kalan süperoksidin aksine membranlar ve sitozol boyunca difüze olabilen uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinmektedir. Eşlenmemiş elektronları olmadığı için serbest radikal olmayan hidrojen peroksit, Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonu yoluyla yüksek oranda reaktif ·OH iyonu oluşturabilir. Hidroksil radikalleri son derece reaktif olup özellikle hücre membranları ve proteinlerindeki fosfolipitler ile reaksiyona girerek zarar verirler (Vincent ve ark. 2004, Liguori ve ark. 2018).

Fe, Cu, Mn metalleri varlığında hidroksil radikalının oluştuğu fenton reaksiyonu;

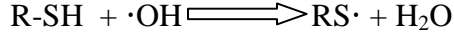


Süperoksit radikali varlığında hidroksil radikalının oluştuğu Haber-Weiss reaksiyonu;



2.2.2.3. Hidroksil Radikali (·OH)

Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hidrojen peroksitten meydana gelmektedir. Ayrıca suyun iyonize edici radyasyona maruziyeti sonucunda da oluşur. Hidroksil radikali küçük, son derecede hareketli, suda çözünebilir ve kimyasal olarak aktifleşmiş oksijenin en reaktif türüdür. Bu radikal tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli biyokimyasal moleküllerden bir proton koparak tiyil radikalleri, karbon merkezli organik radikaller, organik peroksitler gibi yeni radikalleri oluşturarak büyük hasara neden olur (Özcan ve ark. 2015, Ayala ve ark. 2014).



(Tiyil radikali oluşumunun genel tepkimesi)

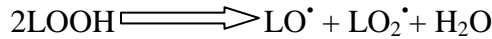
Bu kısa ömürlü molekülü, bir hücre her saniyede yaklaşık 50 adet üretir. Her bir hücre tam bir günde, nötralize edilebilen veya biyomoleküllere etki eden yaklaşık 4 milyon hidroksil radikali üretebilmektedir (Ayala ve ark. 2014).

2.2.2.4. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit, NO sentaz olarak bilinen sitozolik bir enzim tarafından L-argininin terminal guanido azotundan üretilir. NO bir yandan radikal toplayıcısı olarak görev alırken diğer yandan peroksit düzeylerinin arttığı durumlarda bir prooksidan olan peroksinitriti (ONOOH) oluşturur. Serbest radikal olmayan peroksinitrit kararlı, direk toksik etkili ve güçlü bir oksitleyici ajan olarak bilinmektedir (Vincent ve ark. 2004).

2.2.2.5. Alkoksil (LO[•]) ve Peroksil (LOO[•]) Radikalleri

Doymamış yağ asitleri oksijen radikallerinden etkilenecek peroksidasyona uğrar. Oluşan ürünlere bir demir kompleksinin eklenmesi, peroksit ayrışmasıyla peroksidasyonu uyararak, alkoksil (LO[•]) ve peroksil (LO₂[•]) radikalleri üretilmesine neden olacaktır.



Bu radikaller zincirleme peroksidasyon reaksiyonlarını başlatır ve sonuç olarak Malondialdehit (MDA), 4-Hidroksinonenal ve hegzanal isimli aldehitler oluşur. Zincirleme peroksidasyon reaksiyonları membranlara zincir kırıcı bir antioksidan eklenene kadar devam eder ancak bu antioksidanların yokluğunda membran yapısını bozarak membranın hasarlanmasını kolaylaştırır (Özcan ve ark. 2015).

2.2.2.6. Singlet Oksijen (¹O₂)

Singlet oksijen, eşleşmemiş bir elektron içermediği için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Elektronlarından birinin enerji alarak kendi spinine ters yönde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur. Ayrıca hidrojen peroksitin hipokloröz asit veya peroksinitritle reaksiyona girmesi sonucu da singlet oksijen oluşabilir. Singlet oksijen

oluşumunun endoplazmik retikulumda strese ve mitokondriyal deoksiribo nükleik asit (DNA)'da hasara yol açtığı gösterilmiştir (Onyango 2017).

2.3. Serbest Radikallerin Biyomoleküller Üzerine Etkileri

Sağlıklı hücrelerde serbest radikallerin üretimi sıkı kontrol altındadır, ancak metabolik disfonksiyon sırasında aşırı üretim hücresel hasara yol açar. Lipit, protein ve nükleik asit bileşenlerinin oluşumu, reaktif metilen grupları içeren bir dizi biyolojik substrat kullanılarak kompleks bir zincir reaksiyonunu içerir. Zincir reaksiyonundaki ara ürünler aşırı derecede yüksek oksidatif özelliklere sahip olabilir ve bu nedenle hücresel hasarlar oluşabilir. Plazma, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum membranlarında bulunan lipidler ROS atağının ve peroksidasyonunun ana hedefleridir (Requena ve ark. 1996, Beckman ve Ames 1999). Lipit peroksidasyon, protein ve nükleik asit peroksidasyon ve nitralizasyonu sonucu oluşan son ürünler genellikle hücrelere doğrudan toksik olmamakla birlikte, inaktif proteinlerin birikmesi ve bir hücrenin bunları geri dönüştürme yeteneğini aşması sonucunda DNA hasarının apoptoz mekanizmalarını aktive ettiği bilinmektedir (Vincent ve ark. 2004).

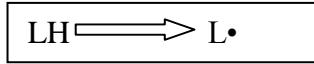
2.3.1. Lipitler Üzerine Etkileri

Biyomoleküller arasında serbest radikal hasarına en yatkın moleküller lipitlerdir. Biyolojik sistemlerde çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikal oksidasyonu lipit peroksidasyonu olarak bilinir ve hücre membranlarındaki kolesterol, glikolipit, fosfolipit ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturabilirler (Ayala ve ark. 2014).

Bir membran lipiti veya çoklu doymamış bir yağ asidindeki bir peroksidasyon sekansının ilk zincir reaksiyonunun başlatılması yani bir metilen (-CH₂-) grubundan bir hidrojen atomunu (H) koparmak, herhangi bir serbest radikal saldırısından kaynaklanabilmektedir. Lipitler ayrıca lipoksijenazlar, siklooksijenazlar ve sitokrom P450 gibi enzimlerle de oksitlenebilir. Yağ asidinde bir çift bağın varlığı, çift bağa bitişik karbon atomu üzerindeki C-H bağlarını zayıflatarak elektron koparılmasını kolaylaştırır. Bu yüzden, membran lipitlerinin poliansature yağ asitlerinin (PUFA) yan zincirleri özellikle peroksidasyona duyarlıdır (Gutteridge 1995, Ayala ve ark. 2014, Özcan ve ark. 2015).

Lipit peroksidasyon sonucu oksidatif hasarın kapsamı, antioksidan savunma kapasitesini aşarsa patolojik durumların gelişmesine ve geri dönüşümsüz hücre hasarına yol açar. Lipid peroksidasyonunun genel süreci; başlatma, yayılma ve sonlandırma olarak üç adımdan oluşur (Ayala ve ark. 2014).

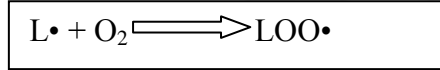
1. Lipit peroksidasyonu genellikle doymamış yağ asitlerine serbest radikallerin saldırması sonucu metilen (-CH₂-) grubundan bir hidrojen atomunun (H) çıkarılması ve buna bağlı olarak lipit radikalinin oluşmasıyla başlar.



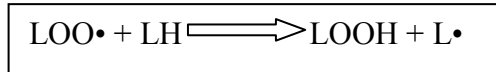
LH : çoklu doymamış yağ asidi

L• : lipit radikali

2. Yayılma aşamasında lipit radikali (L•), lipit peroksit radikalleri (LOO•) oluşturmak üzere hızla oksijenle reaksiyona girer.

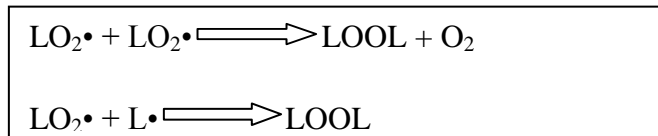


Daha sonra LOO• devam eden yeni bir zincirleme reaksiyondaki lipit molekülünü etkiler ve yeni bir lipit radikali oluşur, kendisinde açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksite (LOOH) dönüşür ve zincirleme reaksiyonlar kendi kendini katalizleyerek devam eder.



Ortamda geçiş metallerinin varlığında ise lipit hidroperoksitler yıkılarak tekrar radikale dönüşerek yayılma reaksiyonlarının devam etmesine sebep olurlar.

3. Sonlandırma reaksiyonları, iki serbest radikalın birbirini ortadan kaldırmasıyla ya da vitamin E gibi antioksidanlar varlığında gerçekleşir.



LOOL : siklik bir peroksit (Gutteridge 1995, Ayala ve ark. 2014).

Biyolojik membranlardaki geniş lipit peroksidasyonu; akışkanlık kaybına, membran potansiyelinde düşümlere, H⁺ ve diğer iyonlara karşı artan geçirgenliğe neden olmakla beraber hücre ve organel içeriğinin salınmasına neden olan membran yırtılmalarına sebep olmaktadır (Gutteridge 1995, Özcan ve ark.2015). Lipit peroksidasyonunun ana ürünü lipit hidroperoksitlerdir ve bunlar son olarak MDA, propanal, heksanal ve 4-hidroksinonenal gibi toksik ve mutajenik aldehytlere yıkılır (Esterbauer ve ark. 1991, Ayala ve ark. 2014). Doğrudan membran yapısına hasar veren nonenzimatik lipit peroksidasyonu, dolaylı olarak da ürettiği aldehytlerle hücre bileşenlerine zarar vererek doku hasarına ve birçok hastalığa neden olmaktadır (Gutteridge 1995, Ayala ve ark. 2014).

MDA, tiyobarbitürik asitle (TBA) kolay reaksiyonu nedeniyle yağ asitlerinin lipit peroksidasyonu için uzun yıllardır yaygın bir biyobelirteç olarak kullanılmaktadır ve dokudaki veya vücut sıvılarındaki MDA değerleri spektrofotometrik ve florometrik yöntemlerle ölçülebilir (Ayala ve ark. 2014, Özcan ve ark. 2015).

2.3.2. Proteinlere etkileri

Serbest radikaller proteinlerin; enzim aktiviteleri, yapısal fonksiyonları, protein sentezinin etkinliği ve proteolize duyarlılık gibi biyokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkileyebilir (Özcan ve ark. 2015). Proteinlerin yan zincirlerindeki özellikle prolin, arginin, lizin ve treonin aminoasitlerinin oksidasyonu sonucu karbonil grupları (aldehytler, ketonlar) oluşur. Aynı zamanda protein karbonil türevleri, ya α -amidasyon yolu ya da glutamil yan zincirlerinin oksidasyonu ile proteinlerin oksidatif parçalanması sonucu da üretilebilir (Berlett ve Stadtman 1997). Ayrıca sistein, histidin ve Lizin kalıntılarının nükleofilik yan zincirlerinin sekonder reaksiyonu ile lipit peroksidasyon sırasında üretilen aldehydler veya indirgeyici şekerlerin reaksiyonunun bir sonucu olarak oluşan reaktif karbonil türevleri proteinlere eklenerek proteinlerin biyokimyasal özelliklerinin bozulmasına neden olmaktadır. Protein karbonil birikimi, protein oksidasyonun en genel göstergesi olup alzheimer, diyabet, iltihaplı bağırsak hastalığı ve artrit gibi patolojilerde gözlenmiştir (Özcan ve ark. 2015).

2.3.3. DNA Üzerine Etkisi

Serbest radikaller DNA'ya doğrudan veya dolaylı olarak zarar verebilir. Doğrudan hasar genellikle hidrojen atomu transferi, radikal adduksiyon oluşumu veya tek elektron transferlerini içerirken dolaylı olarak da, serbest radikallerin lipidler, proteinler ve diğer hücrel bileşenler gibi biyomoleküller ile reaksiyona girdiğinde elde edilen elektrofilik türlerin etkisinden kaynaklanır (Galano ve ark. 2018). Spesifik olarak, dört DNA nükleobazının tümünün yapıları, ROS'un oksidatif hasarına duyarlıdır ve baz hasarı, parçalanmış veya halka açılmış formları ve oksitlenmiş aromatik türevleri içerir. DNA bazlarındaki çift bağlara saldıran ROS, DNA molekülü ile reaksiyona girerek çift bağlara H atomu ekleyerek veya 2-deoksiribozun C-H bağlarından ve timin yapısındaki metil gruplarından H çıkararak DNA yapısını bozar, mutajenik ve sitotoksit ürünlerin oluşmasına neden olur. Diğer DNA bazlarına kıyasla, guanin düşük oksidasyon potansiyeline sahiptir ve DNA oksidasyonuna daha yatkındır. 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-okso-dG), guanin halkasının C8 pozisyonuna hidroksil radikalinin eklenmesiyle üretilen oksitlenmiş guaninin en yaygın şeklidir. Stabilitesi ve biyolojik önemi nedeniyle, 8-oxo-dG en kapsamlı olarak incelenen DNA lezyonlarından biridir ve hasarlı DNA'nın nasıl işlendiği ve onarıldığı konusunda geniş bir bilginin çoğunluğu 8-okso-dG kullanan çalışmalara dayanmaktadır ve dolayısıyla 8-okso-dG DNA hasar belirteci olarak gösterilmektedir (Whitaker ve ark. 2017, Salehi ve ark. 2018).

DNA oksidasyonu, bir hücrenin günlük yaşamında devam eden bir olaydır ve oksitlenmiş bazlar, apuridik / apyrimidinik (AP) bölgeler ve DNA'nın tek veya çift iplikli kırılmaları dahil olmak üzere farklı lezyonların oluşumuna yol açar. AP bölgeleri, oksidatif DNA hasarına çok fazla maruz kalır ve N-glikozil bağının kendiliğinden hidrolizi veya hasarlı bazın bir DNA glikozilaz ile çıkarılması sonucu meydana gelebilir ve DNA fosfattan ayrılır. AP bölgeleri, DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu bloke ederek hücreye sitotoksiktir ve mutajeniktir, çünkü bu bölgelerinin kimyasal reaktivitesi DNA kırılmaları, DNA-protein ve DNA-DNA çapraz bağlarının oluşmasına neden olabilir. Sonuç olarak hücrelerin hidrojen peroksit veya serbest radikallere maruziyeti replikasyon ve transkripsiyon üzerine etkili olarak DNA tamir mekanizmalarını baskılayıp DNA hasarını artırır (Whitaker ve ark. 2017).

2.4. Oksidatif Stres

Günümüzde oksidatif stresin spermatogenez ve semen analizi parametrelerinde önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. İlk kez Hendin ve arkadaşları hem fertil hemde infertil varikoselli erkeklerde ROS'un varikosel varlığında arttığını bildirmişlerdir (Hendin ve ark. 1999). Bu bulgunun altında yatan mekanizma, özellikle varikosellerin varikoz ven duvarları içindeki ROS ve ROS süpürücü antioksidan mekanizmaları arasındaki bir dengesizliğin sonucu olan OS'ye bağlanmaktadır. Varikoselin derecesi, ROS üretim seviyeleri ve aynı zamanda sperm kalitesinde bozulma ile doğrusal olarak ilişkili görülmektedir ve varikosektominin, ROS'u azaltarak ve antioksidan seviyelerinin artmasına izin vererek oksidatif stresin iyileştirilmesinde önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Lundy ve Sabanegh 2017).

2.4.1. Varikosel ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, dokularda ROS birikiminin bir sonucu olup antioksidan mekanizmaların düzenlenmesine yol açar. Fizyolojik koşullar altında ROS birikimi antioksidan savunma sistemi sayesinde düşük seviyede tutulur ve hücre büyümesi, gelişimi, farklılaşması ve ölümü üzerinde özel düzenleyici etkilere sahiptir. Bununla birlikte patolojik durumlarda, ROS'un fazla üretilmesi, hücresel membran proteinlerinin, lipidlerin ve DNA'nın oksidasyonu sonucu bir dizi hücre işlev bozukluğu ve hücre ölümüne neden olabilir (Ning ve ark. 2018).

Varikoselli erkeklerin yüksek düzeyde ROS ve MDA gibi lipit peroksidasyon ürünleri bulundurmaları ve de antioksidan savunmalarındaki azalmadan dolayı oksidatif stresin varikosel ilişkili infertilitede temel neden olduğu düşünülmektedir (Missassi ve ark. 2017). Birçok çalışma, ROS'un sperm fonksiyonu üzerindeki zararlı etkilerini göstermiş ve infertil erkeklerin % 30-80'inde ROS düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir (Cho ve ark 2016).

Varikoseli olan hastaların serum, semen ve testiküler dokularında OS artışının etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir. Mevcut çalışmalar oksidatif stresin varikosele bağlı infertilitenin patofizyolojisinde anahtar bir unsur olduğunu desteklemektedir. Yapılan bir çalışmada varikoseli olan hastalarda lipit peroksidasyon seviyesinin varikosel derecesine bağlı olduğu ve grade 3 varikoseli olan hastalarda en yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur (Agarwal ve ark. 2009). Varikosel ve OS arasındaki yakın ilişki, varikoselli infertil erkeklerde varikosel olmayan infertil erkeklerden daha yüksek seviyede ROS, NO ve lipit peroksidasyon ürünlerinin varlığını göstermektedir. Çeşitli çalışmalar varikoseli olan fertil erkeklerin, varikosel olmayan fertil erkeklerle karşılaştırıldığında üreme alanında OS'in artmış olduğunu göstermiştir. OS'deki

artış klinik koşullarda Varikosel, kriptorşidizm, testiküler torsiyon, genitoüriner sistem enfeksiyonu ve inflamasyon gibi erkek subfertilitesi ile ilişkili olan durumlar için gösterilmiştir (Cho ve ark 2016).

2.4.2. Erkek İnfertilitesinde Oksidatif Stres

İnfertilite ile ROS oluşumu arasındaki ilişki belirlenmiş ve kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Morfolojik olarak anormal spermelerin mitokondri ve plazma membranları, NADPH bağımlı ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı oksidoredüktaz sistemleri aracılığıyla, ROS üretir. Bununla birlikte ROS, lökositler ve çoğunlukla nötrofiller tarafından da üretilir. Lökositler normal olarak prostatik ve seminal vezikül salgılarında bulunurlar ve inflamasyon veya enfeksiyon esnasında sitokinler ve interlökinler yoluyla aktive olurlar ve ROS üretimlerini arttırmaları. Ayrıca, yaşam tarzı ve çevresel faktörler (sigara, kirlilik, radyasyon), varikosel ve enfeksiyon gibi tıbbi durumlar da ROS üretimini arttırmaktadır (Agarwal ve ark. 2009).

Düşük ROS seviyeleri normal fertilizasyon, kapasitasyon, hiperaktivasyon, motilite ve akrozom tepkimesi için gereklidir fakat seminal plazmada aşırı ROS üretimi veya azalmış antioksidan savunmalar, oksidatif strese neden olur ve bu da spermatozoaya hasar verir (Agarwal ve ark. 2009, Cho ve ark 2016). Sperm plazma membranları, kolayca lipid peroksidasyona maruz kalan çoklu doymamış yağ asitlerinin yüksek seviyelerinden dolayı özellikle OS'ye duyarlıdır. Plazma zarının lipid peroksidasyonu, sperm plazma membranının akışkanlığını etkiler ve sperm-oosit füzyonunda fonksiyonel kusurlara neden olur. Buna ek olarak, lipid peroksidasyonunun son ürünü 4-hidroksi-2-nonenal-aldehid DNA'ya zarar veren, proteinlerle bağlanan ve apoptozu indükleyen bir alkilleyici ajandır. Dolayısıyla, OS genomik ve mitokondriyal sperm DNA'larını etkiler ve temel yapısının bozulmasına neden olur. Bu, infertilite de dahil olmak üzere birçok farklı patolojik özellikten sorumlu olan moleküler veya genetik değişikliklere neden olabilir (Agarwal ve ark. 2009).

2.5. Testiste Oksidatif Stres

Oksidatif stresin olumsuz etkileri çeşitli mekanizmalarla ortaya konmaktadır. 1943'den beri serbest radikallerin spermatozoada varlığı ve erkek infertilitesinde muhtemel etkisi bildirilmiştir (Cho ve ark 2016). Memeli testisleri oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır ve varikosel patolojisi ROS'un aşırı üretimi ile yakından ilişkilidir (Ning ve ark. 2018). Çeşitli çalışmalar varikosel vakalarının yaklaşık %35-40'ında hasarlı seminifer tübüller, Leydig hücre

dağılımında gözle görülür azalma, artan hücrel apoptoz ve anormal spermatogenez sonucu insan ve hayvanlarda testosteron azalması gibi testiküler disfonksiyonu göstermiştir (Razi ve Malekinejad 2015).

Reaktif oksijen türleri hedef hücre membranlarında, doymamış yağ asitleri peroksidasyonunu artırır ve sonuç olarak ortaya çıkan azaltılmış membran akışkanlığı; suboptimal motiliteye, döllemeyi sağlayan sperm başı ve orta zarın yapısı üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir (Cho ve ark 2016). Yapılan çalışmalar testislerde 4-Hidroksi-2-nonenal modifiye p53 ekspresyonunun, varikoselli hastalarda fertil erişkinlerdekine kıyasla daha fazla olduğunu göstermiştir. Ayrıca OS'nin bir belirteci olan 8-okso-dG'nin, varikoseli olan hastaların testiküler dokusunda ekspresyonunun arttığı da bildirilmiştir (Agarwal ve ark. 2009).

Yapılan bir çalışmada varikoseli olan infertil hastaların testiküler dokusunda yüksek MDA düzeyleri bildirilmiş ve testis disfonksiyonunun sebebi olarak ROS gösterilmiştir (Agarwal ve ark. 2009). Aşırı ROS, sperm ve oositteki hasar görmüş DNA'yı onaran koruyucu mekanizmaları ve enzimleri tahrip ederek azospermiye neden olabilmektedir. OS olgun sperm hücrelerinde apoptozise neden olarak spermatozodaki anormalliği kalıcı hale getirebilir ve bununla birlikte yüksek ROS seviyelerinin, sperm sayısının, motilitesinin, morfolojisinin ve DNA bütünlüğünün bozulmasıyla ilişkili olduğu gösterilmektedir (Cho ve ark 2016).

2.6. Varikosel ve Sitokin Cevabı

Sitokinler, inflamatuvar cevapların düzenlenmesinde ve patojenlere karşı bağışıklık oluşturulmasında önemli rol oynayan küçük çözümlü protein molekülleridir. Sitokinler, lökositler ve diğer hücreler tarafından üretilen ve salgılanan düzenleyici peptidler olup, büyüme ve farklılaşma faktörleri olarak da bilinirler. Sitokinler, hem bağışıklık sisteminin hücreleri olup hem de dış uyarılara, ortaya çıkan yaralanmalara veya diğer sitokinlere yanıt olarak çevre dokulardaki hücreler tarafından üretilen büyük bir protein grubudur (Fraczek ve Kurpisz 2007). Sitokinler, lenfokinler (lenfositler tarafından üretilirler), monokinler (monositler) veya aktivite (kemokinler, interlökinler ve interferonlar) ile ilişkili olarak kökenlerine göre isimlendirilirler (Habibi ve ark. 2015). Seminal plazma, normal olarak erkek genital traktusunda bulunan birkaç sitokin düzeyini içerir. Bu sitokinlerin, germ hücreleri, Leydig ve Sertoli hücreleri, epididim ve prostat tarafından salındığı ve bunların ekspresyonunun seminifer epitel döngüsü sırasında modüle edildiği ileri sürülmüştür (Martínez ve ark. 2007). Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α), interlökinler, interferon gama ve semende bulunan çözümlü reseptörlerinin bazıları immün hücreler, mezenkimal hücreler, Sertoli hücreleri ve spermatogonya tarafından salgılanır. Bu

nedenle interlökin-6 (IL-6), interlökin-8 (IL-8) ve TNF- α gibi sitokinler doğal olarak insan sperminde ortaya çıkabilir (Havrylyuk ve ark. 2015).

2.6.1. İnterlökin-6 (IL- 6)

IL-6, T hücresinden köken alan bir faktördür, özellikle B lenfositlerin aktif antikor üreten plazma hücrelerine farklılaşmasını sağlar. IL-6, sistemik inflamatuvar cevapların ve doku hasarının erken bir belirteci olup sitokin uyarımında merkezi aracı olarak düşünülür. IL-6, insan spermatozoasında çok sayıda immünolojik proliferatif süreçte yer alan çok işlevli bir sitokindir (Matalliotakis ve ark. 1998). Bununla birlikte Sertoli ve germ hücrelerinde tanımlanmış bir spermatogonyal büyüme faktörü gibi davranabilir. Bazı sitokinler varikosel varlığında spermin motilite, canlılık ve kapasitesini etkiler. Ayrıca Sertoli, spermatogonya, Leydig hücre sayılarını ve diğer sitokin düzeylerini azaltarak testosteron seviyelerini ve fertilitiyi azaltır (Habibi ve ark. 2015).

Genital yolun inflamatuvar hastalıkları sırasında ortaya çıkan en önemli interlökinlerin lökositopermi ile ilişkili IL-6 ve IL-8 olduğu öne sürülmüştür. Sitokinlerin spermatozoa fonksiyonları üzerindeki etkilerini açıkça gösteren bazı bulgular vardır; I) Interlökin-1 alfa, Interlökin-1 beta (IL-1 β) ve TNF- α , ROS oluşumunu artırarak sperm peroksidasyonunu uyarır; II) seminal plazma ve sperm membran lipid peroksidasyonu ile IL-6 düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon vardır; III) interferon-gama (IFN- γ) ve TNF- α 'nın spermatozoanın motilitesini azalttığı gösterilmiştir; IV) varikoseli olan infertil hastalarda yüksek IL-6 ve ROS seviyeleri, ayrıca azalmış total antioksidan kapasite düzeyleri görülmüştür; ve V) IL-6, IL-8 ve IL-11'in ortalama seviyeleri, genital infeksiyon ve oligo-teratoastenozoospermisi olan hastaların seminal plazmasında normal fertil erkeklerin seminal plazmasındakilere göre daha yüksektir (Martínez ve ark. 2007).

Sertoli hücresi gelişmekte olan germ hücrelerini besleyen özel bir testiküler somatik hücredir ve pubertasyondan sonra farklılaştığı düşünülür. Farklılaşma sürecinden geçilmemesi, infertiliteye sebep olmaktadır. Varikosel, Sertoli hücrelerinin aşamalı olarak bozulmasına ve tam olgunlaşmadan önce spermatojenik hücrelerin salınmasına neden olabilir. IL-6, immünolojik yanıtları ve inflamasyonu aktive eden, pro-inflamatuvar bir sitokindir. IL-6'nın hem germ hücresi hem de olgunlaşmamış Leydig hücre çoğalmasını etkilediği ve yetişkin Leydig ve Sertoli hücre fonksiyonunu modüle ettiği gösterilmiştir. IL-6'nın sperm fonksiyonu üzerindeki etkisi NO üretimindeki artışa bağlı olabilir. Leydig hücrelerinin başlıca fizyolojik rolü seminifer epitel büyümesi ve normal sperm aktivitesi için gerekli testosteron üretmektir. Yapılan bir

çalışmada varikosel indüksiyonunun Leydig hücre sayılarını ve testosteron hormonunu azalttığı gösterilmiştir (Habibi ve ark. 2015).

2.6.2. Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α)

Bağışıklık sisteminde, primer veya sekonder sinyaller olarak proinflamatuvar sitokinlerden, özellikle IL-1, IL-6 ve TNF- α salınır. Bağışıklık sistemi hücreleri bu sitokinlerin ana kaynağı olmasına rağmen, üreme yolundaki diğer hücreler de sitokin ekspresyonu yapabilir (Matalliotakis ve ark. 1998). Sitokinlerden, özellikle TNF- α , doku hasarı olduğunda lökositlerin dokulara hareketini kontrol eder. TNF- α esas olarak makrofajlar ve diğer mononükleer fagositler tarafından üretilerek inflamasyonun gelişmesinde ve diğer lökositleri aktive etmek gibi birçok işleve sahiptir. Ayrıca TNF- α , bir başka önemli inflamatuvar sitokin olan IL-1 ile fonksiyonları paylaşır (Azenabor ve ark. 2015). Yapılan bir çalışmada bazı sitokinlerin sperm peroksidasyonu üzerindeki etkisi incelenmiş ve TNF'nin sperm MDA üretimini artırdığı bildirilmiştir (Martínez ve ark. 2007). Bununla birlikte başka bir çalışmada da, TNF- α ve IL-1'in, fare tümörijenik fibroblast hücreleri ve mesangial hücrelerde hidroksil radikalleri ve lipid peroksidasyon üretimini arttırabildiği bulunmuştur (Böhler ve ark. 2000, Martínez ve ark. 2007). Yapılan çalışmaların sonuçlarına dayanarak, TNF- α 'nın anormal spermatogeneze yol açabilen Sertoli hücrelerinin kan-testis bariyerini ve apikal ektoplazmik yapısını değiştirerek spermatogenezi etkilediği bilinmektedir (Khademi Bami ve ark. 2017). Son yapılan çalışmalarda da azalmış sperm sayısı, sperm motilitesi ve sperm morfolojisi ile ilişkili olarak semende TNF- α 'nın arttığı gösterilmiştir. İnfertil erkeklerin seminal plazmasında TNF- α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinlerin klinik ilgisini değerlendirmek için tasarlanmış bir çalışmada, bu sitokinlerin seviyelerinin lökosit sayıları ile önemli ölçüde korele olduğu gösterilmiştir (Azenabor ve ark. 2015). TNF- α , diğer sitokinlerden farklı olarak testosteron aktivitesini düzenleyen androjenik reseptörlere de etki eder. Bu nedenle, TNF ailesinin sitokinleri, spermatogenez sırasında hücre sağkalımını desteklemektedir (Martínez ve ark. 2007). TNF- α spermatogenezi ve sperm fonksiyonunu, testosteron üretimini azaltarak ve / veya testis kısımlarındaki (Sertoli hücrelerinden) hormon oranını ayarlayarak da etkileyebilir (Havrylyuk ve ark. 2015).

2.7. Testosteron

Testosteron, testiste interstisyel Leydig hücrelerinde sentezlenen bir lipofilik steroidal moleküldür. Leydig hücreleri normalde kan damarları ve seminifer tübüller arasında kümeler

halinde bulunur ve erkeklerde testosteronun temel kaynağıdır. Testosteron seviyeleri Leydig hücrelerinin sayısına ve tek bir hücrenin testosteron üretme kapasitesine bağlıdır. Ayrıca yapılan çalışmalarda spermatogenezi doğrudan etkileyen varikoselin intratestiküler testosteron düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (Gill-Sharma 2018). Varikosel, testiküler sıcaklığın doğal olmayan artışı ve testiküler soğutma sisteminin bozulması yoluyla testosteron seviyesinde bir azalmaya yol açabilir. Ayrıca varikosel, oksidatif stres ve androjenlerin sentezindeki bozulma ile de testosteron seviyelerini azaltabilir (Alizadeh ve ark. 2018).

2.8. Nükleer Faktör Kappa-B (NF-κB)

NF-κB yolu, büyük ölçüde NF-κB'nin sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri dahil olmak üzere proinflamatuvar genlerin ekspresyonundaki rolüne dayanan prototipik proinflamatuvar bir sinyal yolu olarak kabul edilmiştir. NF-κB yolu İnflamatuvar yanıtta önemli katkıları olan proinflamatuvar sitokin üretimini, lökosit göçünü veya hücre sağkalımını düzenler. Ancak, NF-κB'nin antiapoptotik fonksiyonları, epitelyal hücre sağkalımı ve mukozal bariyer bütünlüğü durumunda hem inflamasyona karşı koruyabilir hem de kalıcı lökosit aktivasyonu yoluyla inflamatuvar yanıtı sürdürebilir (Lawrence 2009).

Yapılan çalışmalar, NF-κB'nin inflamasyon sürecinde transkripsiyon faktörü olarak önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Ayrıca oksidatif stresin, mitojen aktive protein kinaz ve NF-κB dahil olmak üzere transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu uyardığı bilinmektedir. NF-κB'nin ROS ile aktivasyonu, hücre içi adhezyon molekülü-1, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), interlökin-1beta (IL-1β), IL-6, TNF-α, vb. birçok proinflamatuvar molekülden sorumludur (Ozcan L ve ark. 2016). Yapılan bir çalışmada iskemi reperfüzyon (İR) ile NF-κB aktivasyonunun iNOS ekspresyonlarını aktive ettiğini ve bunun intratestiküler NO ve testiküler hasarın artmasına neden olduğunu tespit etmişler ve NF-κB inhibitörü kullanılarak bu hasarların önlenmesinin mümkün olabileceğini öne sürmüşlerdir (Ozcan L ve ark. 2016). Son çalışmalar ise böbrek, karaciğer ve pankreas gibi organların yaralanmasında NF-κB'nin rolünü göstermektedir. Bu nedenle, testislerdeki oksidatif hasara NF-κB'nin rolü giderek daha fazla dikkat çekmiştir (İlbey ve ark. 2009).

2.9. Varikoselde Tanı ve Tedavi

2.9.1. Varikoselde Tanı

Genellikle asemptomatik olan varikosellerin tanısı infertilitenin araştırıldığı durumlarda bulunur (Leslie ve Siref 2018). Dünya sağlık örgütü (WHO) kriterlerine göre varikoselde ilk tanı klinik muayene ile yapılır muayene bulgularına göre derecelendirilen klinik varikoselde; fiziki muayenede kişide simetrik olmayan testisler, skrotal cilt altında genişlemiş damarlar ve kıvrılmalar gözle görülebilir şekildeyse ve spermatik kord palpe edildiğinde kalınlaşması kolaylıkla saptanabiliyorsa bu durum grade (derece) 3, sadece spermatik kordun palpe edilebilirliğiyle saptanmışsa grade 2, venlerin genişlemesinin belirgin olmadığı durumlarda hastaya valsalva manevrası yaptırılarak tespit edilen varikozel ise grade 1 olarak adlandırılır (Dubin ve Amelar 1970, Niederberger 2001). Ayrıca fiziki muayeneyle anlaşılamayıp sadece radyolojik yöntemlerle saptanabilen varikozele ise subklinik varikozel denir. Varikoselin belirlenmesinde fiziki muayene yeterli olmasına rağmen skrotumun yapısı, kordon kısalığı, obezite gibi durumlarda yeterli muayene yapıp yapılamadığına dair kararsızlık varsa görüntüleme yöntemleri kullanılabilir.

2.9.2. Varikoselde Tedavi

Varikoselin tedavisinde en sık karşılaşılan yaklaşımlar cerrahi ve Perkütan embolizasyondur. Cerrahi yaklaşım varikozektomi, retroperitoneal abdominal laparoskopi, infra-inguinal, kasık veya intraskrotalin altında alt inguinaldır. Perkütan embolizasyon da genellikle girişimsel radyoloji ile femoral venden, vena kavadan, sol renal vene lateral olarak ve daha sonra spermatik vene inferior olmak üzere bir kateter geçirmeyi kapsar. Bazı pediatrik ürologlar, spermatik venlerin çok yakın bir sol renal ven içine yerleştirilmesinin kontrolünü sağlayan retroperitoneal, laparoskopik bir yaklaşımı tercih ederler. Bununla birlikte, bu teknik nispeten yüksek bir nüks oranına (%15) sahiptir. Genellikle erkeklere seminal ve hormonal parametreleri etkili şekilde iyileştirdiği kabul edilen varikozektomi adı verilen cerrahi prosedüre uymaları tavsiye edilir (Hsiaove ark. 2013, Missassi ve ark. 2017). Ancak ameliyat öncesi ve sonrası veri yetersizliği, eksik metodoloji ve çalışmalarda uygulanan kriterlerin yetersizliğinden dolayı fertilitate potansiyeli üzerine etkinliği tartışmalıdır (Masson ve Brannigan 2014). Bu sebepten dolayı ve ameliyattan daha düşük riskler sunduğundan çalışmalarda antioksidan tedaviler araştırılmaktadır (Mendes ve ark. 2016, Missassi ve ark. 2017).

2.10. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Antioksidanlar, genel olarak ROS üretimini kontrolde tutan, temizleyen ve durduran veya ROS'un etkilerini nötralize eden bileşiklerdir (Adewoyin ve ark. 2017). Ayrıca antioksidanlar, düşük konsantrasyondaki oksidatif süreci önemli ölçüde engelleyen veya geciktiren, çoğu zaman kendilerini oksitleyen madde olarak da tanımlanır (Sen ve Chakraborty 2011). Antioksidanlar serbest radikal toplayıcılar olarak hareket ederler ve çeşitli hastalıklara yol açan oksidatif reaksiyonları önleyebilirler. Serbest radikalleri nötralize etmek ve redox dengesini koruyarak vücudu korumak için endojen ve ekzojen antioksidanlar kullanılır (Sen ve Chakraborty 2011).

2.10.1. Endojen Antioksidanlar

Hücrelerdeki endojen bileşikler, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir.

2.10.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin nötralizasyonunda doğrudan rol oynayan başlıca antioksidan enzimler şunlardır: süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve mitokondriyal sitokrom oksidazdır (Pham-Huy ve ark. 2008).

Süperoksit dismutaz (SOD); en önemli endojen antioksidanlardan olup O_2^- radikalinin H_2O_2 ve O_2 'e değişimini katalizleyen bir enzimdir ve insanlarda yaygın olarak sitozol, mitokondri ve ekstrasellüler sıvılarda olmak üzere 3 formda bulunabilir. Sitozoldeki SOD, bakır (Cu) ve çinko (Zn) içeren sitozolik dimerik iki eş alt birimlerden oluşur (Cu/Zn SOD) ve bakırın katalitik, çinkonun yapısal fonksiyonu bulunmaktadır ve hücrelerde yaygın olarak bulunan SOD formudur. Mitokondride ise mangan (Mn) içeren (Mn SOD) bulunur dört eşit alt ünitelerden oluşur. Ekstrasellüler SOD ise her alt ünitesinde enzimatik aktivite için gerekli bir Cu ve Zn içerir (Sen ve Chakraborty 2011) ve enzimatik olarak ekstrasellüler düzeyde süperoksiti nötralize eden tek antioksidan enzimdir (Gao ve ark. 2008).

Katalaz (CAT); Dört polipeptit zincirinin bir tetrameri olup enzimin hidrojen peroksit ile reaksiyona girmesini sağlayan dört porfirin hem grubu içerir ve büyük ölçüde peroksidazlarda

hücre içinde bulunurlar. Katalaz, her saniye milyonlarca H_2O_2 'nin su ve oksijene iki aşamalı dönüşümünü katalizler (Sen ve Chakraborty 2011, Adewoyin ve ark. 2017).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px); hücrelerin stoplazmasında yer alan GSH-Px enzimleri selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere iki tipte bulunur. Selenyum (Se) bağımlı GSH-Px'in protein yapıda dört alt birimi vardır ve her alt birimi aktif Se atomu ve NADPH içererek H_2O_2 'nin neden olduğu oksidatif hasara karşı hücreyi koruyarak H_2O_2 'den hidroksil radikalinin oluşumunu engeller. Se-bağımsız GSH-Px (çoklu glutasyon S-transferazlar (GST)) iki alt üiteden oluşan dimerik proteinler olarak bulunur ve H_2O_2 ile etkisiz olup sadece organik hidroperoksitlerin indirgenmesini katalize eder. GST formu, oksidatif DNA-bazları, lipit hidroperoksitler gibi lipit peroksidasyon ürünlerini ve bunların hidroksialkenler, malondialdehidler ve baz propenleri gibi türevlerini devre dışı bırakabilir. Sonuç olarak GSH-Px enzimleri lipithidroperoksit ya da hidrojen peroksitlerin varlığında glutasyonun (GSH) oksidasyonunu katalizleyerek lipit peroksidasyonundan kaynaklanan hasarın onarılmasında rol oynayabilir (Sen ve Chakraborty 2011, Karabulut ve Gülay 2016, Adewoyin ve ark. 2017).

Glutasyon Redüktaz (GR); GSH'nin dönüştürülmesi için gerekli olan flavoprotein enzimi ve önemli bir hücrel antioksidandır. Oksitlenmiş glutasyon (GSSH), bir elektron donörü olarak NADPH kullanan GR enzimi varlığında GSH'ye geri dönüştürülür. GSH / GSSG oranı, bir organizmada oksidatif stresinin önemli bir genel ölçüsüdür ve çok yüksek GSSG konsantrasyonu oksidatif olarak birçok enzime zarar verebilir (Sen ve Chakraborty 2011).

Solunum zincirinin son enzimi olan mitokondriyal sitokrom oksidaz; süperoksit radikalini suya dönüştürerek detoksifiye eder fakat çoğu kez süperoksit düzeyi sitokrom oksidazın antioksidan kapasitesini aşar, bu durumda diğer enzimler devreye girer (Sen ve Chakraborty 2011, Adewoyin ve ark. 2017).

2.10.1.2. Enzim yapıda olmayan Antioksidanlar

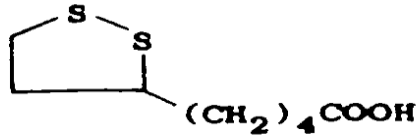
Enzimatik olmayan antioksidanlar metabolik ve besinsel antioksidanlar olarak ayrılır. Metabolik antioksidanlar vücutta glutasyon, karotenoidler, seruloplazmin, melatonin, urat, bilirubin, transferrin, laktoferrin, albumin, glikoz vb. gibi metabolizma tarafından üretilen antioksidanlardır (Pham-Huy ve ark. 2008).

2.10.2. Ekzojen Antioksidanlar

Besinsel olup metabolizma tarafından üretilmeyen (Vitamin E, Vitamin C, β -karoten, Folik Asit) antioksidanlardır (Özcan ve ark. 2015, Karabulut ve Gülay 2016).

2.11. Alfa Lipoik Asit

Alfa lipoik asit (α LA; 1,2-ditiolan-3-pentanoik asit), her türlü prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan disülfid yapısına sahip sekiz karbonlu bir endojen kofaktördür. (Ozbal ve ark. 2012, El-Beshbishy ve ark. 2014). Oktanoik asit türevi bir yağ asidi olan lipoik asit terapötik etkisi, antioksidan aktivitesi ve oksidatif hasarı onarma kabiliyeti ile ilişkilendirilen doğal olarak oluşan bir nutrasötik maddedir. Hızla daha güçlü antioksidan biçimi olan DHLA'ya dönüşerek dokulara kolayca dağıtılır ve birikir (Scott ve ark. 1994). Küçük boyutu ve yüksek lipofilitesi nedeniyle biyolojik membranları kolayca geçer ve hem lipit hem de sulu ortamlarda serbest radikalleri temizler (Lebda ve ark. 2014). Ayrıca α LA serbest radikallere karşı yüksek reaktiviteye sahip olup azalmış glutatyonun doku seviyelerini arttırarak ve lipid peroksitlerin oluşumunu önemli ölçüde azaltarak oksidatif stresin azaltılması ve normal antioksidan enzim profilini yeniden kazandırma kabiliyeti ile karakterizedir (El-Beshbishy ve ark. 2014).

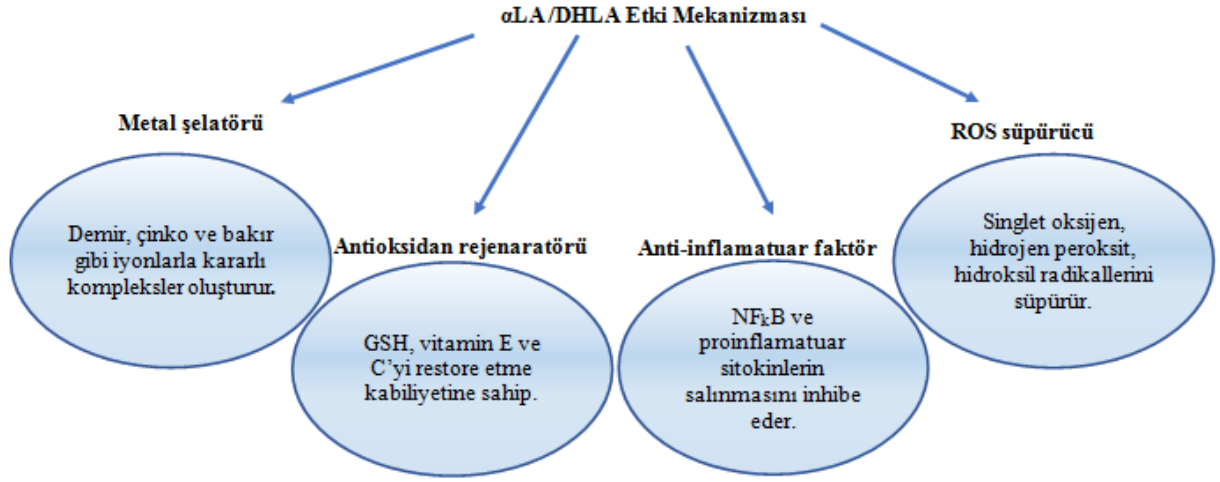


α -LIPOIC ACID

Şekil2.4. Alfa lipoik asitin yapısı (Scott ve ark. 1994)

2.11.1. Alfa Lipoik Asitin Fonksiyonları

Hücrelerdeki α LA, lipoamid dehidrogenaz ile NADH bağımlı bir reaksiyonla indirgenir ve mitokondri içinde DHLA oluşturur. α LA'nın oksitlenmiş ve indirgenmiş (DHLA) formlarının her ikisi de antioksidan özelliklere sahiptir. Metabolizmada α LA ve DHLA metal şelatör, antioksidan rejenaratörü, antiinflamatuvar faktör, ROS süpürücü ve bir kofaktör olarak görev alırlar (Ambrosi ve ark 2018).



Şekil2.5. α LA / DHLA'nın etki mekanizmaları (Ambrosi ve ark 2018).

2.11.1.1. Alfa Lipoik Asidin Kofaktör Rolü

Alfa lipoik asit karbonhidratlar, proteinler ve yağların enerji metabolizmasında rol oynar. α LA molekülü R ve S olmak üzere iki enantiomer formu içerir. α LA'nın DHLA'ya indirgenme reaksiyonlarında, mitokondriyal NADH bağımlı dihidrolipoamid dehidrogenaz enzimi, R formu için önemli bir aktivite gösterirken sitozolik NADPH bağımlı GR ise S stereoizomerine karşı aktivite göstermektedir. Bununla birlikte mitokondride lizin kalıntılarında sadece R formu bağlanarak kofaktör görevi görür (Haugaard ve ark. 2000, Seifar ve ark. 2017).

α LA piruvat dehidrogenaz (PDH), α -ketoglutarat dehidrogenaz (α -KGDH) ve dallı zincirli keto-asit dehidrogenaz içeren mitokondriyal kompleks, biyoenerjetik dehidrogenaz enzimleri için gerekli bir kofaktördür. Ayrıca PDH kompleksinin indirgenmesi ile α LA'nın indirgenmiş şekli DHLA, potansiyel olarak kolinasetil transferaz aktivitesini de artırır. Bu nedenle α LA, enerji ve amino asit oluşumunun metabolizmasında temel bir substrattır (Bustamante ve ark. 1998).

2.11.1.2. Alfa Lipoik Asit ve Antioksidan Rolü

Alfa lipoik asit, serbest radikaller ve reaktif ilaç metabolitleri dahil olmak üzere endojen elektrofillerle reaksiyona giren, tiyol içeren bir nükleofildir (Prahalthan ve ark. 2006). Hem okside hemde redükte lipoik asit formları hidroksil ve nitrik oksit radikalleri, peroksinitrit anyonları, hidrojen peroksitin yakalanması ve tek oksijen atomlarının söndürülmesi ile

bilinmektedir (Ozbal ve ark. 2012). α LA ve DHLA'daki ditiol halkasının varlığı, onları doğal ve güçlü antioksidanlar yapar (Seifar ve ark. 2017). Tiyoller, ksenobiyotik bileşiklerin detoksifikasyonunda, ROS ve serbest radikallerin antioksidasyonunda önemli bir rol oynayan hücrel antioksidan sistemin ana bileşenleridir. Bu yüzden α LA, serbest radikallerle oldukça reaktiftir ve yapılan bir çalışmada GSH konsantrasyonlarını arttırabildiği, lipid peroksidasyonunu azaltarak oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Aly ve ark. 2009, Prahalthan ve ark. 2006). GSH, hücre içi protein yapıda olmayan sülfidridir ve azalması durumunda, hücrelerin oksidatif strese duyarlılığı da artmaktadır (Aly ve ark. 2009). Fosfolipit hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PHGPx), glutatyon redoks döngüsünün bir bileşenidir ve özellikle testiste aktivitesi yüksek olup membranlardaki fosfolipit hidroperoksiti metabolize ederek membranların oksidatif hasara karşı korunmasından sorumludur (Imai ve Nakagawa 2003). Sperm çekirdeğinde bulunan PHGPx, yoğunlaşmış kromatin stabilizasyonunda ve sperm DNA'sının oksidasyondan korunmasında önemli bir rol oynar ve böylece sperm olgunlaşmasına yardımcı olur (Pfeifer ve ark. 2001, Maiorino ve ark. 2005). Dolayısıyla PHGPx aktivitesindeki bir dengesizlik, DNA'ların bütünlüğünü bozar ve fertilizasyon potansiyeli açısından risk oluşturan anormal spermatozoanın oluşmasına yol açar (Prahalthan ve ark. 2006).

Ayrıca α LA; glutatyon, tokoferol ve askorbik asit gibi diğer doğal antioksidanların seviyelerini arttırarak hücrel antioksidan savunmasını sürdürmek için dolaylı olarak da hareket edebilir (Ozbal ve ark. 2012).

2.11.1.3. Alfa Lipoik Asit ve Antiinflamatuvar etkisi

İnflamasyon, vasküler dokularda zararlı ajanlar olan patojenlere veya irritanlara verilen biyolojik yanıtta kaynaklanır ve organizmanın zararlı uyarınları uzaklaştırması ve çevreleyen dokuyu koruduğu bir girişimdir (Seifar ve ark. 2017). Yüksek düzeyde oksidatif stres, kronik inflamasyona neden olmaktadır. ROS aracılı inflamasyon; NF- κ B , aktivatör protein 1 (AP1) ve MAPK aktivasyonunu indükler. NF- κ B aynı zamanda TNF- α , IL-6, siklooksijenaz 2 ve iNOS gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini kolaylaştırır (Tibullo ve ark. 2017). Redoks duyarlı bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, endotelial hücrelerde sitokinlerin, iç doku faktörlerinin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu düzenleyerek inflamasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalar α LA'nın hücrelerde NF- κ B sinyal iletimini değiştirdiğini göstermektedir. Ayrıca inflamasyonun bir işareti olan TNF- α , endotelial hücrelerdeki NF- κ B

transkripsiyonunu aktive ederek çeşitli sitokinleri ve diğer inflamatuvar mediatörleri etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada sitokinlerin neden olduğu inflamasyonda α LA'nın NF- κ B'nin bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Seifar ve ark. 2017). Bununla birlikte başka bir çalışmada α LA'nın NF- κ B, TNF- α ve IL-6'dan kaynaklanan inflamatuvar aktiviteyi bastırdığı ve antiinflamatuvar proteinlerin artışından sorumlu olduğu gösterilmiştir (Tibullo ve ark. 2017).

2.11.1.4. Alfa Lipoik Asit ve Metallerin Şelatlanması

Fizyolojik koşullar altında, demir (Fe), çinko (Zn) ve bakır (Cu) gibi metal iyonları, bazı proteinlerin normal fonksiyonu için önemli ve vazgeçilmez kofaktörlerdir. Bununla birlikte, patolojik koşullar altında serbest radikal üretimine katılabilirler ve bu metallerin eksikliği veya fazlası, çeşitli hastalıkların ilerlemesine yol açabilir. Hem α LA hem de DHLA'nın, iyonlarla kararlı kompleksler oluşturarak metal iyonlarını şelatlayabildiği gösterilmiştir (Tibullo ve ark. 2017, Seifar ve ark. 2017). Mekanizmadan bağımsız olarak, α LA'nın geçiş metallerinin aracılık ettiği hücresel toksisitenin olduğu hastalıklarda anlamlı bir terapötik potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca, α LA ve DHLA ağır metal detoksifikasyonunda da rol oynamaktadır (Tibullo ve ark. 2017).

2.11.2. Alfa Lipoik Asit ve Klinikte Kullanımı

Yapılan bazı klinik çalışmalarda; özellikle diyabet, ateroskleroz, diyabetik polinöropati, katarakt, nörodejeneratif hastalıklar ve AİDS gibi patolojik durumlarda α LA'nın pozitif terapötik etkisi gösterilmiştir. Ayrıca iskemi reperfüzyon hasarı ile ilişkili olarak hepatik rezeksiyon ve böbrek transplantasyonu hastalarında ön tedavi olarak hem donör hem hasta üzerindeki klinik etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur (Ambrosi ve ark. 2018).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney hayvanları seçimi

Bu çalışmada, 40 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edildi. Yaş olarak 12-16 haftalık olan erişkin sıçanların ağırlıkları 300-400 gr arasında değişmekte idi. Çalışma Temmuz 2016 ile Eylül 2016 arasında yapıldı.

Sıçanlar her grupta 10 adet olacak şekilde 4 farklı gruba rastgele olarak ayrıldı. Tüm sıçanlar 20-24 °C oda sıcaklığında, 12 saat karanlıkta kalmaları ve 12 saat ışık almaları sağlanarak standart rat yemiyle beslenip şehir içme suyu verilerek her kafeste 5 hayvan olacak şekilde saklandılar. Çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi. Deney gerçekleştirildikten sonra varikoselin testislere verdiği hasarı gözlemlemek ve α LA uygulamasının etkisini belirlemek için 6 hafta beklendi. 6 hafta içinde toplam 4 sıçan öldü. Çalışma protokolü ve deneysel yöntem Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylanmış olup çalışma süresince etik kurallara uyulmuştur (2015/8-3).

3.2. Deneysel Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmada 40 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı ve sıçanlar 4 gruba ayrıldı.

I.Grup (n=10); Kontrol grubu, standart sıçan yemi ve şehir şebeke suyu ile kısıtlama olmadan 6 hafta boyunca beslendi ve bu gruba çalışma süresince herhangi bir işlem uygulanmamıştır.

II. Grup (n=10); Shame grubu, standart sıçan yemi ve şehir şebeke suyu ile kısıtlama olmadan 6 hafta boyunca beslendi ve bu gruba batın açılması yapılarak varikosel modeli oluşturulmadan kapatıldı.

III. Grup (n=10); Varikosel grubu, standart sıçan yemi ve şehir şebeke suyu ile kısıtlama olmadan 6 hafta boyunca beslendi ve bu grupta deneysel olarak varikosel modeli oluşturuldu.

IV. Grup (n=10); Varikosel + Alfa lipoik asit grubu, standart sıçan yemi ve şehir şebeke suyu ile kısıtlama olmadan 6 hafta boyunca beslendi ve deneysel olarak varikosel modeli oluşturulduktan sonra 6 hafta boyunca 100 mg/kg/gün lipoik asit tedavisi intraperitoneal olarak verildi. Çalışma sonunda tüm gruplar anestezi altında kalpten kan alma yöntemiyle sakrifiye

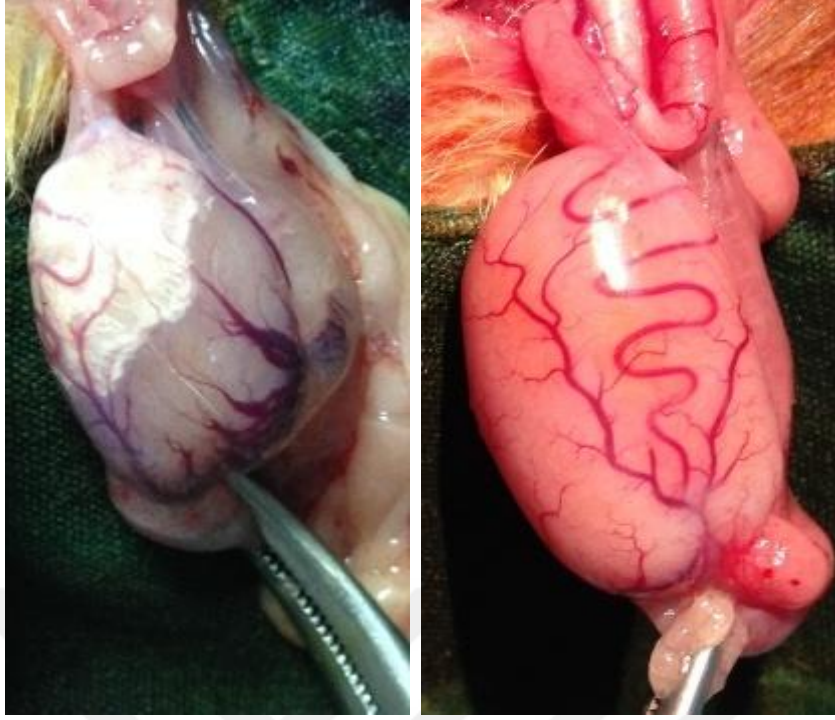
edilmiştir. Deneklerin anestezisi 80 mg/kg ketamin ve 12 mg/kg ksilazin verilerek sağlandı ve gerektiğinde idame doz verildi.

3.3. Varikosel Modelinin Oluşturulması

Deneysel varikosel modeli; Deneklere 80 mg/kg ketamin ve 12 mg/kg ksilazin verilerek anestezisi altında gerçekleştirildi. İlaç enjeksiyonundan 15 dakika sonra karın ön duvarındaki tüyler traş edildi. Cerrahi alan açığa çıkarıldıktan sonra %10 Povidon iyodür dezenfektan ile uygun saha temizliği yapıp yalnızca cerrahi alan açıkta kalacak şekilde batın steril örtülerle kapatılarak orta hattın yaklaşık 3-4 cm'lik insizyon ile laparotomi yapıldı.

Karın içindeki organlar görünür hale geldikten sonra, kontrol grubu dışındaki gruplarda iç organlar paketlenerek sağa çekilerek sol böbrek, adrenal ve renal venler ile sol spermatik venin sol renal vene girişi görünür hale getirildi. Varikosel ve V+aLA gruplarında dikkatli bir künt diseksiyon ile spermatik ve adrenal venlerin sol renal vene girdiği medial yüz yağ ve bağ dokularından temizlendi. Sol renal venin arka yüzünün körleme dönülmesi sırasında oluşabilecek kanamalar bir süre yapılan basınçlı tamponlama ile durdurularak alanın kirlenmesi engellendi. Renal ven ligasyonunun yapılacağı bölüme 4.0 ipek sütür yerleştirilerek 0,85 mm çaplı metal tel üzerinde daraltma işlemi yapıldı. Ven daraltıldıktan sonra tel çekildi. Böylece damarın dış çapının 1mm ye düşürülmesi sağlandı. Bu daraltma işlemi darlığın lateralinde artmış damar içi basınca neden olurken, bu basıncın spermatik vene aktarılması varikosel oluşumuna neden olur.

Bu metod ile insanda varikoselin sebeplerinden kabul edilen sol renal venin aort ve süperior mezenterik arter arasında baskıya maruz kalmasıyla oluşan 'fındıkkıran' fenomeni taklit edilir. Abdominal boşluk gentamisin sülfat (10 mg/ml) ile yıkanarak hijyen sağlandı. Takiben abdominal duvar ve ön abdominal kaslar 4.0 kromik katküt ile ayrı ayrı dikilerek anatomik planda kapatıldı (Ozbek ve ark. 2000, Soylu ve ark. 2004).



Şekil3.1. Varikosel grubu sol testis ve kontrol grubu sol testis görüntüsü

3.4. Kan ve Doku örneklerinin Alınması ve Saklanması

Her grupta sıçanlar tartıldıktan sonra anestezi altında kalpten alınan kanlar jelli biyokimya tüplerine konularak 4000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları ependorflara alınarak porsiyonlandı ve biyokimyasal analizler yapılana kadar -80 °C'de saklandı. Sol testis ikiye bölünerek yarısı sıvı azot tankına alındı ve deney sonunda oksidatif stres parametrelerine bakmak üzere -80 °C'de saklandı, testis dokusunun diğer yarısı histopatolojik inceleme için içerisinde %10'luk formaldehit bulunan ağzı kapaklı kaplara koyuldu.

3.4.1. Doku Homojenizasyonu

3.4.1.1. Fosfat tamponunun hazırlanması

pH:7.00 olacak şekilde tampon çözelti iki ayrı solüsyonun karışımıyla hazırlandı.

I.Solüsyonu hazırlamak için NaH_2PO_4 'ten 6,805 gr tartılarak 1000 ml distile suda çözüldü.

II.Solüsyon için $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 17,907 gr tartılarak 1000 ml distile suda çözüldü.

Tampon çözelti için 413 ml I. solüsyondan 587 ml II. solüsyondan alınarak karıştırıldı ve pH:7.00 olacak şekilde ayarlandı.

3.4.1.2. Bıçaklı Homojenizatör ile Doku Homojenizasyonu

Homojenizasyon için kullanılacak tampon miktarı doku ağırlığının 6 katı olacak şekilde hesaplanmaktadır bu yüzden her doku homojenizasyondan önce tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi. Tartım sonrası doku buz dolu kap içindeki tüpe koyuldu ve eklenmesi gereken tampon miktarının yarısı koyularak önce 2 dk homojenize edildikten sonra tamponun diğer yarısı da eklenerek doku tamamen homojenize olana kadar işleme devam edildi.

Her doku için MDA ve protein tayinleri yapılmak üzere oluşan homojenatlardan 700 μL alınarak ependorflara porsiyonlandı ve çalışma gününe kadar -80°C 'de saklandı.

CAT ve GSH-Px ve süpernatant protein tayini yapmak için geriye kalan homojenatlar 10000 g'de 40 dk $+4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar porsiyonlanarak çalışma gününe kadar -80°C 'de saklandı.

3.5. Biyokimyasal Analizler

3.5.1. Protein Tayini

Protein miktarını belirlemek için Bradford protein tayin yöntemi uygulandı. Bu yöntemde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası kullanıldı. Bradford testi, Coomassie Brilliant Blue G-250'nin proteine bağlanmasını içeren bir protein belirleme yöntemidir. Bu deney, 1 saat boyunca iyi bir renk kararlılığı ve yaklaşık 2 dakika içinde neredeyse tamamlanan boya bağlama prosesi ile çok tekrarlanabilir ve hızlıdır. Anyonik boyanın katyonik proteinlere bağlanarak oluşturduğu kompleks 595 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon göstermektedir (Bradford 1976).

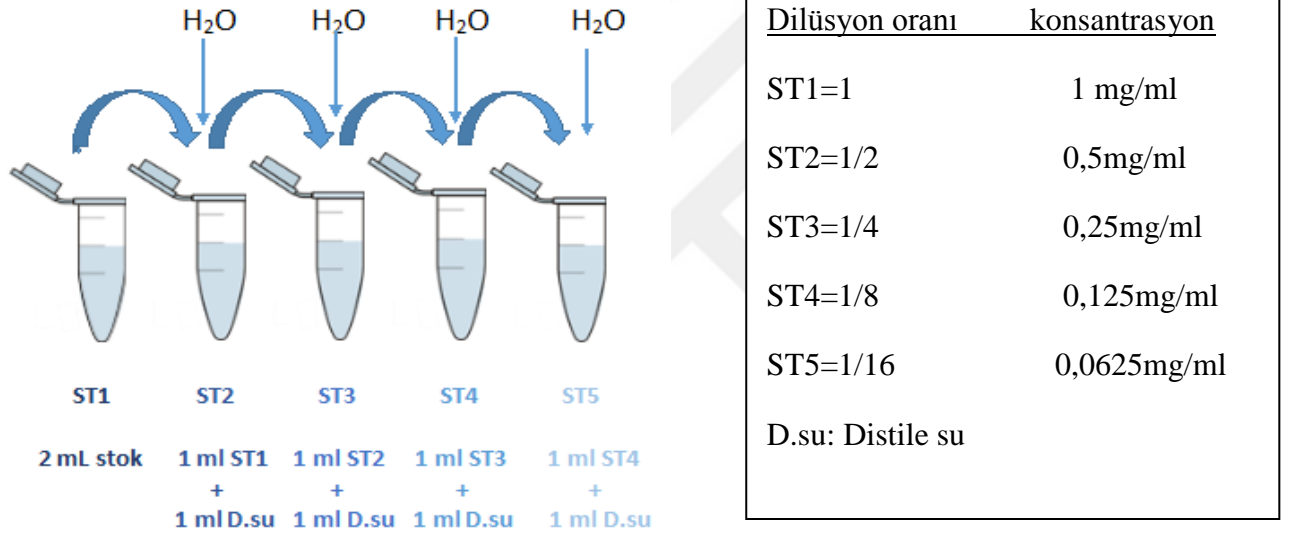
Bradford protein tayin yöntemi ile dokuda protein tayini yaparken standart grafiği çizilebilmek için öncelikle stok standart çözelti ve dilüe standart çözeltiler hazırlandı.

3.5.2. Stok Standart ve Standart çözeltilerin Hazırlanması

Stok çözelti hazırlamak için bovine serum albumin (BSA) kullanıldı.

1 mg/ml konsantrasyonda 5 mL stok standart çözelti hazırlamak için; 5 mg BSA tartıldı ve 5 mL distile suda çözüldü. Hazırlanan Standart çözeltinin doğruluğunu test etmek için 280 nm'deki absorbansı ölçüldü ve 0,66-0,75 aralığında bir absorbans saptandı, bu absorbans değeri hazırlanan stok standart çözeltinin doğruluğunu göstermektedir.

Standart (ST) çözeltilerin hazırlanması;



Şekil3.2. BSA ile hazırlanan stok çözeltinin dilüsyonu

3.5.3. Standart çözeltilerin protein ölçümü

Brillant Blue G-250

600 µL

Standart

20µL

Hazırlanan standart çözeltiler belirtildiği gibi pipetlendi ve vortekslendi. Karanlık odada 10 dakika inkübasyondan sonra 595 nm'de absorbansları ölçüldü. Absorbans ve konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon eğrisindeki formülden yararlanarak ml'deki protein miktarı (mg/ml) hesaplandı.

3.5.4. Örneklerin Protein Ölçümü

Doku örneklerinin homojenizasyonu sonucu elde ettiğimiz homojenatların ve süpernatantların protein miktar tayini için; bradford prosedürü uygulanmadan önce homojenatlar 50 kat, süpernatantlar 20 kat dilüe edildi. Konsantrasyon hesaplanırken bu dilüsyon katsayıları ile çarpılarak gerçek konsantrasyonlar elde edildi.

Brillant Blue G-250

600 µL

Örnek

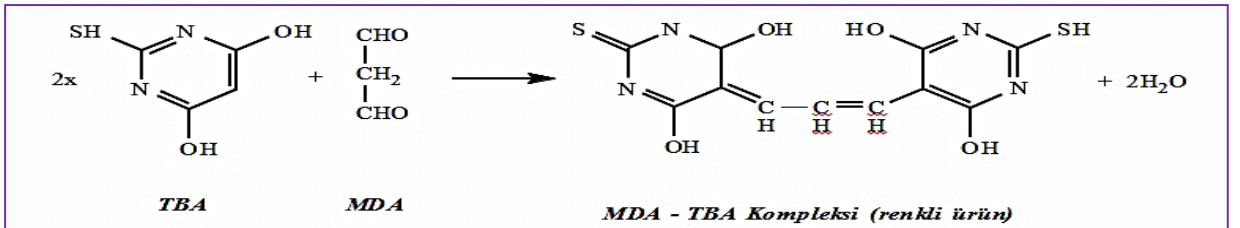
20µL

Her örnek belirtilen miktarlarda pipetlendi ve tamamen karışması için vortekslendi. Karanlık odada 10 dakika inkübe edilip 595 nm’de absorbans değerleri kaydedildi. Kalibrasyon eğrisindeki formülden yararlanarak ml’deki protein miktarı (mg/ml) hesaplandı. Elde edilen sonuç gr dokuya oranlanarak gram dokudaki protein miktarı bulundu.

3.5.5. Dokuda Yapılan Analizler

3.5.5.1. Malondialdehid (MDA) Miktarının Tayini

Lipit peroksidasyonun bir ürünü olan MDA, Hammode ve arkadaşları’nın modifiye ettiği yöntemle çalışıldı. Bu yöntem çift kaynatma prensibine dayanır. İlk kaynatmada proteinlere bağlı MDA çöktürülür ve MDA serbestleşirken ikinci kaynatmada ise total MDA, TBA ile renkli kompleks oluşturacak şekilde reaksiyona girer. TBA ve MDA’nın oluşturduğu renkli kompleks 532 nm’de maksimum absorbans gösterir ve bu absorbans değerleri MDA konsantrasyonuyla doğru orantı göstermektedir (Wasowicz ve ark. 1993).



Şekil3.3. MDA’nın TBA ile reaksiyonu sonucu oluşan renkli kompleks (TBA-MDA) yapısı

Deneyde kullanılacak reaktiflerin hazırlanması;

-10g %10'luk trikloroasetikasit (TCA) tartıldı ve 100 ml distile suda çözdürüldü.

-0,675g %0,675'lik TBA tartıldı 100ml distile suda çözdürüldü.

Deney aşaması:

MDA tayini için kapaklı cam tüpler kullanıldı, deneyde 90°C'de 2 kez 15'er dakika inkübasyon aşaması olduğu için grup isimleri ve numaraları silinmeyecek şekilde cam tüplere ve kapaklarına dikkatlice yazıldı.

kör tüpüne 500 µl distile su

numune tüpüne 500 µl örnek (homojenat)

+

+

2500 µl TCA eklendi

2500 µl TCA eklendi

Eklenen TCA'dan sonra örnekler ve kör tüpü vortekslenerek tüplerin ağzı kapatıldı ve 90°C benmaride 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda deney tüpleri hazırlanmış olan soğuk su dolu kaba koyularak soğutuldu. Daha sonra 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Tüpler sarsılmadan çökelti üzerindeki süpernatantdan pipetle 2 ml alınarak hazırlanmış temiz tüplere alındı.

2 ml kör

2ml süpernatant

+

+

1ml TBA eklendi

1ml TBA eklendi

Eklenen TBA'dan sonra tüm tüpler vortekslenerek ikinci kez 90°C benmaride 15 dakika inkübasyona bırakıldı, inkübasyon sonunda örneklerin renginin değiştiği gözlemlendi. Daha sonra tüpler soğuk suya koyularak soğutuldu ve spektrofotometrede 532 nm dalga boyuna ayarlandı ve ölçüme kör tüpünden başlandı, körün absorbansı sıfırlandıktan sonra kör çıkarılarak örneklerin ölçümü yapıldı ve absorbansları kaydedildi.

3.5.5.2. MDA Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

1,1,3,3 tetrametoksiopropan MDA stok standartından 10 µl alındı ve 100 ml distile su üzerine pipetlenerek stok standart çözelti hazırlandı.

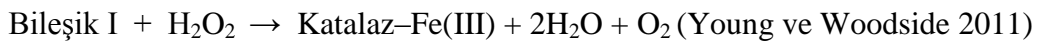
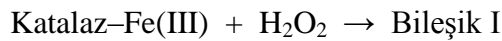
Stok çözelti ST1=1/80, ST2=1/40, ST3=1/20, ST4=1/10, ST5=1/8 oranlarında olacak şekilde distile su ile seyreltilerek sırasıyla 7.5, 15, 30, 60, 75 nmol/ml derişiminde standart çözeltiler hazırlandı.

ST1	ST2	ST3	ST4	ST5
100 µl stok	100 µl stok	100 µl stok	100 µl stok	100 µl stok
+	+	+	+	+
7900µl D.su	3900 µl D.su	1900 µl D.su	900 µl D.su	700 µl D.su

Deney başlamadan hazırlanmış olan standartlara deney prosedürü uygulanarak bir örnek gibi muamele edildi, konsantrasyonları bilinen çözeltilerin absorbansları ölçülerek standart grafiğı çizildi ve grafikten elde edilen formülden faydalanarak MDA miktarları belirlendi daha sonra protein miktarına oranlanarak hesaplama yapıldı.

3.5.5.3.Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz enziminin aktivitesi Aebi'nin metoduna göre belirlenmiştir (Aebi ve ark.1974). H₂O₂'in maksimum absorbans verdiği dalga boyu 240 nm'dir. Katalaz, deney ortamında eklenen H₂O₂'in su ve oksijene iki aşamalı dönüşümünü katalize etmektedir. Bu dönüşüm absorbans azalmasına neden olmaktadır ve bu azalma katalaz enziminin aktivitesiyle doğru orantılıdır. Katalaz enziminin iki aşamalı tepkimesi;



Deneyde homojenizasyon için hazırladığımız fosfat tamponu (pH:7) kullanıldı ve H₂O₂ çözeltisi hazırlandı.

H₂O₂ çözeltisinin hazırlanışı; H₂O₂ ışıktan oldukça fazla etkilendiği için çok ışık almayan bir ortamda çalışıldı ve ilk önce reaktif şişesi hazırlandı. Renkli cam veya plastik şişe alüminyum folyoyle kaplanarak ışık geçirmemesi sağlandı. Daha sonra spektrofotometre fotometrik ölçümde 240 nm'ye ayarlandı. Reaktif şişesine 300 ml fosfat tamponu alındı ve üzerine 10-20 µL hacimlerle H₂O₂ ilave edildi. Spektrofotometrede 2. küvete fosfat tamponu koyularak kör absorbansı alınıp sıfırlandı. Daha sonra hazırladığımız H₂O₂ çözeltisinin absorbansı ölçüldü ve optik dansite (OD) 0.500 oluncaya kadar çözeltiye H₂O₂ ilave edildi. Bu şekilde absorbansı 0.500 nm'ye ayarlı fosfat tamponlu H₂O₂ çözeltisi hazırlanmış oldu.

CAT enzim aktivitesinin kinetik ölçümü; İlk önce spektrofotometre kinetik ölçüm yapacak şekilde 240 nm dalga boyunda 60 sn boyunca her 5 sn'de bir ışın gönderecek şekilde ayarlandı. Örnek süpernatant ölçümlerinden önce spektrofotometrede küvetlerin konduğu 2. kısma kör (fosfat tamponu) konularak absorbansı sıfırlandı. Daha sonra 2990 µl H₂O₂ Çözeltisi üzerine 10µl örnek süpernatantı hızlıca eklenerek kör küvetinin karşısındaki 1. kısma koyuldu ve kinetik ölçüm başlatıldı absorbans değişimleri kaydedildi, tüm örnekler için aynı işlemler uygulandı.

Enzim aktivitesinin hesaplanması;

$$k = \{[2,3 \times \log (OD_1/ OD_2)] / \Delta t (sn)\}$$

$$k/mg \text{ protein} = k / [(mg/mL \text{ protein}) \times 2990/10]$$

OD₁: ilk ölçülen optik dansite

OD₂: 30 saniye sonunda ölçülen optik dansite

Δt: toplam ölçüm süresi (30 sn)

k: Katalaz katsayısı

Bulunan k değeri süpernatantdaki protein miktarına oranlandı.

3.5.5.4. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesi Paglia ve Valentine'nin metoduna göre çalışıldı (Paglia ve Valentine 1967). Glutasyon peroksidaz, H₂O₂ varlığında GSH'ın oksidasyonunu katalizleyen enzimdir. Oluşan GSSG'nin indirgenmesi GR ve NADPH aracılı olarak

gerçekleşir. GSH-Px enziminin spesifik aktivitesi NADPH'ın oksidasyonu sırasındaki spektrofotometrede ölçülen absorbans değişimi ile karakterizedir. Bu aktivite 340 nm'de kinetik ölçümle belirlendi.

GSH-Px enzim aktivasyonunun tepkimesi;



Deney için gerekli kimyasalların hazırlanması;

- **GSH-Px Tamponunun Hazırlanması:** Homojenizasyon için hazırladığımız fosfat tamponundan 500 ml alınır ve 1,04 gr EDTA ile karıştırılır.
 - **Kokteyl Hazırlanması:** Kokteyl için gerekli olan çözeltiler 6 adımda hazırlanmıştır.
1. Adımda GSH-redüktaz çözeltisi yapabilmek için Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄) çözeltisi hazırlanması: 1,056 gr (NH₄)₂SO₄ tartılıp 2500 µL su içinde çözüldü.
 2. Adımda önceden hazırlanan GSH-Px tamponundan 132,5 ml alındı.
 3. Adımda GSH çözelti hazırlama: 0,25 gr GSH tartılıp 5 ml GSH-Px tamponunda çözüldü.
 4. Adımda NADPH çözelti hazırlama: 0,0333 gr NADPH tartılıp 5 ml distile suda çözüldü.
 5. Adımda NaN₃ çözeltisi hazırlama: 0,0325 gr NaN₃ tartılıp 500 µL GSH-Px tamponunda çözüldü.
 6. Adımda GSH-redüktaz çözeltisi hazırlama: 25 µL GSH-redüktaz pipetlenip 1. Adımda hazırlanan 500 µL (NH₄)₂SO₄ çözeltisine eklendi.
- 2, 3, 4, 5 ve 6. adımlardaki çözeltiler sırasıyla reaktif şişesine eklenerek karıştırılmıştır.
- **H₂O₂ Çözeltisinin Hazırlanması:** Hazırladığımız GSH-Px kokteylinden 5 ml alınıp 15 µL %30'luk H₂O₂ ile karıştırılarak hazırlandı.

- **Deneyin Yapılışı:** Deney tüplerine 2990 µL hazırladığımız kokteyl çözelti pipetlendi ve üzerine örneklerden 10 µL eklenerek 30 dakika 25⁰C’de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hazırlamış olduğumuz H₂O₂ çözeltisinden 100 µL pipetlenerek hızlıca tüp alt üst edildi. Spektrofotometre kinetik ölçüm için hazırlandı ve 340 nm dalga boyunda havaya karşı sıfırlandıktan sonra örneklere 1 dakika süresince kinetik okuma yapılarak bu süre zarfındaki absorbans azalışı kaydedildi.

Enzim aktivitesinin hesaplanması:

Enzim Ünitesi (IU): birim zamanda oksidasyona uğrayan NADPH’ın mikromol türünden miktarıdır.

$$IU/L = [(\Delta A/t) / 6.22 \times 10^{-6}] \times (DF)$$

ΔA = Optik Dansite değişimi,

t= zaman (dk),

W= Enzim çözeltisinin protein miktarı (mg/mL)

NADPH ekstinksiyon katsayısı= $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} = 6.22 \text{ mM}^{-1}$

Elde edilen sonuçlar süpernatant protein miktarlarına oranlandı.

Spesifik aktivite IU/mg protein = (IU/L) / (1000xW)

DF: Dilüsyon faktörü

3.5.6. Serumda Yapılan Analizler

3.5.6.1. ELİSA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Analizleri

Çalışmaya başlamadan önce örnekler -80⁰C’den +4⁰C’ye alınıp çözünmesi beklendi. Örnekler çözüldükten sonra vortekslendi ve santrifüj yapıldı. 2-8⁰C’den çıkarılan kitler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra yıkama solüsyonları 30 kat dilüe edildi. (10 ml yıkama solüsyonu + 290 ml distile su)

Deney Prosedürü

1) Standartların Dilüsyonu:

TNF- α , NF- $\kappa\beta$, IL-6 ve Testosteron kitlerinde bulunan stok standart çözeltilerin dilüsyonu yapıldı.

2) Örneklerin Kuyulara Aktarılması:

Kör kuyusu, standart kuyularına ve örnek kuyularına kit prosedürü uygulandı. Daha sonra kuyuların üzeri jelatinle kapatılıp hafifçe çalkalandı ve 37⁰C'de 60 dakika inkübe edildi.

3) Yıkama:

İnkübasyon sonrası jelatin dikkatlice çıkarılarak kuyuların içindeki sıvı boşaltıldı. Daha sonra kuyular dilüe edilmiş yıkama solüsyonu ile 5 defa yıkandı (çok kanallı pipetle). Her yıkamada kuyular 1 dk ile 2 dk arasında 350 μ L yıkama solüsyonu ile yıkandı ve kurutma kağıdıyla kurutuldu.

4) Her bir kuyuya önce 50 μ L kromojen A solüsyonu eklendi daha sonra 50 μ L kromojen B solüsyonu eklenerek kuyuların üzeri jelatinle kapatılıp hafifçe çalkalandıktan sonra 37⁰C'de 10 dk boyunca karanlıkta inkübe edildi.

5) **Stop Solüsyonu:** Her bir kuyuya 50 μ L stop solüsyon eklendi (çok kanallı pipetle). Mavi renk aniden sarıya dönüştü.

6) **Final Ölçümü:** Stop solüsyon eklendikten sonra, 15 dk içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanılarak her kuyunun OD'si belirlendi.

3.5.6.2. ELİSA Analizlerinin Hesaplanması

Standartların konsantrasyonuna karşılık gelen OD değerlerine göre; standart grafiği çizildi, standart eğrinin regresyon denklemi bulundu ve daha sonra numune OD değerlerini regresyon denkleminde uygulayarak numunenin konsantrasyonu hesaplandı.

3.6. Histopatolojik Yöntem

3.6.1. Işık Mikroskopik İncelemede Doku Takip Protokolü

- Testis dokuları tamponlanmış %10' luk formalin içinde 3 gün boyunca bekletilerek tespit edildi.
- Tespit maddesini uzaklaştırabilmek için 1 gece süreyle akan su altında yıkanan dokular, etüvde 60°C'de 20'şer dakika sırasıyla artan etil alkol serilerinden (%70, %80, %96) geçirildi.
- Sonrasında etüvde 60°C'de, 20'şer dakika dört değişim asetonda dehidrate edildi.
- Şeffaflandırmak için etüvde 60°C'de iki kez 30'ar dakika ksilolde bekletildi.
- Etüvde 60°C'de iki değişim şeklinde 1'er saat parafin ile immersiyonu sağlandı ve parafin bloklar içine gömüldü.
- Her parafin bloktan rotary mikrotom (RM 2255, Leica, Köln, Germany) yardımıyla 4 µm'lik kesitler alındı.
- Dokuların genel histomorfolojik özelliklerini değerlendirmek için her dokuya ait kesitler hematoxilen-eozin ile boyandı.

Preparatlar ışık mikroskopunda, histopatologlar tarafından körlemesine incelendi.

3.6.2. Hematoxilen-Eozin boyaması

- Alınan parafin kesitleri deparafinize etmek için 60°C'lik etüvde 2 saat bırakıldı.
- Daha sonra ilki etüvde olacak şekilde 20 dakika, diğer ikisi 10'ar dakika üç farklı ksilene maruz bırakıldı.
- Ardından rehidratasyon için 2 değişim; %96'dan %70'e azalan alkol ve absölu alkol serilerinden geçirildi.
- Distile su ile çalkalanan kesitler 10 dakika Hematoxilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı.
- Boyamanın akabinde, boya fazlasının dokudan uzaklaştırmak için 10 dakika akan su altında kesitler yıkanarak 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı.

- Boyama sonrasında kesitler sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absölü alkol serilerinden geçirilerek şeffaflaştırma için 20'şer dakika üç değişim ksilende tutuldu ve sonrasında entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

3.6.3. Testis Dokusunun Histomorfolojik Değerlendirmesi

Kesitlerden elde edilen görüntüler kantitatif olarak değerlendirildi. Seminifer tübülleri Johnsen skoruna göre derecelendirildi. Bu sınıflandırma yönteminde, testislerin her bir kısmındaki bütün tübüler bölümler sistematik olarak değerlendirilir ve her birine 1'den 10'a kadar bir skor verilir. Değerlendirilen özellikler;

- Seminifer epitelyumun olmayışı skor 1
- Germinal hücre yok sadece Sertoli hücreleri skor 2
- Sadece spermatogonya skor 3
- Azospermi veya spermatidler yok, az sayıda spermatozoid skor 4
- Azospermi veya spermatidler yok, birçok spermatozoid skor 5
- Azoospermi, yaşlı spermatidler yok, birkaç olgunlaşmamış spermatid skor 6
- Azoospermi, yaşlı spermatidler yok, birçok olgunlaşmamış spermatid skor 7
- Her tübülde beş spermatozoidden daha az, birkaç yaşlı spermatidler skor 8
- Yaşlı spermatidler, düzensiz epitel ile hafif bozulmuş spermatogenez skor 9
- Birçok spermatozoidin varlığıyla birlikte tam spermatogenez skor 10 olarak derecelendirildi (Johnsen SG 1970).

3.7. İstatistiksel Analizler

3.7.1. Histopatolojik Değerlendirmelerin İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analizler SPSS (Versiyon 24) kullanılarak yapılmış olup yapılan analizlerin verileri medyan, minimum-maksimum ve inter persentil aralık olarak sunuldu. Normallik testinde dağılım analizi Shapiro Wilk testi ile değerlendirilerek dağılımı düzenli olmayan 2 den fazla grup karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İkişerli grup karşılaştırması için Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak kabul edildi.

3.7.2. Biyokimyasal Değerlendirmelerin İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analizler SPSS (Versiyon 24) kullanılarak yapılmış olup yapılan analizlerin verileri Ortalama±Standart Sapma ve medyan (min-mak), inter persentil aralık olarak sunuldu. İstatistiksel analizlerin tanımlanmasında grup sayısı (N), Ortalama (Mean), Standart Sapma (SD), Ortanca (Median), Çeyrekler Arası mesafe, 25. percentil ve 75. percentil değerleri verildi. Grupların dağılım analizi için Shapiro Wilk normalite testi uygulanarak $P>0,05$ değerinden büyük olan grupların dağılımı normal kabul edildi.

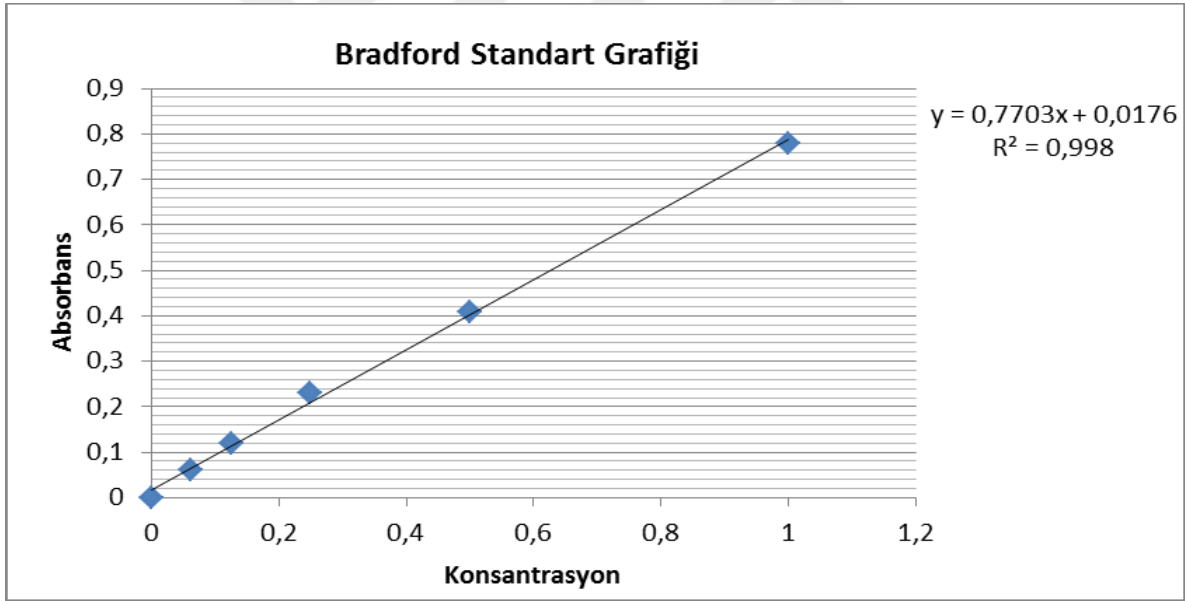
Normal dağılım gösteren 2 den fazla grup karşılaştırılmasında Tek-yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) testi kullanılarak anlamlı farklılık görülen gruplarda ikişerli grup karşılaştırması için Student's T Testi kullanıldı. Farklılık görülen gruplar error bar grafiği kullanılarak gösterildi. Normal dağılıma uymayan gruplarda ise 2 den fazla grup karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanılarak anlamlı farklılık görülen gruplarda ikişerli grup karşılaştırması için Mann Whitney U testi kullanıldı. Farklılık görülen gruplar box and whisker plot grafiği kullanılarak gösterildi. Gruplar arasında istatistiksel anlamlılık düzeyi $P<0,05$ olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. BSA ile Hazırlanan Protein Standart Grafiği ve Testis Protein Konsantrasyonları

Çizelge4.1. BSA ile hazırlanan stok standart çözeltilinin seyreltilmesi

Standartlar	Dilüsyon oranı	Konsantrasyon(mg/ml)
St1	1	1
St2	1/1	0,5
St3	1/2	0,25
St4	1/4	0,125
St5	1/8	0,0625
St0	-	0

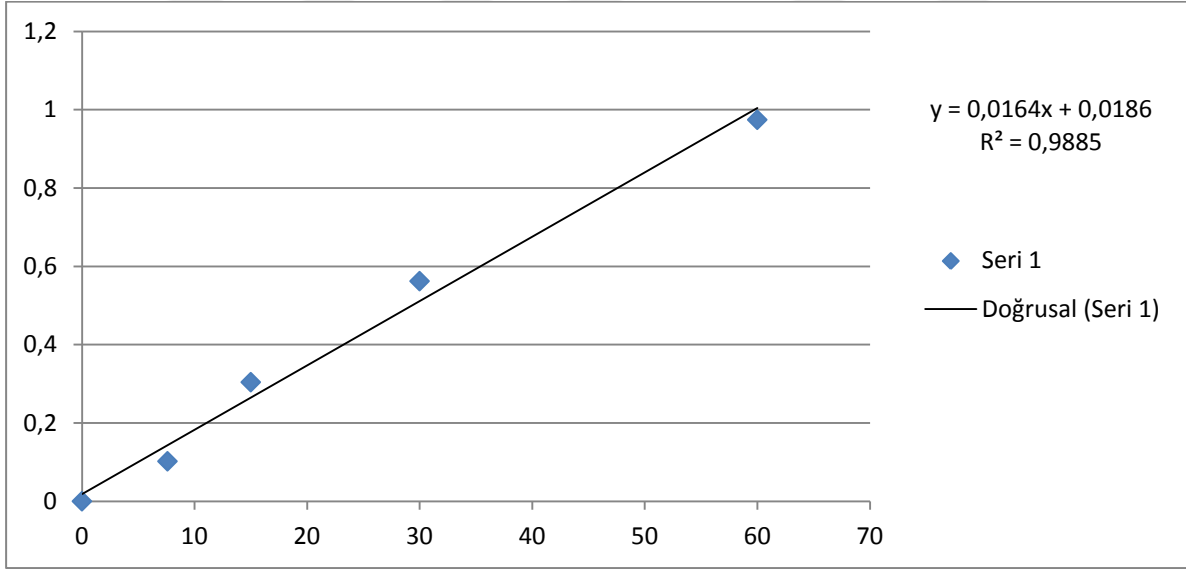


Şekil4.1. Bradford Standart Grafiği

Çizelge4.2. Testis dokusunda ölçülen protein miktarları

Gruplar	Homojenat Protein Miktarı Ortalama±SD (mg protein/gr doku)	Süpernatant Protein Miktarı Ortalama ± SD (mg protein/gr doku)
Kontrol (K)	158,87±38,38	95,63±8,31
Sham (S)	168,38±45,16	90,83±4,02
Varikozel (V)	173,09±14,73	91,17±2,98
V + αLA	174,21±25,31	89,80±4,00

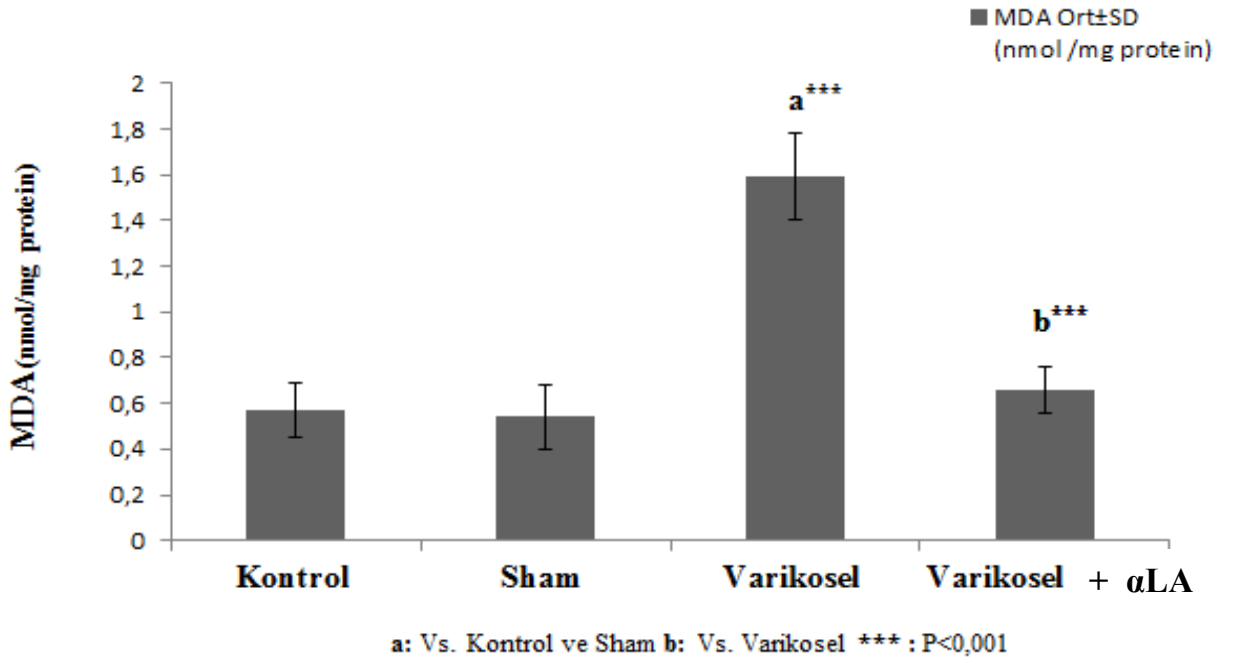
4.2. MDA Standart Grafiği, Testis Doku MDA Miktarları ve Grupların Karşılaştırılması



Şekil4.2. MDA Standart Grafiği

Çizelge4.3. Testis doku MDA miktarları ve grupların ikili karşılaştırılması

Gruplar	Homojenat MDA Miktarı Ortalama±SD (nmol /mg protein)	Grupların İkili Karşılaştırılması (P değeri)				
		3 & 1	3 & 2	4 & 3	4 & 1	4 & 2
Kontrol (K)	0,57±0,12	P=0,001	P=0,001	P=0,001	P=0,125 NS	P=0,069 NS
Sham (S)	0,54±0,14					
Varikozel (V)	1,59±0,19					
V + αLA	0,66±0,10					



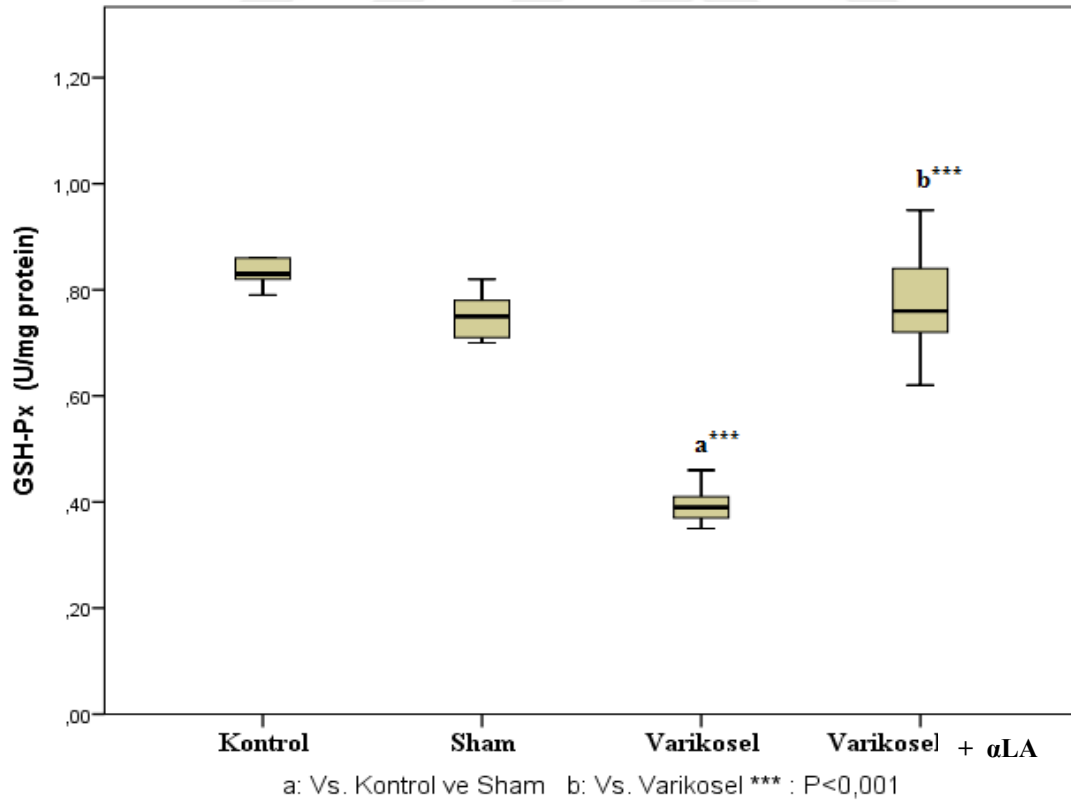
Şekil4.3. Grupların Doku MDA Miktarlarının karşılaştırılması

4.3. Doku GSH-Px Aktiviteleri ve Grupların Karşılaştırılması

Çizelge4.4. Testis doku GSH-Px aktivitesi (U/mg protein)

Gruplar	Mean	Min.	%25 Persentil	Median	%75 Persentil	Maks.	P
Kontrol (K)	0,87	0,79	0,82	0,83	0,86	1,09	0,001
Sham (S)	0,72	0,40	0,71	0,75	0,78	0,82	
Varikosel (V)	0,38	0,23	0,37	0,39	0,41	0,46	
V + α LA	0,77	0,62	0,72	0,76	0,84	0,95	

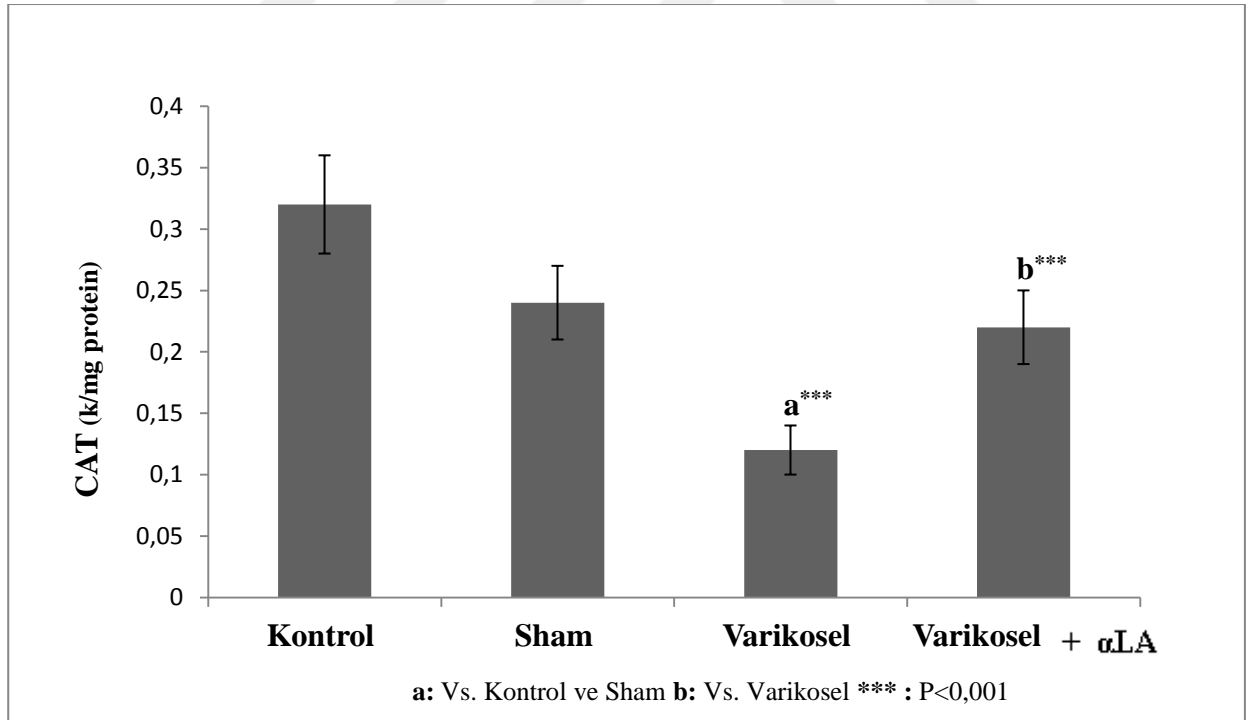
Şekil4.4. Grupların GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması



4.4.Doku CAT Aktiviteleri ve Grupların İkili Karşılaştırılması

Çizelge4.5. Testis doku CAT enzim aktivitesi

Gruplar	CAT Enzim Aktivitesi Ortalama±SD (k /mg protein)	Grupların İkili Karşılaştırılması (P değeri)				
		3 & 1	3 & 2	4 & 3	4 & 1	4 & 2
Kontrol (K)	0,32±0,04	P=0,001	P=0,001	P=0,001	P=0,001	P=0,178 NS.
Sham (S)	0,24±0,03					
Varikozel (V)	0,12±0,02					
V + αLA	0,22±0,03					

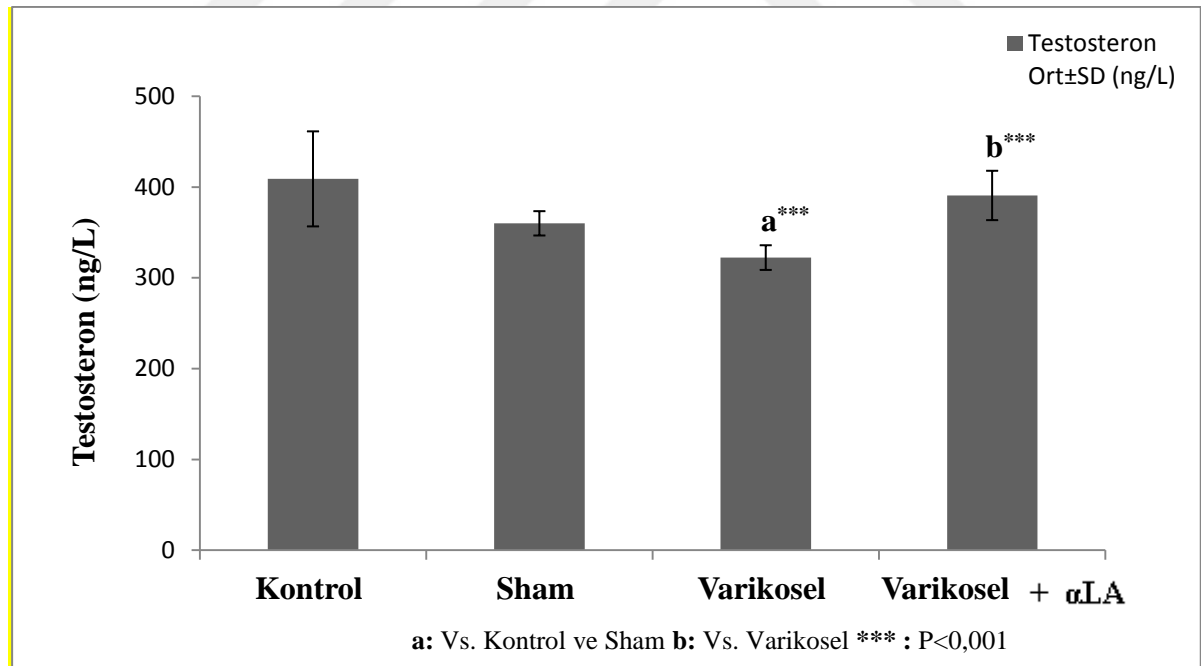


Şekil 4.5. Grupların CAT aktivitelerinin karşılaştırılması

4.5. Serum Testosteron Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması

Çizelge4.6. Serum Testosteron Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması

Gruplar	Testosteron Ortalama±SD (ng/L)	Grupların İkili Karşılaştırılması (P değeri)				
		3 & 1	3 & 2	4 & 3	4 & 1	4 & 2
Kontrol (K)	408,92±52,35	P=0,001	P=0,001	P=0,001	P=0,373	P=0,011
Sham (S)	359,96±13,41					
Varikozel (V)	322,22±13,60					
V + αLA	390,67±27,18					

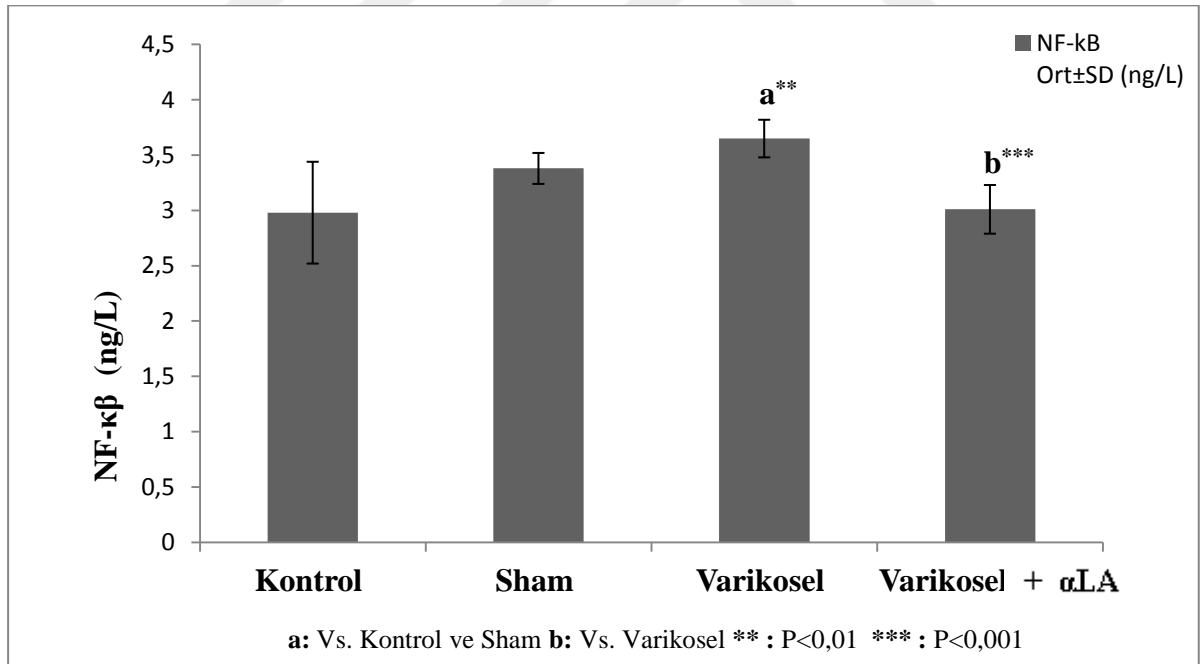


Şekil4.6. Grupların Testosteron düzeylerinin karşılaştırılması

4.6. Serum NF-κβ Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması

Cizelge4.7. Serum NF-κβ Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması

Gruplar	NF-kB Ortalama±SD (ng/L)	Grupların İkili Karşılaştırılması (P değeri)				
		3 & 1	3 & 2	4 & 3	4 & 1	4 & 2
Kontrol (K)	2,98±0,46	P=0,004	P=0,004	P=0,001	P=0,861 NS.	P=0,001
Sham (S)	3,38±0,14					
Varikösel (V)	3,65±0,17					
V + αLA	3,01±0,22					

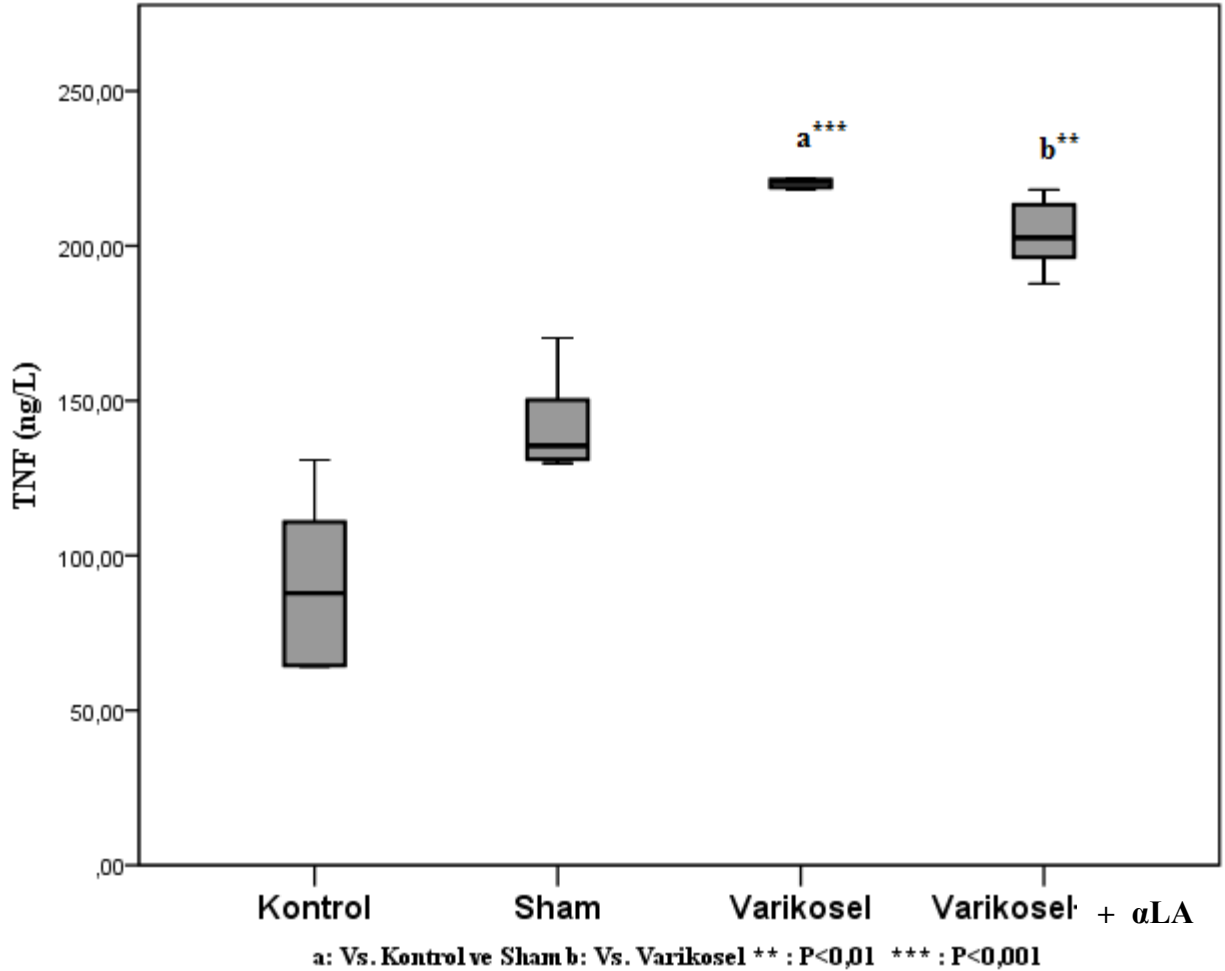


Şekil4.7. Grupların NF-κβ düzeylerinin karşılaştırılması

4.7. Serum TNF- α Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması

Çizelge4.8. Serum TNF- α Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması

Gruplar (ng/L)	Mean	Min.	%25 Persentil	Median	%75 Persentil	Maks.	P
Kontrol (K)	90,17	64,16	64,46	87,86	110,87	130,87	0,001
Sham (S)	141,70	129,80	131,12	135,45	150,19	170,27	
Varikozel (V)	218,50	204,25	218,88	220,69	221,42	221,80	
V + α LA	203,80	187,77	196,36	202,62	213,27	218,15	

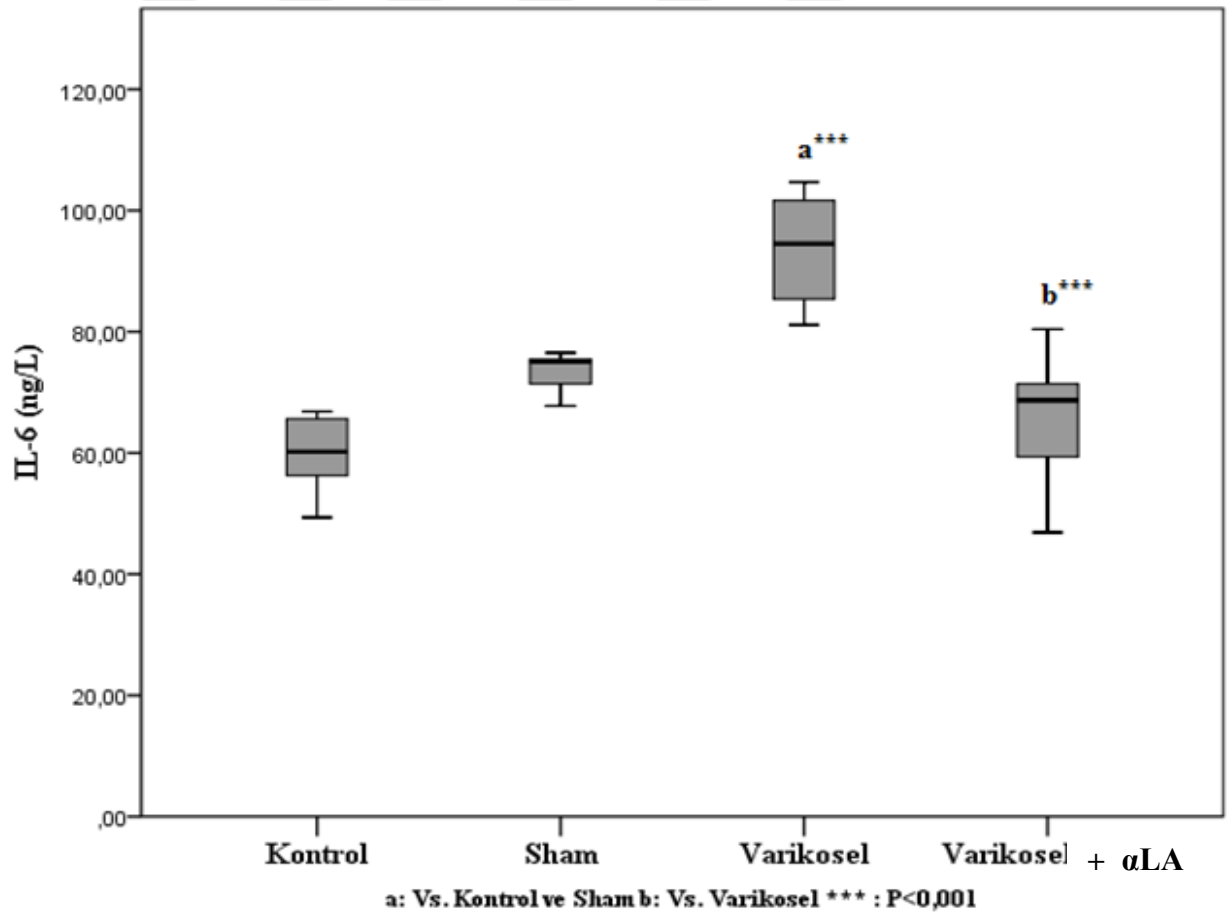


Şekil4.8. Grupların TNF- α düzeylerinin karşılaştırılması

4.8. Serum IL-6 Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması

Çizelge4.9. Serum IL-6 Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması

Gruplar (ng/L)	Mean	Min.	%25 Persentil	Median	%75 Persentil	Maks.	P
Kontrol (K)	60,05	49,36	56,27	60,19	65,65	66,84	0,001
Sham (S)	73,50	67,75	71,40	74,98	75,49	76,51	
Varikosel (V)	92,53	81,10	85,41	94,49	101,63	104,70	
V + α LA	66,17	46,89	59,36	68,70	71,38	80,40	



Şekil4.9. Grupların IL-6 düzeylerinin karşılaştırılması

4.9. Grupların Doku MDA, CAT, GSH-Px Miktarları ve Grupların İkili Karşılaştırılması

Çizelge4.10. MDA ve Antioksidan enzimlerin miktarı ve gruplar arası karşılaştırma

GRUPLAR (Ortalama±SD) Median[%25-%75]	Kontrol (K)	Sham (S)	Varikozel (V)	V + αLA	Grupların İkili Karşılaştırılması (P değeri)				
					3 & 1	3 & 2	4 & 3	4 & 1	4 & 2
MDA (nmol/mg protein)	0,57±0,12	0,54±0,14	1,59±0,19	0,66±0,10	<0,001			NS.	
GSH-Px (U/mg protein)	0,83 [0,82-0,86]	0,75 [0,71-0,78]	0,39 [0,37-0,41]	0,76 [0,72-0,84]	<0,001		<0,05	NS.	
CAT (k/mg protein)	0,32±0,04	0,24±0,03	0,12±0,02	0,22±0,03	<0,001			NS.	

4.10. Grupların Serum Testosteron, NF- κ B, TNF- α , IL-6 Değerleri ve Grupların Karşılaştırılması

Çizelge4.11. Testosteron, NF- κ B, TNF- α , IL-6 değerleri ve gruplar arası karşılaştırma

GRUPLAR (Ortalama \pm SD) Median[%25-%75]	Kontrol (K)	Sham (S)	Varikosel (V)	V + α LA	Grupları İkili Karşılaştırma (P değeri)				
					3 & 1	3 & 2	4 & 3	4 & 1	4 & 2
Testosteron (ng/L)	408,92 \pm 52,35	359,96 \pm 13,41	322,22 \pm 13,60	390,67 \pm 27,18	<0,001		NS.	<0,05	
NF- κ B (ng/L)	2,98 \pm 0,46	3,38 \pm 0,14	3,65 \pm 0,17	3,01 \pm 0,22	<0,01	<0,001	NS.	<0,001	
TNF- α (ng/L)	87,86 [64,46-110,87]	135,45 [131,12-150,19]	220,69 [218,88-221,42]	202,62 [196,36-213,27]	<0,001	<0,01	<0,001		
IL-6 (ng/L)	60,19 [56,27-65,65]	74,98 [71,40-75,49]	94,49 [85,41-101,63]	68,70 [59,36-71,38]	<0,001		NS.		

4.11. Histopatolojik İnceleme Bulguları

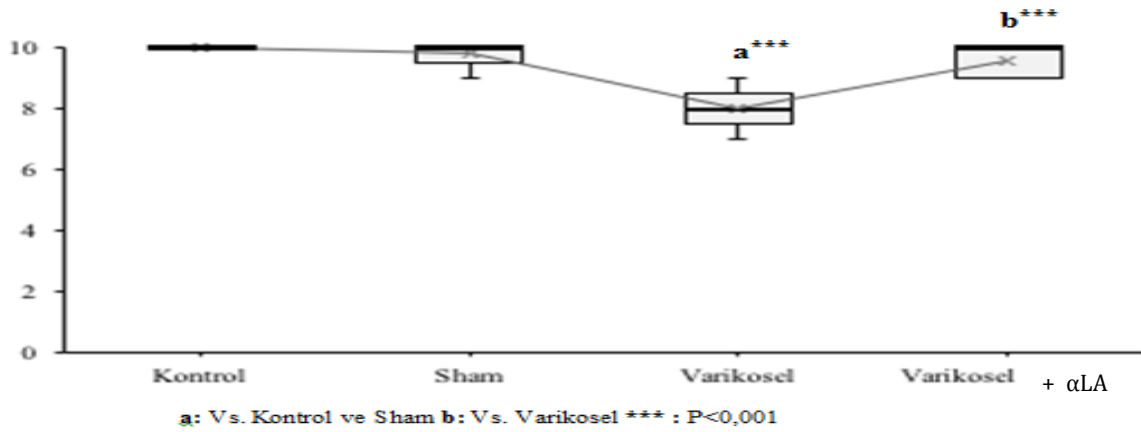
Her hayvanın sol testisinden alınan enine kesitinde, seminiferöz epitelyum kalite açısından değerlendirildi. Spermatojenik hücre tiplerinin varlığına ya da yokluğuna göre 1-10 arası skor veren Jhonsen metoduna göre örnekler skorlandı (Yama ve ark. 2013).

1) Tübül kesitinde seminifer epitelyum yoktur.

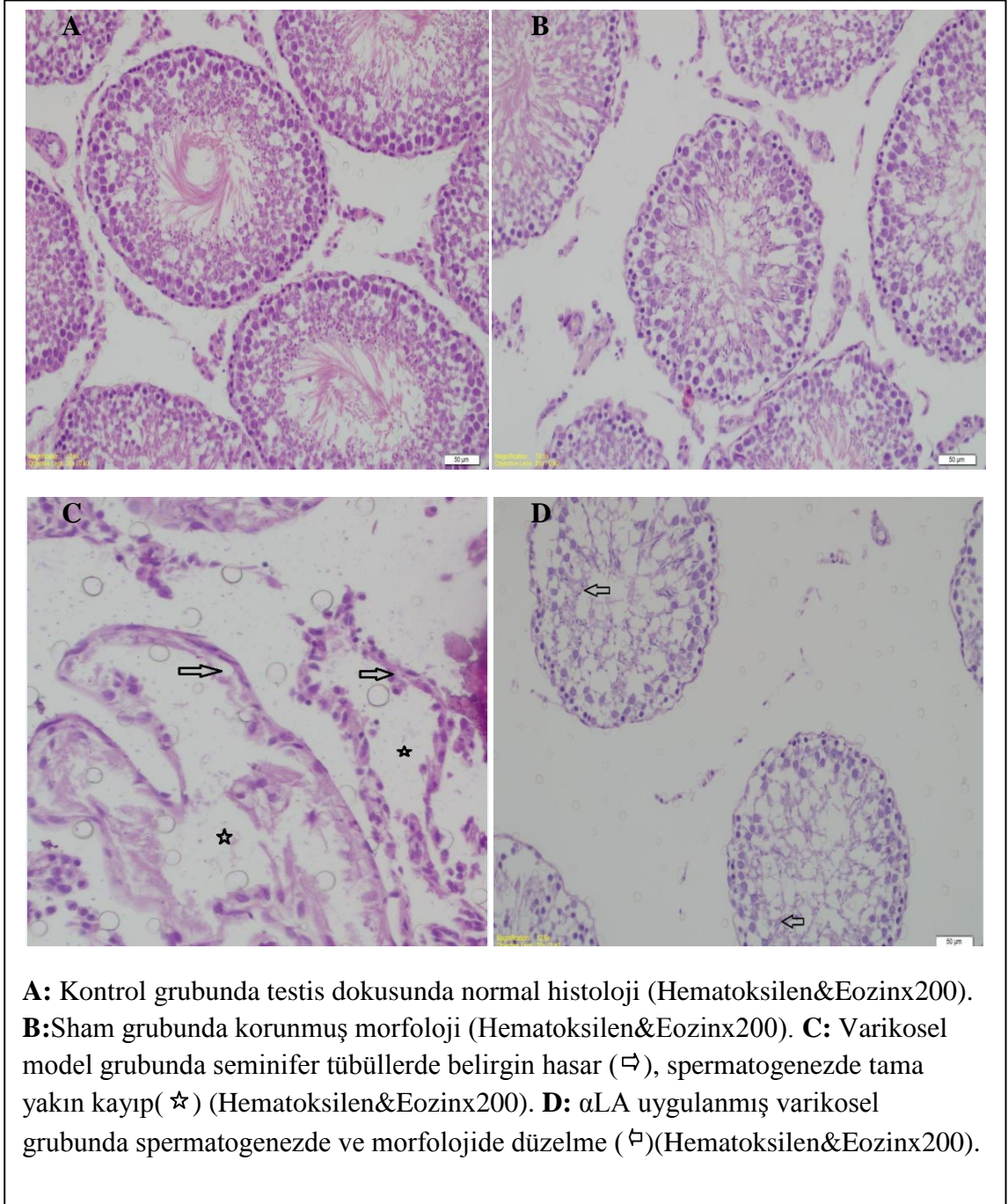
- 2) Germ hücresi yoktur sadece Sertoli hücresi bulunur.
- 3) Sadece germ hücreleri, spermatogonya mevcuttur.
- 4) Sadece birkaç spermatozoid (beşten az) görülür, azospermi ya da spermatidler yoktur.
- 5) Azospermi veya spermatidler yok birçok spermatozoid bulunur.
- 6) Azospermi, olgunlaşmış spermatidler yok, birkaç olgunlaşmamış spermatid bulunur.
- 7) Azospermi, olgunlaşmış spermatidler yok, birçok olgunlaşmamış spermatid mevcuttur.
- 8) Her tübülde beşten az spermatozoa, birkaç olgunlaşmış spermatidler bulunur.
- 9) Olgunlaşmış spermatidler, düzensiz epitel ile hafif bozulmuş spermatogenez mevcuttur.
- 10) Tam spermatogenez gözlenir.

Çizelge4.12. Histolojik Johnsen skorumun istatistiksel verileri

Grup	Mean	Minimum	%25 Persentil	Median	%75 Persentil	Maksimum	P
Kontrol	10	10	10	10	10	10	0,001
Sham	9,78	9	10	10	10	10	
Varikosel	8	7	8	8	8	9	
V+ αLA	9,56	9	9	10	10	10	



Şekil4.10. Grupların histoloji verilerinin karşılaştırılması



Şekil4.11. Grupların histolojik kesitlerinin karşılaştırılması

5.TARTIŞMA

Bu tez çalışması deneysel varikosel modeli oluşturulmuş sıçanlarda testiküler hasar üzerine α LA'nın etkisini inceleyen özgün bir çalışmadır. Çalışmamızda α LA'nın testis dokusundaki lipit peroksidasyon ürünü olan MDA miktarına ve antioksidan enzimlerden CAT ile GSH-Px aktiviteleri üzerine etkileri incelendi, ayrıca inflamasyon sürecinde transkripsiyon faktörü olan NF- κ B, inflamasyon belirteci olarak TNF- α , IL-6 ve testosteron hormon düzeyleri tespit edildi. Bununla birlikte biyokimyasal analizlerin yanı sıra α LA'nın testis dokusu üzerine histopatolojik etkileri de incelendi.

Varikosel pampiniform pleksusun anormal dilatasyonu ve kıvrımlığı ile karakterize, bilateral, progresif ve kalıtsal bir durumdur. Varikosel olgusu bilinmesine ve birçok yıldır çalışılmasına rağmen altında yatan fizyopatolojik mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak hipoksi ve testiküler hipertermi, toksik adrenal ve renal metabolitlerin reflüsü, hormonal disfonksiyon ve artan oksidatif stresi kapsayan bazı teoriler ileri sürülmüştür. Varikoselli erkeklerin yüksek düzeyde ROS, NO gibi reaktif oksijen türleri ve MDA gibi lipit peroksidasyon ürünleri bulundurmaları ve de antioksidan enzim sistemlerindeki azalmadan dolayı oksidatif stresin varikosel ilişkili infertilitede temel neden olduğuna inanılır (Missassi ve ark. 2017). ROS'nin etkisiyle lipit peroksidasyonunun önemli bir ürünü olan MDA, tipik olarak oksidatif stres koşullarında hücrel hasarın derecesini değerlendirmek için kullanılır (Ning ve ark. 2018). Birçok çalışmada, varikoselin semen ve testiste MDA düzeylerini arttırdığı bildirilmiş ve MDA düzeyleri ile sperm parametreleri arasında negatif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Köksal ve ark. 2000, Mostafa ve ark. 2001, Abd-Elmoaty ve ark. 2010). Bu çalışmalara uyumlu olarak bizim çalışmamızda da varikoselli sıçanlarda testiküler MDA'nın kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdiği saptanmış olup α LA uygulamasının MDA artışını anlamlı derecede engellediği gözlenmiştir.

Son yıllarda α LA'nın antioksidan etkileri birçok çalışmada bildirilmiştir. α LA'nın testis hasarı üzerine koruyucu etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada α LA grubunda MDA düzeyinin hasarlı gruba göre anlamlı olarak daha düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir (Pınar ve ark. 2018).

Akrilamidle testis hasarı yapılmış başka bir çalışmada akrilamid uygulaması, testiküler ve epididimal MDA düzeylerinde belirgin bir artışa sebep olmuş ve α LA'nın, MDA seviyelerini düşürdüğü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Lebda ve ark. 2014).

Benzer şekilde Ozbal ve arkadaşlarının sıçanlarda testiküler İR hasarına karşı α LA'nın etkisini inceledikleri çalışmalarında MDA seviyelerinin α LA grubunda İR grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir (Ozbal ve ark. 2008).

Bizim çalışmamızın sonuçları da bu çalışmalara paralel olarak varikoselli sıçanlarda testiküler MDA'nın kontrol ve sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede ($P=0,001$) artış gösterdiğini ve α LA'nın varikozel grubuna kıyasla ($P=0,001$) bu düzeylerin artışını engellediğini ortaya koymuştur (Çizelge4.3). α LA'nın hem oksidatif radikalleri temizleyici hem de antioksidan kapasiteyi artırıcı etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir. (Aly ve ark. 2009, Ozbal ve ark. 2012, El-Beshbishy ve ark. 2013)

Bu tez çalışmasında antioksidan takviye olarak kullandığımız α LA; bir serbest radikal temizleyici ve güçlü bir biyolojik antioksidan olup insanlarda karaciğer, kalp ve böbreklerde sentezlenir. Oral olarak verilen α LA'nın %20-40'ı plazma içine emilir ve plazma α LA seviyeleri, uygulamadan sonra 0.5 ila 2 saat arasında zirve konsantrasyonuna ulaşarak hızla metabolize edilir. Uzun süreli yüksek kronik α LA takviye seviyeleri oksidatif protein hasarı ve plazma lipit hidroperoksiti artırırken orta dereceli α LA dozlarının az sayıda yan etkisi vardır. Bu yüzden çalışmamızda doz olarak 100 mg/kg'ı tercih ettik (Ozbal ve ark. 2012). α LA, ROS süpürme, glutatyon, E ve C vitaminleri gibi endojen antioksidanları yenileme ve metal şelatlama kapasitesine sahiptir ve diğer antioksidanların aksine hem suda hem de yağda çözünebilir. Bu nedenle biyolojik membranları kolayca geçebilir ve hem sitosol hem de plazma membranında antioksidan etkiye sahiptir (Ozbal ve ark. 2012). Erkek infertilitesinin pek çok nedeninden biri olan, ROS'un aracılık ettiği OS'nin, doğurganlığı etkilediği düşünülmüştür (Aly ve ark. 2009). Bu nedenle, OS son yıllarda kapsamlı olarak incelenmiş ve birçok çalışma, ROS'un sperm fonksiyonu üzerindeki zararlı etkilerini göstermiştir. Ayrıca, infertil erkeklerin %30-80'inde ROS düzeylerinin arttığını gösteren çalışmalar vardır (Tremellen 2008, Makker ve ark. 2009). Bununla birlikte, fizyolojik seviyedeki ROS sperm kapasitesini düzenleme ve başarılı fertilizasyon için gereklidir. Fizyolojik koşullar altında ROS birikimi antioksidan savunma sistemi sayesinde düşük seviyede tutulur ve hücre büyümesi, gelişimi, farklılaşması ve ölümü üzerinde özel düzenleyici etkilere sahiptir. Dengeli bir hücre çevresi; enzimatik ve nonenzimatik antioksidan yollar ile süpürme sisteminin varlığında korunmaktadır (Cho ve ark. 2016). Testisler serbest radikal hasarına duyarlıdır ve normal koşullar altında, enzimatik antioksidan savunma sistemleri bu hücreleri serbest radikal hasarından korur (Ozbal ve ark. 2012). Bizim çalışmamızda dahil birçok çalışmada bu enzimatik antioksidan savunma sistemleri üzerine antioksidan takviyelerin etkileri incelenmiştir.

Yapılan birçok çalışmada α LA'nın, lipid peroksidasyon ürünlerini temizlediği, glutatyon sentez enzimlerini ve diğer antioksidan koruyucu enzimleri indüklediği gösterilmiştir (Ozbal ve ark. 2012).

Sıçanlarda testiküler İR hasarına karşı lipoik asitin etkisini inceleyen Ozbal ve arkadaşları α LA grubunda SOD, GSH-Px ve MDA düzeylerinin kontrol ve sham gruplarına yaklaştığını göstererek α LA'nın hücrel hasarı azalttığını belirtmişlerdir (Ozbal ve ark. 2008). Selvakumar ve arkadaşları sıçan testislerinde siklofosfamid kaynaklı oksidatif hasarda α LA'nın koruyucu etkisini incelemiş ve sonuç olarak, lipoik asidin testiküler hücrelerde global antioksidanları (SOD, CAT, GSH-Px, GST, GR) desteklediğini ve bunun da siklofosfamid ve metabolitleri tarafından başlatılan oksidatif stres ve hücrel hasarın azalmasına neden olduğunu tespit etmişlerdir (Selvakumar ve ark. 2004). Guimarães ve arkadaşları deneysel spermatik kord torsiyon çalışmasında α LA'nın koruyucu etkisini değerlendirmiş ve α LA grubunda plazma total antioksidan seviyelerinin torsiyon grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir (Guimarães ve ark. 2006). El-Beshbishy ve arkadaşları sıçanlarda BPA ile indüklenen testislerde mitokondriyal toksisiteye α LA'nın etkisini araştırmış ve çalışmalarında BPA alımının sıçan testislerinde SOD, CAT, GSH-Px ve GR gibi antioksidan enzim aktivitelerini azalttığını α LA verilen grupta ise bu enzim aktivitelerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir (El-Beshbishy ve ark. 2013).

Bizim bu çalışmamızda da α LA'nın testis dokusundaki, antioksidan enzimlerden CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri üzerine etkileri değerlendirildi. Elde edilen verilere göre varikozel grubunda CAT ve GSH-Px seviyeleri, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır ($P=0,001$). Bununla birlikte deneysel varikozel yapılarak α LA tedavisi uygulanan grupta ise CAT ve GSH-Px seviyelerinde varikozel grubuna göre anlamlı derecede artış ($P=0,001$) gözlenmiş olup (Çizelge4.4 ve Çizelge4.5) bu bulgular literatür çalışmaları ile benzerlik göstermektedir.

Literatürden elde ettiğimiz veriler, α LA'nın antioksidan özelliğinin yanı sıra inflamatuvar yanıtı inhibe etme kabiliyetine sahip olduğunu da göstermektedir. Bu veriler ışığında bizim de çalışmamızda α LA'nın varikozel kaynaklı inflamasyon üzerindeki koruyucu etkisi araştırıldı ve bunun için serumda inflamatuvar mediyatörlerin aşırı ekspresyonundan sorumlu olan NF- κ B ile proinflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-6 düzeyleri değerlendirildi. Serum NF- κ B düzeyleri varikozel grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($P=0,004$), aynı şekilde TNF- α ve IL-6 düzeyleri de varikozel grubunda kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($P=0,001$). Buna karşılık α LA bu düzeylerin artışını istatistiksel olarak anlamlı

şekilde engellemiştir (P=0,001). Ayrıca NF-κB düzeylerinde V+αLA ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (P=0,861) (Çizelge4.11). αLA, oktanoik asidin bir disülfid türevidir ve inflamasyon aracılı patolojik durumların önlenmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir (Xia ve ark. 2014). αLA'nın terapötik potansiyeli, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanserler de dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda bildirilmiştir (Mirtaheri ve ark. 2015). NF-κB, varikosel kaynaklı inflamatuvar süreçte önemli bir rol oynar. NF-κB aktivasyonu, inhibitör kapaB (IκB)'nin fosforilasyonu ile tetiklenir ve inaktif sitoplazmik kompleks ayrışarak hücre çekirdeğine translokasyon yapar. Çekirdekte NF-κB, karşılık gelen bölgelere bağlanır ve birçok proinflamatuvar genin transkripsiyonunu düzenler. İnflamatuvar mediyatörlerin aşırı ekspresyonu, inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol oynar. Bununla birlikte, NF-κB yolunun inhibisyonunun pro-inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ettiği de gösterilmiştir (Xia ve ark. 2014). αLA, sırasıyla birçok önemli inflamatuvar ve antioksidan genlerin ekspresyonunu düzenleyen NF-κB ve nükleer faktör eritroid 2-ilişkili faktör 2 (Nrf2) gibi bazı önemli transkripsiyon faktörleri aracılığı ve hücre içi sinyalizasyon yolları sayesinde antiinflamatuvar ve antioksidan etkiler gösterebilir (Mirtaheri ve ark. 2015). Xia ve arkadaşlarının farelerde fulminan karaciğer yetmezliğinde αLA'nın OS, inflamasyon ve apoptoz üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında 5 gün boyunca 60 mg/kg olacak şekilde αLA verilen grupta NF-κB, TNF-α ve IL-6 ifadelerinin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir (Xia ve ark. 2014). Goraca ve arkadaşları LPS ile indüklenmiş sıçanların karaciğerlerinde αLA (60 mg/kg)'nın antioksidan ve antiinflamatuvar etkisini araştırmış ve LPS yüklemesi, kontrol grubuna kıyasla TNF-α ve IL-6 düzeylerinde belirgin bir artışa neden olmuştur buna karşılık αLA ile tedavi edilen sıçanlarda ise karaciğer TNF-α ve IL-6 düzeyleri anlamlı olarak azalmıştır (Goraca ve ark. 2015).

TNF-α, IL-6 ve diğer birçok sitokin sadece NF-κB tarafından upregüle edilmekle kalmayıp, aynı zamanda proinflamatuvar durumun devam etmesine yol açan NF-κB'nin aktivatörleri olarak da hareket eder (Mirtaheri ve ark. 2015). TNF-α, esas olarak nötrofil infiltrasyonu ve aktivasyonu ile karakterize edilen, erken bir inflamatuvar cevaba aracılık etmede birincil ve merkezi sitokin olarak bilinir (Xia ve ark. 2014). Ayrıca TNF-α ve IL-6, inflamatuvar sürecin kilit araçlarıdır ve aynı zamanda, diğer sitokinleri ve büyüme faktörlerini indükleyerek doğrudan doğruya refraktif (düzeltici) faza katkıda bulunurlar (Nasole ve ark. 2014).

Yapılan çalışmalarda OS'nin erkek infertilitesi ile korelasyonu gösterilmiştir ve artan sitokin üretiminin erkek genital sisteminde ROS üretiminin artışını tetikleyebildiği bilinmektedir. Ayrıca birçok çalışma insan semeninde artan sitokin miktarının erkek infertilitesi ile ilişkisini işaret etmektedir (Camejo ve ark. 2001). Nallella ve arkadaşları varikoseli olan

infertil hastalarda, kontrol grubuna kıyasla IL-6 seviyelerinin arttığını ve aynı zamanda toplam antioksidan kapasitenin de azaldığını göstererek IL-6 ve oksidatif stresin, bu hastalarda infertilitenin patofizyolojisinde rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (Nallella ve ark. 2004). Li ve arkadaşlarının NF-κB sinyal yolu üzerinden αLA'nın antiinflamatuvar etkilerinin gösterilmesini amaçladıkları çalışmalarında αLA grubunda NF-κB sinyal yolunun önemli ölçüde inhibe edildiği ve TNF-α, IL-6 ve IL-1β gibi sitokinlerin seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir (Li ve ark.2015). Bizim çalışmamızda αLA'nın inflamatuvar sitokinler üzerine olan inhibe edici etkisi önceki çalışmalarla uyumlu olup bu durum αLA uygulamasının oksidatif stresi önleyici etkilerinin yanında antiinflamatuvar etkinliğinde olduğunu bu yönüyle de terapötik potansiyelini bize göstermektedir.

Testosteronun spermatogenezdeki rolü nedeniyle, birçok araştırmacı varikozel ve tedavisinin Leydig hücre fonksiyonu ve testosteron sentezi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Yapılan çalışmalar varikozelin Leydig hücre fonksiyonu üzerine negatif bir etkisi olduğunu göstermektedir ve bu olumsuz etki de testislerin testosteron üretimindeki azalması ile sonuçlanmaktadır (Tanrıkut ve ark. 2011). Bu sebeple bizim de çalışmamızda varikozelin, serum testosteron seviyelerine etkisi incelendi ve αLA'nın bu seviyelere etkisi araştırıldı.

Tanrıkut ve arkadaşlarının retrospektif çalışmasında, subinguinal mikrocerrahi varikozektomi uygulanan 271 varikozel hastasının varikozel olmayan 314 kontrol hastasından daha düşük testosteron düzeyine sahip olduğu belirtilmiştir (Tanrıkut ve ark. 2011). Bununla birlikte deneysel varikozel modeli oluşturulmuş sıçanlarda ve klinik varikozel olgularında benzer olarak testosteron düzeylerinin azaldığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Luo ve ark.2011, Abdel-Meguid ve ark. 2014, Zhang ve ark. 2016, Alizadeh ve ark. 2018). Pınar ve arkadaşlarının metotreksat (MTX) ile testis hasarı oluşturup αLA'nın koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmalarında MTX grubunda serum testosteron seviyelerinde azalma tespit edilmiştir. αLA verilen grup ile MTX grubu karşılaştırıldığında ise αLA'nın azalan testosteron seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede arttırdığı bildirilmiştir (Pınar ve ark. 2018). El-Beshbishy ve arkadaşlarının BPA ile testiküler toksisite oluşturdukları çalışmalarında BPA'lı grupta testosteron düzeylerindeki azalış tespit edilmiş ve αLA verilen grupta ise azalan testosteron seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bildirilmiştir (El-Beshbishy ve ark.2013). Sıçanlarda testiküler toksisite yapılmış bir diğer çalışmada testosteron seviyelerinde önemli derecede bir azalma tespit edilmiş ve αLA'nın bu düzeyleri arttırdığı ifade edilmiştir (Güleş ve Eren 2016). Başka bir testis toksisite çalışmasında da Prahalathan ve arkadaşları αLA'nın azalan testosteron seviyelerini arttırdığını bildirmiştir (Prahalathan ve ark.2006).

Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak deneysel varikozel modeli oluşturduğumuz sıçanlarda kontrole kıyasla serum testosteron düzeyleri azalmıştır ($P=0,001$) ve α LA uyguladığımız grupta ise testosteron seviyelerinin varikozel grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bu seviyelerin azalışını engellediği ($P=0,001$) tespit edilmiştir. Bununla birlikte α LA grubu ile kontrol arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ($P=0,373$) (Çizelge4.6).

Çalışmamızda biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesinin yanı sıra histopatolojik etkiler de incelenmiştir. Testis dokusu incelendiğinde varikozele bağlı olarak seminifer tübüllerde belirgin hasar gözlenmiş (şekil4.11 C) ve $V+\alpha$ LA grubunda ise α LA'nın bu hasarları belirgin şekilde engellediği gösterilmiştir (şekil4.11 D). Varikozel grubunda belirgin derecede bozulmuş seminifer tübül yapısı ile çokca azalmış spermatozoa ve olgunlaşmamış spermatidler gözlenmiş olup spermatogenezde tama yakın kayıp tespit edilmiştir ($p<0.001$). Varikozel grubuna kıyasla $V+\alpha$ LA grubunda ise seminifer tübül morfolojisinde ve spermatogenezde düzelme gözlenmiştir ($p<0.001$).

Zhang ve arkadaşlarının sıçanlarda deneysel varikozel modeli oluşturdukları çalışmalarında ise, varikozel ile indüklenen sıçanlarda daha ince bir spermatojenik epitelyum, daha az germ hücreleri ve olgun spermiler, atrofik seminifer tübüller ve farklı fazlarda dağınık germ hücreleri olduğu gösterilmiştir. Tedavi grubunda ise hasar görmüş spermatojenik epitelyumun onarıldığı ancak kontrol grubuna göre yapının tamamen normale dönmediği belirtilmiştir (Zhang ve ark. 2016). Güleş ve Eren'in testiküler toksisite çalışmasında hasar grubunun testislerinde bazal membranda vakuolizasyon ve tübüler lümende olgunlaşmamış spermatidler gibi histolojik değişikliklerde anlamlı artışlar gözlenmiş ve α LA tedavisinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde bu hasarları onardığı tespit edilmiştir (Güleş ve Eren 2016). Ozbal ve arkadaşlarının testiküler İR hasarına α LA'nın etkisini inceledikleri çalışmalarında histolojik incelemede iskemi ve İR gruplarında seminifer tübüler disorganizasyon, germinal hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve matürasyon kaybı, interstisyel ödem ve interstisyel kanama gözlenmiş olup α LA verilen grupta ise iskemi ve İR gruplarına kıyasla, testislerde hasarı azalmış bir histolojik görünüm gözlenmiştir (Ozbal ve ark. 2012). Buna göre α LA'nın düzeltici etkilerinin doku düzeyinde de belirgin olduğu söylenebilir.

6.SONUÇ

Deneysel varikozel modeli oluşturduğumuz bu çalışmamızda, α LA'nın oksidatif strese bağı olarak oluşan testis hasarı üzerine antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri araştırıldı.

1. Deneysel varikozel modeli oluşturulan grupta sıçanların testislerinde MDA düzeyleri artmış olarak saptanmış olup oksidatif stres artışının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.
2. Yine aynı varikozel grubunda antioksidan enzimler olan CAT ve GSH-Px enzim aktiviteleri anlamlı derecede azalmış olup varikozelin sadece oksidatif stresi arttırmayıp aynı zamanda antioksidan kapasiteyi de baskıladığı söylenebilir.
3. α LA'nın 6 hafta uygulandığı tedavi grubunda (V+ α LA) varikozelin oluşturduğu oksidatif hasarın göstergesi olan MDA düzeyinin artışını engellediği saptanmıştır. Ayrıca CAT ve GSH-Px aktivitelerinde de istatistiksel anlamlı iyileşme gözlenmiştir. Buna göre α LA'nın hem oksidatif stresi azalttığı hem de antioksidan kapasiteyi arttırdığı söylenebilir.
4. α LA, inflamatuvar medyatörlerden TNF- α ve IL-6 ile apoptotik marker olan NF- κ B'nin serum seviyelerinde varikozele bağı artışını engellemiştir. Bu etki histolojik incelemelerde de İstatistiksel olarak anlamlı derecede gözlemlenmiştir. Bu nedenle α LA'nın varikozele bağı doku hasarını engelleyici etkisine antioksidan etkinliğinin yanında antiinflamatuvar etkinliğinin de katkıda bulunduğu söylenebilir.
5. Son olarak 6 hafta süren α LA kullanımının hem doku hem de serum parametreleri üzerine olan olumlu etkileri sonucunda serum testosteron düzeylerinde de anlamlı iyileşmeler gözlenmiştir.

Tüm bulgular ışığında varikozele bağı testis hasarında α LA, hem doku hasarını önleyici hem de testosteron düzeylerini iyileştirici etkileri ile bir tedavi seçeneği olarak düşünülebilir.

Bu çalışmada tedavi öncesi ve sonrasında sperm sayılarının ve morfolojilerinin belirlenmemiş olması bir kısıtlılık olarak öne çıkmaktadır. α LA'nın infertilite ile ilişkili olarak insanda sperm sayı ve morfolojisininide kapsayan klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. Bununla birlikte uzun süreli yüksek kronik α LA takviye seviyeleri oksidatif protein hasarı ve plazma lipid hidroperoksiti arttırırken orta dereceli α LA dozlarının az sayıda yan etkisi vardır (Ozbal ve ark. 2012). Ayrıca α LA'nın testiküler hasar üzerine iyileştirici etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma olduğundan elde edilen sonuçların sonraki klinik çalışmalara katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

7.KAYNAKLAR

1. **Abdel-Meguid TA, Farsi HM, Al-Sayyad A, Tayib A, Mosli HA, ve ark.** Effects of varicocele on serum testosterone and changes of testosterone after varicocelectomy: a prospective controlled study. *Urology*,**2014**,84(5):1081-7.
2. **Abd-Elmoaty MA, Saleh R, Sharma R, Agarwal A.** Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. *Fertility and Sterility*, **2010**, 94(4):1531–1534.
3. **Adewoyin M, Ibrahim M, Roszaman R, Isa MLM, Alewi NAM, ve ark.** Male Infertility: The Effect of Natural Antioxidants and Phytocompounds on Seminal Oxidative Stress. *Diseases*,**2017**, 1;5(1).
4. **Aebi H, Wyss SR, Scherz B, Skvaril F.** Heterogeneity of erythrocyte catÖCse II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits.*Eur J Biochem*, **1974**, 1;48(1):137-45.
5. **Agarwal A, Sharma RK, Desai NR, Prabakaran S, Tavares A, ve ark.** Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. *Urology*, **2009**, 73(3):461-9.
6. **Akbay E, Cayan S, Doruk E, Duce MN, Bozlu M.** The prevalence of varicocele and varicocele-related testicular atrophy in Turkish children and adolescents. *BJU Int*, **2000**, 86(4):490-3.
7. **Alizadeh M, Nasebakht A, Valizadeh R, Fallah MM, Afshari AT, ve ark.** A preliminary evaluation of serum level of testosterone, lh, and Fsh in patients with varicocele after varicocelectomy as a kidney-related disease. *Therapeutics and clinical risk management*, **2018**, 4:14:1585-1590
8. **Alsaikhan B, Alrabeeah K, Delouya G, Zini A.**Epidemiology of varicocele.*Asian J Androl*, **2016**, 18(2):179-81.
9. **Aly HA, Lightfoot DA, El-Shemy HA.** Modulatory role of lipoic acid on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in adult rat Sertoli cells in vitro. *Chem Biol Interact*,**2009**, 10;182(2-3):112-8.
10. **Ambrosi N, Guerrieri D, Caro F, Sanchez F, Haeublein G, ve ark.** Alpha Lipoic Acid: A Therapeutic Strategy that Tend to Limit the Action of Free Radicals in Transplantation.*Int J Mol Sci*, **2018**, 4;19(1).
11. **Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S.**Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*,**2014**, 2014:360438.
12. **Azenabor A, Ekun AO, Akinloye O.** Impact of Inflammation on Male Reproductive Tract.*J Reprod Infertil*, **2015**, 16(3):123-9.
13. **Barqawi A, Caruso A, Meacham RB.** Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *J Urol*, **2004**, 171(1):501-3.
14. **Beckman KB, Ames BN.** Endogenous oxidative damage of mtDNA. *Mutat Res*, **1999**, 8;424(1-2):51-8.
15. **Berlett BS, Stadtman ER.** Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem*, **1997**, 15;272(33):20313-6.
16. **Böhler T, Waiser J, Hepburn H, Gaedeke J, Lehmann C, ve ark.**TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine*,**2000**, 12(7):986-91.
17. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*,**1976**, 7;72:248-54.
18. **Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, ve ark.** Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med*,**1998**, 24(6):1023-39.
19. **Camejo MI, Segnini A, Proverbio F.** Interleukin-6 (IL-6) in seminal plasma of infertile men, and lipid peroxidation of their sperm. *Archives of andrology*,**2001**, 47(2): 97-101.
20. **Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P.** Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med*,**2005**, 1;39(7):841-52.
21. **Cho CL, Esteves SC, Agarwal A.** Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygenspecies and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl*, **2016**, 18(2):186-93.

22. **Dubin L, Amelar RD.** Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril*, **1970**, 21(8):606-9.
23. **El-Beshbishy HA, Mariah RA, Al-Azhary NM, Aly HA, Ozbak HA, ve ark.** Influence of lipoic acid on testicular toxicity induced by bi-n-butyl phthalate in rats. *Food Chem Toxicol*, **2014**, 71:26-32.
24. **El-Beshbishy HA, Aly HA, El-Shafey M.** Lipoic acid mitigates bisphenol A-induced testicular mitochondrial toxicity in rats. *Toxicol Ind Health*, **2013**, (10):875-87.
25. **Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H.** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, **1991**, 11(1):81-128.
26. **Fraczek M, Kurpisz M.** Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *J Androl*, **2007**, 28(2):325-33.
27. **Galano A, Tan DX, Reiter RJ.** Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage. *Molecules*, **2018**, 27;23(3). pii: E530.
28. **Gao F, Kinnula VL, Myllärniemi M, Oury TD.** Extracellular Superoxide Dismutase in Pulmonary Fibrosis. *Antioxid Redox Signal*, **2008**, 10(2): 343-354.
29. **Garg H, Kumar R.** An update on the role of medical treatment including antioxidant therapy in varicocele. *Asian J Androl*, **2016**, 18(2): 222–228.
30. **Gat Y, Gornish M, Navon U, Chakraborty J, Bachar GN, ve ark.** Right varicocele and hypoxia, crucial factors in male infertility: fluid mechanics analysis of the impaired testicular drainage system. *Reproductive biomedicine online*, **2006**, 13(4):510-515.
31. **Gill-Sharma MK.** Testosterone Retention Mechanism in Sertoli Cells: A Biochemical Perspective. *The open biochemistry journal*, **2018**, 12: 103.
32. **Gomes MB, Negrato CA.** Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetol Metab Syndr*, **2014**, 6: 80.
33. **Goraca A, Huk-Kolega H, Kowalczyk A, Skibska B.** Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of lipoic acid in rat liver. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, **2015**, 4;69:270-6.
34. **Guimarães SB, Santos JM, Aragão AA, de Sandes Kimura O, Barbosa PH, ve ark.** Protective effect of alpha-lipoic acid in experimental spermatic cord torsion. *Nutrition*, **2007**, 23(1):76-80.
35. **Gutteridge JM.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, **1995**, 41(12 Pt 2):1819-28.
36. **Güleş Ö, Eren Ü.** Protective role of alpha lipoic acid against polychlorobiphenyl (Aroclor 1254)-induced testicular toxicity in rats. *Rom J Morphol Embryol*, **2016**, 57(2):451-9.
37. **Habibi B, Seifi B, Mougahi SM, Ojaghi M, Sadeghipour HR.** Increases in interleukin-6 and interferon-gamma levels is progressive in immature rats with varicocele. *Ir J Med Sci*, **2015**, 184(2):531-7.
38. **Haugaard N, Levin RM, Surname F.** Regulation of the activity of choline acetyl transferase by lipoic acid. *Mol Cell Biochem*, **2000**, 213(1–2):61–3.
39. **Havrylyuk A, Chopyak V, Boyko Y, Kril I, Kurpisz M.** Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Central-European journal of immunology*, **2015**, 40(3), 337.
40. **Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A.** Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *The Journal of urology*, **1999**, 161(6):1831–1834
41. **Hsiao W, Rosoff J. S, Pale JR, Powell JL, Goldstein M.** Varicocelectomy is associated with increases in serum testosterone independent of clinical grade. *Urology*, **2013**, 81(6):1213–1218.
42. **Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Cekmen M, Otuncemur A, ve ark.** Chemoprotective effect of a nuclear factor-kappaB inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate, against cisplatin-induced testicular damage in rats. *J Androl*, **2009**, 30(5):505-14.
43. **Imai H, Nakagawa Y.** Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, **2003**, 15;34(2):145-69.
44. *J Assist Reprod Genet*, **2014**, 31(5): 521–526.
45. **Johnsen SG.** Testicular biopsy score count- a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 325 hypogonadal males. *Hormones*, **1970**, 1: 1–24.
46. **Karabulut H, Gülay MŞ.** Antioksidanlar. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2016**, 1(1), 65-76.
47. **Kasnak C, Palamutoğlu R.** Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, **2015**, 3(5), 226-234.
48. **Khademi Bami M, Dehghan Tezerjani M, Montazeri F, Ashrafzadeh Mehrjardi HR, Ghasemi-Esmailabad S, ve ark.** Tumor Necrosis Factor Alpha -308 G/A Single Nucleotide Polymorphism and Risk of Sperm Abnormalities in Iranian Males. *Int J Fertil Steril*, **2017**, 11(2):112-116.

49. Köksal T, Tefekli A, Usta M, Erol H, Abbasoglu S. ve ark. The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. *BJU International*, 2000, 86(4):549–552.
50. Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2009, a001651.
51. Lebda M, Gad S, Gaafar H. Effects of lipoic Acid on acrylamide induced testicular damage. *Mater Sociomed*, 2014, 26(3):208-12
52. Leslie SW, Siref LE. Varicocele. *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2018.
53. Li G, Fu J, Zhao Y, Ji K, Luan T, ve ark. Alpha-lipoic acid exerts anti-inflammatory effects on lipopolysaccharide-stimulated rat mesangial cells via inhibition of nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway. *Inflammation*, 2015, 38(2):510-9.
54. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, ve ark. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*, 2018, 26;13:757-772.
55. Lundy SD, Sabanegh ES. Varicocele management for infertility and pain: A systematic review. *Arab journal of urology*, 2017, 16(1):157-170.
56. Luo DY, Yang G, Liu JJ, Yang YR, Dong Q. Effects of varicocele on testosterone, apoptosis and expression of StAR mRNA in rat Leydig cells. *Asian J Androl*, 2011, 13(2):287-91.
57. Maiorino M, Mauri P, Roveri A, Benazzi L, Toppo S, ve ark. Primary structure of the nuclear forms of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in rat spermatozoa. *FEBS Lett*, 2005, 31:579(3):667-70.
58. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress and male infertility. *Indian Journal of Medical Research*, 2009, 129(4):357–368.
59. Martínez P, Proverbio F, Camejo ML. Sperm lipid peroxidation and pro-inflammatory cytokines. *Asian J Androl*, 2007, 9(1):102-7.
60. Masson P, Brannigan RE. The varicocele. *The Urologic Clinics of North America*, 2014, 41(1):129-144.
61. Matalliotakis I, Kiriakou D, Fragouli I, Sifakis S, Eliopoulos G, ve ark. Interleukin-6 in seminal plasma of fertile and infertile men. *Arch Androl*, 1998, 41(1):43-50.
62. Mazhari S, Razi M, Sadrkhanlou R. Silymarin and celecoxib ameliorate experimental varicocele-induced pathogenesis: evidences for oxidative stress and inflammation inhibition. *International urology and nephrology*, 2018, 50(6):1039-1052.
63. Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2005, 3: 30-39.
64. Mendes TB, Paccola CC, de Oliveira Neves FM, Simas JN, da Costa Vaz A ve ark. Resveratrol improves reproductive parameters of adult rats varicocelized in peripuberty. *Reproduction*, 2016, 152(1):23–35.
65. Minutoli L, Irrera N, Squadrito F, Marini H, Nicotina PA, ve ark. Effects of ischaemic post-conditioning on the early and late testicular damage after experimental testis ischaemia-reperfusion. *Andrology*, 2014, 2(1):76-82.
66. Mirtaheri E, Gargari BP, Kolahi S, Dehghan P, Asghari-Jafarabadi M, ve ark. Effects of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Inflammatory Biomarkers and Matrix Metalloproteinase-3 in Rheumatoid Arthritis Patients. *J Am Coll Nutr*, 2015, 34(4):310-7.
67. Missassi G, Dos Santos Borges C, de Lima Rosa J, Villela E Silva P, da Cunha Martins A Jr, ve ark. Chrysin Administration Protects against Oxidative Damage in Varicocele-Induced Adult Rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:2172981.
68. Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, Imam H, Othman IA. Varicolectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *International Journal of Andrology*, 2001, 24(5):261–265.
69. Nallella KP, Allamaneni SS, Pasqualotto FF, Sharma RK, Thomas AJ Jr, ve ark. Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in patients with varicocele. *Urology*, 2004, 64(5):1010-3.
70. Nasole E, Nicoletti C, Yang ZJ, Girelli A, Rubini A, ve ark. Effects of alpha lipoic acid and its R+ enantiomer supplemented to hyperbaric oxygen therapy on interleukin-6, TNF- α and EGF production in chronic leg wound healing. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2014, 29(2):297-302.
71. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*, 2001, 7(5):473-81.
72. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Varicocele and male infertility: Part II: Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Human reproduction update*, 2001, 7(5):473-481.

73. **Niederberger, C.** WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male. *Urology*, **2001**,57(1), 208.
74. **Ning JZ, Li W, Cheng F, Rao T, Yu WM, ve ark.** The protective effects of GYY4137 on ipsilateral testicular injury in experimentally varicocele-induced rats. *Exp Ther Med*, **2018**, 15(1):433-439.
75. **Ning JZ, Rao T, Cheng F, Yu WM, Ruan Y, ve ark.** Effect of varicocelectomy treatment on spermatogenesis and apoptosis via the induction of heat shock protein 70 in varicocele-induced rats. *Mol Med Rep*, **2017**, 16(4):5406-5412.
76. **Onyango AN.** The Contribution of Singlet Oxygen to Insulin Resistance. *Oxid Med Cell Longev*, **2017**, 2017:8765972.
77. **Ozbal S, Ergur BU, Erbil G, Tekmen I, Bagrıyanık A, ve ark.** The effects of α -lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *The Scientific World Journal*, **2012**, 2012: 489248.
78. **Ozbal S, Erbil G, Koçdor H, Tuğyan K, Pekçetin C, ve ark.** The effects of selenium against cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *Neurosci Lett*, **2008**, 27;438(3):265-9.
79. **Ozbek E, Yurekli M, Soylu A, Davarci M, Balbay MD.** The role of adrenomedullin in varicocele and impotence. *BJU Int*, **2000**, 86(6):694-8.
80. **Ozcan L, Otunctemur A, Polat EC, Ozbek E, Kirecci SL, ve ark.**Selective Nuclear Factor Kappa b (NFkB) Inhibitor, Pyrrolidium Dithiocarbamate Prevents, Long-Term Histologic Damage in Ischemia-Reperfusion Injuries after Delayed Testicular Torsion. *Urol J*, **2016**, 28;13(3):2702-6.
81. **Özcan O, Erdal H, Çakırca G, Yönden Z.** Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, **2015**, 6.3.
82. **Paglia DE, Valentine WN.** Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab & Clin Med*,**1967**,70:158-169.
83. **Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, ve ark.**Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB J*, **2001**, 15(7):1236-8.
84. **Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C.** Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, **2008**, 4(2):89-96.
85. **Pınar N, Çakırca G, Özgür T, Kaplan M.** The protective effects of alpha lipoic acid on methotrexate induced testis injury in rats. *Biomed Pharmacother*,**2018**, 97:1486-1492
86. **Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P.**Lipoic acid modulates adriamycin-induced testicular toxicity. *Reprod Toxicol*,**2006**, 21(1):54-9.
87. **Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P.** Modulatory role of lipoic acid on adriamycin-induced testicular injury. *Chem Biol Interact*,**2006**, 25;160(2):108-14.
88. **Razi M, Malekinejad H.**Varicocele-Induced Infertility in Animal Models. *Int J Fertil Steril*, **2015**, 9(2):141-9.
89. **Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, ve ark.** Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant*,**1996**, 11 Suppl 5:48-53.
90. **Rotker K, Sigman M.**Recurrent varicocele. *Asian J Androl*, **2016**, 18(2): 229–233.
91. **Salehi F, Behboudi H, Kavooosi G, Ardestani SK.**Oxidative DNA damage induced by ROS modulating agents with the ability to target DNA: A comparison of the biological characteristics of citrus pectin and apple pectin. *Sci Rep*,**2018**, 17;8(1):13902.
92. **Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, ve ark.** Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res*,**1994**, 20(2):119-33.
93. **Seifar F, Khalili M, Khaledyan H, Amiri Moghadam S, Izadi A, ve ark.** α - Lipoic acid, functional fatty acid, as a novel therapeutic alternative for central nervous system diseases: A review. *Nutr Neurosci*.**2017**,29:1-11.
94. **Selvakumar E, Prahalathan C, Mythili Y, Varalakshmi P.** Protective effect of DL-alpha-lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. *Reprod Toxicol*, **2004**, 19(2):163-7.
95. **Sen S, Chakraborty R.** The role of antioxidants in human health. *Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy*, **2011**, 1083:1-37.
96. **SheehanMM, RamasamyR, Lamb DJ.**Molecular mechanisms involved in varicocele-associated infertility. *J Assist Reprod Genet*,**2014**, 31(5): 521–526.
97. **Simsek A, Ozbek E, Ilbey YO, Cekmen M, Somay A, ve ark.** Potential role of p38-mitogene-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B expression in testicular dysfunction associated with varicocele: an experimental study. *Andrologia*, **2012**, 44 Suppl 1:94-101.

- 98. Soleimani MZ, Jalali Mashayekhi F, Mousavi Hasanzade M, Baazm M.** Alteration in CatSper1 and 2 genes expression, sperm parameters and testis histology in varicoceles rats. *Int J Reprod Biomed (Yazd)*, **2018**, 16(3):183-190.
- 99. Soylu A, Yılmaz U, Davarcı M, Baydıncı C.** Bilateral disruption of corpus cavernosum with complete urethral rupture. *Int J Urol*, **2004**, 11(9):811-2.
- 100. Tanrikut C, McQuaid JW, Goldstein M.** The impact of varicocele and varicocele repair on serum testosterone. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, **2011**, Volume 23 - Issue 4 - p 227–231.
- 101. Tibullo D, Li Volti G, Giallongo C, Grasso S, Tomassoni D, ve ark.** Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and antiinflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflamm Res*, **2017**, 66(11):947-959.
- 102. Tremellen K.** Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Hum Reprod Update*, **2008**, 14(3):243-58.
- 103. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL.** Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*, **2004**, 25(4):612-28.
- 104. Wang L, Yi L, Yang L, Liu Z, Rao J, ve ark.** Diagnosis and surgical treatment of nutcracker syndrome: a single-center experience. *Urology*, **2009**, 73(4):871-876.
- 105. Wasowicz W, Nève J, Peretz A.** Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem*, **1993**, 39(12):2522-6.
- 106. Whitaker AM, Schaich MA, Smith MR, Flynn TS, Freudenthal BD.** Base excision repair of oxidative DNA damage: from mechanism to disease. *Front Biosci (Landmark Ed)*, **2017**, 1;22:1493-1522.
- 107. Xia X, Su C, Fu J, Zhang P, Jiang X, ve ark.** Role of α -lipoic acid in LPS/d-GalN induced fulminant hepatic failure in mice: studies on oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Int Immunopharmacol*, **2014**, 22(2):293-302.
- 108. Yama OE, Amah CI, Okoko IE, Kusemiju TO, Ekundayo OT.** Fertility Ratio and the Johnsen Histological Scoring of Testicular Tissues in Momordica charantia-Treated Male Sprague-Dawley Rats. *UNILAG Journal Basic Medical Sciences*, **2013**, 1.1.
- 109. Young IS, Woodside JV.** Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, **2001**, 54.3:176-186
- 110. Zhang L, Zhao X, Wang F, Lin Q, Wang W.** Effects of Morinda officinalis Polysaccharide on Experimental Varicocele Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2016**, 2016:5365291.

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Muş'da doğdu. 2006 yılında Malatya İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı ve 2010 yılında derece ile mezun oldu. 2014 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Evli ve bir kız çocuk annesi.

