

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL SIÇAN VARİKOSEL MODELİNDE VARİKOSELİN
OLUŞTURDUĞU TESTİKÜLER HASAR ÜZERİNE DİOSMİN-
HESPERİDİNİN ETKİLERİ**

Dr. Faruk DOĞAN

**UZMANLIK TEZİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Taylan OKSAY**

**“Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
tarafından 2181-TU-10 proje no.su ile desteklenmiştir”**

ISPARTA-2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Alim KOŞAR başta olmak üzere Genel Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mahmut BÜLBÜL'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez konusunun seçilmesi, tezin yürütülmesinde gösterdiği sabrı, teşvikleri ve eğitimim boyunca her konuda yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Abdullah ARMAĞAN'a çok teşekkür ederim.

Her zaman olduğu gibi tezin oluşmasında ve son halini almasında yükümü paylaşan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Taylan OKSAY'a çok teşekkür ederim.

Biyokimyasal analizler ve bu konuda her türlü sorunumda bana yardımcı olan Arş. Gör. Firdevs AYLAK ve Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ hocama,

Histolojik çalışmalarda ve bu konuda her türlü sorunumda bana yardımcı olan Arş. Gör. Hakan DARICI ve Arş. Gör. Aydın CANDAN'a

İhtisas eğitimi boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, birlikte emek verdiğim hemşire ve hastane personeline teşekkür ederim.

Hayatım boyunca daima yanımda olan aileme ve her zaman yanımda hissettiğim, tüm kalbiyle her türlü desteği veren canım eşime ve yaşam sevincim biricik kızım Merve Berda'ya şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Varikosel	3
2.1.1. Varikosel Epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Sıklık	3
2.1.3. Anatomik Özellikler ve Patofizyoloji	3
2.1.4. Etiyoloji.....	4
2.2. Varikosel ve Testiküler Hasar	5
2.2.1. Testiküler Kan Akımı.....	6
2.2.2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi.....	7
2.2.3. Hipertermi	7
2.2.4. Venöz Basınç	8
2.2.5. Renal-Adrenal Reflü	9
2.2.6. Hormonal Disfonksiyon.....	9
2.2.7. Otoimmünite	10
2.2.8. Akrozom Reaksiyonu.....	10
2.2.9. Varikoselin Testis Hacmi Üzerine Etkisi.....	11
2.2.10. Varikoselin Testis Histolojisi Üzerine Etkisi:.....	11
2.3. Oksidatif Stres	13
2.3.1. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Sistemleri	13
2.3.2. Testiste Oksidatif Stres	14
2.4. Apoptozis	16
2.4.1. Apoptozis Mekanizmaları	17
2.4.2. Apoptozisin Genetik Kontrolü	17
2.4.3. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar	18
2.4.4. Reaktif Oksijen Radikalleri ve Apoptoz	20

2.4.5. Apoptozis ve Testis.....	20
2.4.6. Varikoselde Apoptozis.....	21
2.5. Matriks Metalloproteinazlar (MMPs) ve Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMP)	22
2.5.1. MMP'lerin Yapısı	24
2.5.2. Metalloproteinazların Sınıflandırılması	25
2.5.3. MMP Ekspresyonunun Regülasyonu.....	29
2.5.4. Matriks Metalloproteinaz-Aracılıklı Ayrışma ile Oluşturulan Biyolojik Aktiviteler	29
2.5.6. Endojen Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri	30
2.5.7. Metalloproteinazların Doku İnhibitörlerinin Biyolojik Fonksiyonları	31
2.6. Varikoselde Tanı	32
2.7. Varikoselde Tedavi	33
2.8. Varikoselin Medikal Tedavisi.....	34
2.9. Saflaştırılmış Mikronize Flavonoid Fraksiyonu (MPFF) [Daflon® 500mg]... 35	
2.9.1. Biyokimyası	36
2.9.2. Etki Mekanizmaları.....	36
2.9.3. Klinik Endikasyonları	37
2.9.4. Etkileşimi	38
3. MATERYAL ve METOD	39
3.1. Deney Hayvanları.....	39
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	39
3.3. Cerrahi İşlem.....	40
3.4. MPFF Uygulaması ve Periyotlar.....	41
3.5. Testiküler Mikrovasküler Kan Akım Ölçümü	42
3.5.1. Mikrosirkülasyon	43
3.5.2. Laser Doppler Teorisi	43
3.6. Histopatolojik İnceleme	45
3.6.1. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları	45
3.6.2. İmmünohistokimyasal Çalışma Protokolü:.....	46
3.6.3. Johnsen Skorlaması.....	48
3.6.4. Apoptotik İndekslerin Hesaplanması	49
3.7. Biyokimya Protokolü	49
3.8. İstatistiksel İnceleme	50

4. BULGULAR	51
4.1. Testis Volümleri.....	51
4.2. Testiküler Mikrovasküler Kan Akım Ölçümleri.....	53
4.3. Doku MDA Düzeyleri.....	56
4.4. Johnsen Skorlarının Değerlendirilmesi.....	59
4.5. Apoptozisin Değerlendirilmesi.....	66
4.6. Matriks Metalloproteinaz-2, 9 (MMP-2,9) ve Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü'nün (TIMP-1) Sol Testis Doku Düzeyleri.....	71
4.6.1. Sol Testis Doku MMP-2 Düzeyleri.....	71
4.6.2. Sol Testis Doku MMP-9 Düzeyleri.....	73
4.6.3. Sol Testis Doku TIMP-1 Düzeyleri.....	74
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ	89
ÖZET	91
SUMMARY	93
KAYNAKLAR	95

KISALTMALAR DİZİNİ

ASA	: Anti sperm antikör
DNA	: Deoksiribonükleik asit
eNOS	: Ekstraselüler matriks
ECM	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
FSH	: Folikül uyaran hormon
GSH	: Glutasyon
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GF-BP	: İnsülin Like Growth Factor
GnRH	: Gonodotropin Relasing Hormon Binding Protein
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HSP-70-2	: Heat Shock Protein
HE	: Hematoksilen Eozin
ICAM	: İntraselüler Adezyon Molekülü
IL	: İnterlökin
KDa	: Kilo dalton ağırlık
LH	: Luteinize edici hormon
MDA	: Malondialdehit
MMPF	: Micronised Purified Flavonoid Fraction
MMPs	: Matriks Metalloproteinazlar
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NO	: Nitrik oksit
ng	: Nanogram
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
pg	: pikogram
PGE	: Prostaglandin
RASI	: T-Hücre kökenli bir oto antijen
ROO	: Peroksi
RO	: Alkoksi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNA	: Ribonükleik asit

SCO	: Sertoli Cell Only “Sadece Sertoli hücresi bulunan”
SOD	: Süper oksit dismutaz
TGF	: Transforming Growth Factor
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
TUNEL	: Terminal d-UTP Nick-End Labeling
TIMP	: Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri
TxA	: Tromboksan

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Grupların her iki testis ortalama ağırlıkları (gr) ve kontrol grubu ile karşılaştırılması	51
Tablo 2. Grupların her iki testis ağırlıklarının varikozel grubu ile karşılaştırılması .	52
Tablo 3. Her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılması	54
Tablo 4. Her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerlerinin varikozel grubu ile karşılaştırılması	55
Tablo 5. Grupların her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama MDA değerleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılması	57
Tablo 6. Grupların her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama MDA değerlerinin varikozel grubu ile karşılaştırılması	58
Tablo 7. Her iki testiste grupların Johnsen skorlarının ortalamaları ve kontrol grubu ile karşılaştırılması	60
Tablo 8. Her iki testiste grupların Johnsen skoru ortalamalarının varikozel grubu ile karşılaştırılması	61
Tablo 9. Her iki testiste grupların apoptotik indeks ortalamaları ve kontrol grubu ile karşılaştırılması	67
Tablo 10. Her iki testiste grupların apoptotik indeks ortalamalarının varikozel grubu ile karşılaştırılması	68
Tablo 11. Tüm grupların ortalama sol testis doku MMM-2, MMP-9, TIMP-1 düzeyleri	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. MMP'lerin moleküler (131) ve şematik şekli.....	25
Şekil 2. 1-diosmin ve 2-hesperidinin kimyasal yapıları.....	37
Şekil 3. PeriFlux System 5000 Lazer Doppler probunun çalışma prensibi	44
Şekil 4. Grupların her iki testis ağırlığının(gr) karşılaştırılması	53
Şekil 5. Her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri (PU).....	55
Şekil 6. Her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri.....	56
Şekil 7. Her iki testiste MDA düzeylerinin karşılaştırılması (nmol/mg protein).....	59
Şekil 8. Sol testiste doku MMP-2 düzeylerinin (ngr/mg protein) karşılaştırılması ...	72
Şekil 9. Sol testiste doku MMP-9 düzeylerinin (ngr/mg protein) karşılaştırılması ...	73
Şekil 10. Sol testiste doku TIMP-1 düzeylerinin (ngr/mg protein) karşılaştırılması.	74

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. PeriFlux System 5000 Laser Doppler Blood Perfusion Monitoring and tcpO2/tcpCO2	42
Resim 2. Kontrol grubuna ait sol testis kesiti.....	62
Resim 3. SHAM grubuna ait sol testis kesiti.....	62
Resim 4. 3. grubuna ait sol testis kesiti	63
Resim 5. 3. grubuna ait sol testis kesiti.	63
Resim 6. 3. grubuna ait sağ testis kesiti.....	64
Resim 7. 4. gruba ait sol testis kesiti	64
Resim 8. 5. gruba ait sol testis kesiti.	65
Resim 9. 6. grubuna ait sol testis kesiti.	65
Resim 10. 7. gruba ait sol testis kesiti.	66
Resim 11. Kontrol grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti.....	69
Resim 12. 3. gruba ait sol testis kesiti	69
Resim 13. 3. gruba ait sağ testis kesiti.....	70
Resim 14. 4 grubuna ait sol testis kesiti.	70
Resim 15. 5. grubuna ait sol testis kesiti.	71

1. GİRİŞ

Varikosel, spermatik kord içerisinde pampiniform pleksusu oluşturan venlerde dilatasyon, staz ve yüksek basınç ile karakterizedir ve erkek infertilitesinin en sık düzeltilebilir nedenidir (1). Varikosel, erişkin erkek popülasyonunun % 15-22'sini etkileyen bir hastalıktır. İnfertilite şikayeti ile başvuran erkeklerde bu oran ortalama % 30-40 iken anormal semen parametrelerine sahip infertil erkeklerde ise % 25 oranındadır (2). Varikoselin hem hayvanlarda hem insanlarda progresif ve zamanla artan testis hasarına yol açtığı bilinmektedir (3). Varikosel, ilerleyici testis hasarı ile seyrederek, testis gelişiminde gerilemeye ve spermatogenezi bozarak infertiliteye neden olabilir (4).

Varikosel fizyopatolojisinde kabul görmüş pek çok teori bulunmaktadır. Bu teoriler arasında testisküler kan akımı, testis-interstisyel sıvı ilişkisi, hipertermi, venöz basınç, renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu, oksidatif stres ve apoptozis sayılabilir (5). Varikoselin vasküler bir olay olmasından dolayı, patofizyolojisinin aydınlatılmasında vasküler yapıya yönelik bir çok çalışmanın yapılmasına yol açmıştır. Son dönemde deneysel varikosel oluşturulmuş çeşitli hayvan modellerinde testiküler kanlanmada artış ve buna bağlı testiküler ısı artışı gösterilmiştir (6,7). Bu ısı artışının da, varikoselde serbest oksijen radikallerini artırdığı ve testiküler hasara yol açtığı bildirilmiştir (8). Varikoseli olan fertil veya infertil erkeklerin semen örneklerinin değerlendirilmesinde, varikoseli olanlarda olmayanlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda reaktif oksijen türleri (ROS) bulunmuştur (9).

Varikoselin fizyopatolojisini aydınlatmak için moleküler düzeyde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri de apoptozistir. Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar. Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (10). Varikosel nedeni ile incelenen hastaların testislerinde oluşan hasarda apoptozisin rolünü inceleyen bir çalışmada, testis histopatolojik incelemesinde olguların üçte birinde testiküler dokuda programlı hücre ölümünde anlamlı oranda artış saptanmıştır (11). Aynı şekilde diğer bir çalışmada ise, deneysel

olarak varikosel oluşturulan erişkin tip ratlarda testis kan akımındaki artışa paralel olarak testiküler apoptoziste artma bildirilmiştir (8).

Son yıllarda varikoselin tedavisi ile ilgili araştırmalar oldukça artmakta ve dikkatler moleküler düzeyde yapılan çalışmalara çekilmektedir. Varikosel modelinde matriks metalloproteinazlar (MMPs) ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) ile yapılan çalışmalara rastlanmadı. Varikoselin fizyopatolojisini aydınlatmak için deneysel varikosel modelinde MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 seviyelerini inceledik.

Çalışmamızın amacı, varikosel gibi kronik venöz yetmezlik zemininde gelişen alt ekstremitte varisi ve hemoroidin semptomatik tedavisinde kullanılan diosmin-hesperidin ve varikoselektominin, testiküler venöz sistem üzerinden etki ederek, testiste, varikosele bağlı olarak meydana gelebilecek patolojileri önlemede ne kadar etkili olduğunu göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Varikosel

2.1.1. Varikosel Epidemiyolojisi

Varikosel, spermatik kord içerisinde pampiniform pleksusu oluşturan venlerde dilatasyon, staz ve yüksek basınç ile karakterizedir ve erkek infertilitesinin en sık düzeltilebilir nedenidir (1,12). Varikosel sol renal venin veya internal spermatik venin tümör ya da başka bir patoloji sonucu kompresyona uğraması sonucu oluşabildiği gibi ileri evre böbrek tümörünün renal vene invazyonu sonrası veya bu venin obstrüksiyonuna sekonder olarak oluşabilir. Ancak klinikte infertilite şikayeti ile gelen hastaların çoğunda karşılaşılan ve infertilite ile ilişkili olan primer varikoseldir (13).

2.1.2. Sıklık

Varikosel, erişkin erkek popülasyonunun % 15-22'sini etkileyen bir hastalıktır. İnfertilite şikayeti ile başvuran erkeklerde bu oran ortalama % 30-40 iken anormal semen parametrelerine sahip infertil erkeklerde ise % 25 oranındadır (2). Sekonder infertilite nedeniyle kliniğe başvuran olgularda, varikosel görülme sıklığı artarak % 69-81 oranına ulaşmaktadır. Bununla birlikte, varikosele sahip olguların % 80'inde infertilite bulunmamaktadır (14). Varikoseli olan erkeklerin birinci derece yakınlarında hastalığın görülme sıklığı genel popülasyondan önemli derecede yüksek olup % 53 oranında saptanmaktadır. Ayrıca, ırklara göre sıklık farkı bildirilmemiştir (15).

2.1.3. Anatomik Özellikler ve Patofizyoloji

Varikosel lokalizasyon olarak daha çok sol tarafta görülür. Varikoselin solda görülme sıklığı yaklaşık % 90 oranındayken, tek başına sağ tarafta ise % 2'den azdır. İzole sağ varikosel situs inversus dışında vena kava inferior ya da sağ internal spermatik vende kompresyona veya obstrüksiyona yol açan patolojilere (tromboz) bağlı olarak oluşur (16).

2.1.4. Etiyoloji

Varikoselin etiyojisi karışık ve tartışmalı olup; anatomik değişkenlikler, doğumsal ve/veya edinsel valv disfonksiyonuna ikincil gelişen venöz reflü ve venöz obstrüksiyon gibi değişik teoriler ileri sürülmektedir.

Varikosel etiyojisinde günümüzde kabul görmüş 3 teori bulunmaktadır (17).

1. Sağ ve sol internal spermatic venler arasında anatomik farklılıklar: Sol internal spermatic ven sol renal vene dik açıyla drene olurken, sağda dar açı ile oblik olarak vena kava inferiora drene olur. İnternal spermatic ven, solda sağa göre 8-10 cm daha uzundur. Anatomik yapıdaki bu farklılıklar, sol tarafta hidrostatik basınç artışına neden olmaktadır ve sonucunda pampiniform pleksusa iletilen basınç venlerde dilatasyon ve kıvrılmaya yol açmaktadır (16).

2. Venöz kanın reflüsü ile sonuçlanan kompetan venöz valvlerin olmayışı: Varikoselli erkeklerde sol renal ven ve internal spermatic ven birleşim düzeyinde valv bulunmadığı gösterilmiştir (18-21). Ayrıca Ahlberg'in 1965 yılında rasgele seçilen 79 kadavrada yaptığı çalışma, sol internal spermatic venin kranial kısmında % 46 oranında valv olmadığını göstermiştir (19). Yapılan başka bir çalışmada ise varikoseli olan 659 erkeğin retrograd venografik çalışması incelendiğinde % 73'ünde venöz valvlerin bulunmadığı gösterilmiştir (22). Ancak, yeterli kapakçık sistemine sahip hastalarda da % 26,2 oranında varikosel görülebilmektedir (23). Bazı araştırmacılara göre, kapakçıkların yokluğu varikosel gelişimine katkıda bulunmaktadır, ancak, direkt altta yatan neden değildir (23,24).

Reflüdeki ikinci mekanizma ise, venöz kollaterallerin varlığında kan akımının normal gonadal venöz sisteme olan reflüsüdür (21). Pleksus pampiniformiste kollateral oluşturan iki venöz sistem bulunmaktadır:

a) Yüzeysel venöz sistem

b) Derin venöz sistem

Yüzeysel venöz sistemde skrotal, eksternal spermatic, epigastrik, safen ve femoral venler bulunur. Öte yandan derin venöz sistem, penil, krural, pelvik, lomber ve renal venöz sistemi içerir. Varikoselde internal venöz sistemdeki dilatasyona ek

olarak, eksternal kremasterik sistemin dilatasyonu da klinik öneme sahiptir. Coolsaet, sol ana iliak venin parsiyel obstrüksiyonunda eksternal spermatic vende ve pampiniform pleksusda dilatasyon olduğunu göstermiştir (20). Eksternal spermatic ven, varikoseli saptanmayan erişkinlerde normalde 2-3 mm çapındadır. Öte yandan, 4 mm ve daha dilate eksternal spermatic ven çapı görülme oranı ise % 16-74 olarak bildirilmiştir (25). Varikoselektomi sırasında saptanamayan ya da bağlanmayan bu venler nedeni ile nüks oluşabilmektedir.

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

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

b) Distal tip: Sol ana iliak arterin kompresyonuna bağlı olarak sol ana iliak venin kompresyona uğraması (insidans: % 0.5) (22).

Varikosel gelişiminde embriyolojik faktörlerin de rol oynadığı ileri sürülmektedir. Embriyolojik gelişim esnasında sol taraftaki vasküler yapılar daha elastik dokuya sahip olduğu için sol tarafın daha zayıf drene olmasına ve kollateral venlerin açık kalmasına neden olmaktadır (22,23). Situs inversusta sadece sağda varikosel görülmesi bu embriyolojik olayı destekler.

2.2. Varikosel ve Testiküler Hasar

Varikoselin hem hayvanlarda hem insanlarda progresif ve zamanla artan testis hasarına yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca varikosel, erkek infertilitesinin en sık rastlanan nedenleri arasındadır (3). Varikosel, ilerleyici testis hasarı ile seyrederek, testis gelişiminde gerilemeye ve spermatogenezi bozarak infertiliteye neden olabilir. Varikoselin fertilitate üzerine etkileri; sperm sayısında azalma, sperm motilite ve morfolojisinde bozulma, testiküler volümde azalma ve Leydig hücre fonksiyonunda

azalma ile ilişkilidir (4). Varikoselin patofizyolojisi konusunda sınırlı bilgilere sahip olmamıza rağmen, olası hipotezler arasında (5);

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

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

2.2.1. Testiküler Kan Akımı

Varikoselin vasküler bir olay olmasından dolayı, patofizyolojisinin aydınlatılmasında vasküler yapıya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Green ve Turner bağımsız olarak deneysel hayvan modellerinde varikosele induksiyonu ile intratestiküler mikrovasküler kan akımında artış olduğunu, birlikte histolojik değişiklikler meydana geldiğini göstermişlerdir (7,26). Mikrovasküler kan akımı ve intratestiküler ısı yüksekliğinin fosforilaz aktivitesi ve metabolizmasında artışa neden olduğu ve bu aktivitenin intrasellüler glikojen depolarını tüketerek sonuçta testiküler parankimal hasara yol açtığı kabul görmektedir (26). Ayrıca Saypol ve arkadaşlarının sıçanlar ve köpekler üzerinde yaptığı çalışmada deneysel olarak oluşturulan varikoselin testiküler kan akımında artışa neden olduğu ve bu artışın erken cerrahi onarımı takiben normal düzeylere indiği gösterilmiştir (6).

Bu bulguların aksine, Li ve arkadaşları, deneysel varikosel modelinde kan akımının azaldığını göstermişlerdir ve bunun da bozulmuş Sertoli hücre fonksiyonunun göstergesi olduğunu savunmuşlardır (27).

Ayrıca insanlarda yapılan renkli doppler ultrasonografi çalışmalarında varikoseli olmayan kontrollere göre varikoseli olanlarda kan akımında anlamlı farklılıklar olduğu gösterilmiştir (28).

2.2.2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi

Testiküler interstisyel sıvı; testiküler hücreler ve dolaşım arasında endokrin etkileşimi ve hücreler arasındaki parakrin mekanizmaları düzenler. Seminifer tübülü ve interstisyel dokudaki hücreleri saran bu sıvı, testis ve testis vaskülaritesi ile bağlantılıdır. Testiküler interstisyel sıvı oluşumunu kontrol eden faktörler ve bu faktörlerdeki değişiklikler, testis işlevinde önemli rol oynamaktadır (29,30). Bu faktörlerden birisi de testis kapillerlerinin vasküler geçirgenliği olabilir. Bu görüşü destekleyen bir bulgu, varikosel oluşturulan ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı oranda fazla polimorfonükleer hücre birikiminin olmasıdır. Ayrıca bu birikim, sol tarafta sağa göre daha fazla gerçekleşmektedir (31).

2.2.3. Hipertermi

Varikosele sekonder olarak gelişen testiküler disfonksiyon için en yaygın kabul gören teorilerin başında gelmektedir. Oligospermik varikoselli hastalarda intraskrotal ısının, varikoseli olmayan kişilere göre 0,6–0,8 C°, intratestiküler ısının da 0,78 C° daha fazla olduğu gösterilmiştir (32,33). Saypol ve arkadaşları tek taraflı deneysel varikosel oluşturulan hayvanlardaki incelemeleri sonucu bilateral testiküler ısı artışı ve bozulmuş spermatogenez saptamışlardır (34). Ancak, bu bulguların aksine, varikoseli olan ve olmayan infertil erkeklerde skrotal ısı arasında fark olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (35).

Adolesan grade 2-3 varikoseli olanlarda hem yatar durumda hem de ayakta ölçülen skrotal ısı düzeyleri, varikoseli olmayan kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (36). Başka bir çalışmada, varikosele bağlı sol tarafta skrotal ısı artışı olan adolesanlarda, ısı artışı ile sol testis volümünün ters korelasyon

gösterdiği bulunmuş ve başarılı varikosektomi sonrasında ısı azalırken testis volümünün arttığı ileri sürülmüştür (37).

Varikozel onarımı öncesinde bilateral intraskrotal ısı artışının, tek taraflı veya iki taraflı varikosektomi sonrasında kontrol grubu düzeylerine indiği ileri sürülmesine karşın, aksi görüşler de bulunmaktadır (38,39). Skrotal ısının değerlendirildiği çalışmalarda farklı sonuçlara ulaşılması, ölçüm yöntemindeki farklılıklara bağlı olarak değişebildiği öne sürülmüştür.

Hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan varikozelin intraskrotal ısı artışına neden olduğu ve varikozel onarımı ile ısının normal hale döndüğü gösterilmiştir (40). Ayrıca, artmış intraskrotal ısının testiküler histolojide de anormalliklere neden olduğu ve ejakülattaki sperm kalitesini düşürdüğü bildirilmiştir (6,41).

Artmış intratestiküler ısının hangi mekanizma ile spermatogenezi bozduğu tam olarak bilinmemekle birlikte Seminifer tübül ve/veya Leydig hücre düzeyinde nükleer DNA ve RNA bağlayıcı proteinlerde direkt termal hasar sonucu spermatogenezi etkilediği düşünülmektedir (42). Ayrıca Sertoli hücrelerinden inhibin ve androjen bağlayıcı proteininin salınımının azaldığı ancak, kısa dönemde Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunun bozulmadığı düşünülmektedir (43). Öne sürülen bir diğer mekanizma, DNA polimeraz aktivitesinde azalmadır. Tek taraflı varikozeli olan infertil hastaların, varikozeli olmayan kontrol grubuna göre her iki testislerinde DNA polimerazların (α,β,γ) aktivitesinde % 50 azalma olduğu ileri sürülmektedir (42).

2.2.4. Venöz Basınç

Varikozel ve venöz basınç değişiklikleri arasındaki ilişki uzun süredir araştırılmıştır ve patofizyolojik mekanizması aydınlatılmaya çalışılmıştır. Varikozele sekonder gelişen venöz basınç artışının testis kan akımını etkileyebileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (44-46). Hamster testisinin subkapsüler yüzeyinde bulunan mikrodamarlardaki intravasküler basınçların direk ölçümü, testiküler kapiller basıncın çok düşük olduğunu ve vasküler ağın arteryel komponenti tarafınca düzenlendiğini ortaya koymuştur. Bu vasküler direncin dağılımı, hamster modelindeki venöz basınç artışına kapiller basıncın oldukça duyarlı olabileceğine işaret edebilir (44). Artmış venöz basınç, intratestiküler onkotik ve hidrostatik

basıncalarda değişikliğe neden olabilir; önemli hormonlar için parakrin ve taşınma ortamını değiştirebilir; mikrovasküler sıvı değişimini bozabilir.

Varikoselektomi uygulanan 60 olguluk bir çalışmada, olguların % 88'inde cerrahi sonrasında venöz basınç değerlerinde azalma saptanmıştır (46). Bu seride, 42 hastanın % 70'inde hem venöz basınçta azalma hem de semen parametrelerinde iyileşme gözlenirken, bu grup için gebelik oranı % 32 düzeyinde gerçekleşmiştir. Ayrıca venöz basınçta varikozel onarımı ile azalma sağlanan olgularda, sağlanmayanlara göre sperm motilitesinde düzelme daha fazla bulunmuştur.

2.2.5. Renal-Adrenal Reflü

Böbrekte oluşan katekolaminler, kortizol, serotonin, anjiyotensin-1, fosfolipaz A2, prostaglandin E ve F2 α , serbest oksijen radikallerinin testislere olan reflüsü ve buna bağlı bozulan spermatogenez, testiküler disfonksiyonu açıklayan diğer bir teoridir (47). Bu maddelerden prostaglandin ve katekolaminlerin spermatogenezini inhibe ettiği bazı deneysel çalışmalarda gösterilmiş olsa da diğer metabolitler hakkındaki bilgiler çok sınırlıdır (48).

Varikozel cerrahisi sırasında, testiküler geri akımın olduğu venlerden alınan kandaki katekolamin düzeyi, periferik venlerden alınanlara oranla 3 kat daha fazla iken, kontrol grubunda bu oran 1,5 kat fazla bulunmuştur (49). Varikozeli olan infertil hastalarda katekolaminler dışındaki metabolitlerin (kortizol, DHEA gibi) spermatik venlerdeki konsantrasyonu, periferik venlerden farklılık göstermemektedir (50).

2.2.6. Hormonal Disfonksiyon

Varikozeli olan infertil olgularda, Leydig hücre fonksiyonunun bozularak testosteron üretiminde azalmaya yol açabileceği üzerinde durulmuştur. Birçok rat modelinde yapılan çalışmalarda spermatogenezin devamı için en az 20 ng/ml. intratestiküler testosteron konsantrasyonu gerektiği bildirilmiştir (29). Varikozel modelinde serum testosteron konsantrasyonunda etkilenme olmaksızın intratestiküler testosteronda belirgin azalma olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (51). Başka bir modelde ise, sol varikozel oluşturulan ratlarda bilateral intratestiküler

testosteron konsantrasyonunun azaldığı belirlenmiştir (52). Ayrıca, tek taraflı varikoselin, intratestiküler testosteron konsantrasyonunda bilateral ve eşit düzeyde düşmeye yol açtığı belirlenmiş ve testosteron biyosentezinden sorumlu 17,20-dezmozolaz ve 17 α -hidroksilaz enzimlerinin düzeyinde de bariz azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda testosterondaki azalmanın sentezde bozukluktan kaynaklandığı düşünülmektedir (29).

Çayan ve arkadaşlarının, mikrocerrahi varikoselektominin hormonal parametrelere etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, varikosel onarımının Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunu artırdığını gibi, serum serbest testosteron düzeyindeki anlamlı artışa sperm sayısı ve motilitede iyileşmenin de eşlik ettiğini bildirmişlerdir (53). Buna karşın, yapılan birçok çalışmada ise varikoseli olan hastalardaki folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinize hormon (LH), testosteron ve östradiol gibi hormon düzeylerinin normal sınırlarda kaldığı bildirilmiştir (54,55)

Tüm veriler gözden geçirildiğinde, varikoselin hipotalamo-hipofizer gonadal aksı olumsuz yönde etkilediği ve özellikle anormal Leydig hücre işlevi olan olguların varikosel onarımından yarar görmeyeceği söylenebilir (29).

2.2.7. Otoimmünite

Kan-testis bariyerinin bozulmasının antisperm antikor (ASA) üretimini tetikleyerek varikosel patofizyolojisinde rol aldığı düşünülmektedir. Kan-testis bariyerini bozan etyolojiler arasında; testis torsiyonu, duktal obstrüksiyon, epididimit, prostatit ve testis travmasının yanı sıra varikosel de bulunmaktadır (56). Ratlarda oluşturulan bir varikosel modelinde, sham ve opere edilmeyen ratlara göre varikosel oluşturulan ratlarda daha yüksek düzeyde ASA birikimi olduğu gösterilmiştir, ancak varikoselin hangi mekanizmalarla kan-testis bariyerini bozmadan ASA'ları uyardığı bilinmemektedir (57).

2.2.8. Akrozom Reaksiyonu

Varikosel patofizyolojisi üzerinde durulan bir diğer güncel konu da akrozom reaksiyonudur. Varikosel, sperm sayısı ve morfolojisinden daha çok sperm fonksiyonunda defekt oluşturarak zona pellusidaya bağlanma sırasındaki akrozom

reaksiyonunda bozulma oluşunu dūřünen araştırmacılar bulunmaktadır (58,59). Ayrıca, varikoseli olan hastalarda akrozom reaksiyonunu olumsuz etkileyen önemli sperm plazma proteinlerinin ekspresyonundaki moleküler farklılıklar, fertilitte üzerine değişken etkilere neden olabilir (29).

2.2.9. Varikoselin Testis Hacmi Üzerine Etkisi

Makroskobik olarak, varikosel, bulunduğu evreye ve etki süresine bağlı olarak testis büyüklüğünde belirgin azalmaya, hatta atrofiye sebep olmaktadır (60). Varikosel olgularında rölatif aynı taraf testis hacminde küçülme genel olarak kabul gören bir bulgudur (61-65). Erişkinlerde, sol taraf varikoselin, karşı taraf testis üzerine etkileri ile ilgili az sayıda çalışma mevcut olup birbirinden farklı sonuçlar sunulmuştur.

Varikoselde karşı testis hacminde artış olduğunu söyleyen yayınlar olduğu gibi, bazı yayınlarda da hacimde azalma olduğu bildirilmiştir (61-66). Thomas ve Elder grade 2 ve 3 varikoselde testis atrofisinden bahsetmişlerdir (62). Zini ve arkadaşlarının varikoseli klinik olarak derecelendirdikleri çalışmalarında, grade 1 ve 2 varikoselde aynı taraf testiste rölatif atrofi görüleceğini bildirmişlerdir (64). Aynı grup, bir başka çalışmalarında subklinik varikoselde de testiküler atrofi saptamışlardır (65). Akcar ve arkadaşları ise subklinik varikoselin testis hacmi üzerine etkisi olmadığını söylemişlerdir (67). Kass ve arkadaşları grade 1 varikoselin testis hacmi üzerine herhangi bir etkilerinin olmadığını, grade 2 varikoselin sol testis hacim kaybına ve grade 3 varikoselin ise hastalarda bilateral testis hacminde azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir (61). Bunun aksine Ku ve arkadaşları ise yüksek gradeli varikoselde karşı taraf testiste hipertrofi görülebileceğini bildirmişlerdir (66). Her iki çalışmadan farklı olarak, Alukal ve arkadaşları çalışmalarında varikosel ile testis hacmi arasında bir ilişki olmadığını göstermişlerdir (68).

2.2.10. Varikoselin Testis Histolojisi Üzerine Etkisi:

Testiküler dokuda, varikosel için patognomonik histolojik veya mayotik değişiklikler bulunmamaktadır. Bu değişiklikler arasında; Leydig hücre hiperplazisi, tübül başına düşen Sertoli hücresi sayısında azalma, Sertoli hücrelerine ait endoplazmik retikulumda vakuol artışı, maturasyon arresti, germinal epitelyumda

dökülme, seminifer tübül bazal membranında kalınlaşma sayılabilirken bu değişiklikler, varikoseli olmayan düşük spermatogeneze sahip olgular ile benzer özellik göstermektedir (69).

Varikoselli insanlardan alınan testis biyopsi örnekleri çok değişken özellik göstermektedir, öyle ki, Sertoli cell-only, spermatojenik arrest, hipospermatogenez ve normal spermatogenez tabloları izlenebilir (70,71). Sol taraf varikoselli erkeklerde, bilateral testiküler biyopsi yapıldığında, her iki testis de benzer histoloji ve benzer Johnsen skorları göstermişlerdir. Bu da hem sol taraf varikoselinin, bilateral etki gösterebileceğini hem de varikoselin tüm seminiferöz dokuyu etkileyen altta yatan diğer patolojik faktörlerle beraber ortaya çıkabileceğini işaret edebilir (72). Varikoselli olgularda, spermatozoonda, akrozom gelişmemesi, immatürite ve amorf baş anomalisine de sık rastlanır (73). Reaktif oksijen radikalleriyle ilişkili bir morfolojik özellik olarak da, sitoplazmik droplet varlığından ve bunun da sperm DNA hasarı ile korele olduğundan söz edilmiştir (74).

Varikosel düzeyi ile spermatik ven duvar kalınlığı ve damar duvarındaki düz kas miktarı arasında doğrusal bir ilişkiden söz edilmektedir. Varikoselli olguların spermatik venleri üzerinde yapılan bir çalışma, dilate bir lümenle birlikte düz kas lif sayısının ve damar duvarı kalınlığının arttığını ve kas tabakasında normalde varolan sirküler tabakaya ilave olarak longitudinal bir tabakanın daha oluştuğunu göstermiştir (75). Buna ek olarak, sağdaki kontrol grubu, internal spermatik ven ile karşılaştırıldığında varikosel venleri; biyomekanik özellikleri, artmış fibrozis ve çap artışına meyilli olması nedeniyle farklılık göstermektedir (76). Genel olarak ven, venül ve kapillerlerdeki vasküler değişiklikler arasında; intimal fibrozis ve media tabakasında kollajen artışı sayılabilir (77).

Elektron mikroskopi ve immunohistokimya çalışmaları, varikoselde, peritübüler lamina propria sklerozisi, laminin ve kollajen tip IV kaybını ortaya koymuştur (78). Kan-testis bariyerinin ultrastrüktürel çalışmalarında, “Sertoli-Sertoli bağlantı komplekslerinin” normal görüldüğü ve bazal kompartmanının korunduğu gösterilmiş (79). Bu bulgular hayvanlardaki fonksiyonel çalışmalarla da doğrulanmıştır (57).

2.3. Oksidatif Stres

Varikosel etyolojisinde ve buna bağlı oluşan testiküler hasarın gelişiminde serbest oksijen radikallerinin (SOR) rolü birçok çalışmada incelenmiştir.(80) Spermatozoanın ROS üretimi, sinyal ileti mekanizmaları, sperm hiperaktivasyonu ve kapasitasyonu, akrozom reaksiyonunu kolaylaştırma ve sperm-oosit birleşmesi için önemli bir medyatör olarak görev yapan normal fizyolojik bir işlemdir (81,82).

Sağlıklı bireylerde seminal plazma, aşırı ROS üretiminin etkisini nötralize eden doğal çöpçü veya antioksidanlar içerir. Ancak, patolojik koşullarda ROS üretimi antioksidan kapasiteyi aşan artmış oksidatif strese neden olur (81). Patolojik seviyelerde ROS üretimi, defektif sperm fonksiyonuna neden olabilir, sperm morfolojisini bozabilir, sperm motilitesinde azalmaya yol açabilir ve yetersiz sperm-oosit birleşmesine yol açabilir. Ayrıca, sperm DNA hasarına neden olabilir (83).

Ratlarda oluşturulan bir varikosel modelinde antioksidan uygulaması ile testiküler fonksiyonlarda korunma sağlanmış ve oksidan-antioksidan mekanizmanın varikosel etyolojisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (80). Buttke ve arkadaşları, apopitoz saptadıkları varikoselli hastalarda, artan apopitozun kontrolünde oksidatif stresin önemli rolü olduğunu bildirmişlerdir (84)

Varikoseli olan infertil olguların % 80'inde artmış ROS konsantrasyonu saptanmasına karşın, bu durum varikoseli olan fertil hastaların % 77'sinde, varikoseli olmayan fertil bireylerin % 20'sinde bulunmaktadır. Ayrıca, normal bireylerin toplam antioksidan kapasitesinde varikoseli olanlardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (85).

2.3.1. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Sistemleri

Hücreler sürekli oksidatif tehditin altında bulunduğundan bu hasara karşı kendilerini koruyacak mekanizmalar geliştirmişlerdir. Bu mekanizmalar, üç yolla bunu gerçekleştirir:

- 1- Oluşan radikallerin detoksifikasyonu,
- 2- Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi,
- 3- Radikal oluşumunun sınırlandırılması,

Hücrede oluşan radikaller enzimatik olarak detoksifiye olur. Bunlar süperoksit ve hidrojen peroksiti temizleyen spesifik enzimlerdir. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) bu grup enzimlerdendir.

Hücrelerin düşük düzeylerdeki H_2O_2 hasarından korunmasında GPx önemli rol oynarken, H_2O_2 'in oluşumunun arttığı durumlarda katalaz etkinlik kazanır. Katalaz bu görevini peroksizomlarda yaparken, GPx ise sitozol ve mitokondride gerçekleştirir. Ekstraselüler kompartmanda H_2O_2 'i temizleyen enzim sistemleri yoktur. Ekstraselüler H_2O_2 'in dolaşımdaki eritrositler tarafından metabolize edildiği kabul edilmektedir.

Antioksidan savunmanın diğer önemli kesimini lipid peroksidasyon reaksiyonlarını kıran antioksidanlar oluşturur. Bunlar peroksi (ROO) ve alkoksi (RO) radikaller ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyon reaksiyonlarının ilerlemesini önlerler. Bu savunma başlıca E vitamini tarafından sağlanır.

Non-enzimatik etkili olan antioksidanlar ise alfa-tokoferol, karoten, askorbik asit, sistein, seruloplazmin, transferin, albumin ve ekzojen antioksidanlardır (80).

2.3.2. Testiste Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum “oksidatif denge” olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece, organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. “Oksidatif stres” olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (86,87).

Son yıllarda, erkek üreme sistemi rahatsızlıklarında, ROS olarak tanımlanan oksidanların oksidatif stres oluşturması birçok patolojinin altında yatan nedenlerden biri olarak gösterilmektedir ve araştırmaların çoğu bu yöne kaymaktadır. Oksidatif stresin testiküler fonksiyon bozukluklarıyla ilişkili olduğunun ortaya çıkması bu yargıyı güçlendirmiştir.

Organizmadaki bütün dokularda olduğu gibi testiste de fizyolojik olarak süregelen birçok biyokimyasal reaksiyon gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonların sonucunda ortaya çıkan yan ürünler spermatozoaya zararlı olabilir, hatta gelişim döneminde spermatogenik seri hücrelerini de etkileyebilmektedir. Dolayısıyla, oksidatif stresi dengeleyen mekanizmalar bozulabilmektedir. Serbest radikallerin oluşumunu da kapsayan çeşitli up-regülasyon veya down-regülasyon yollarını da yönlendirebilen etkilerin var olduğu düşünülmektedir (88).

Spermatogenez saniyede 1000 adet sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyal oksijen tüketimi olduğunu göstermektedir. Ayrıca; testisteki zayıf vaskülarizasyon, dokuda oksijen durumunun düşük ve bu düşük oksijen miktarı için olan rekabetin oldukça şiddetli olmasına neden olmaktadır. Testiküler mikroçevredeki düşük oksijen miktarına ek olarak, fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle testis oksidatif strese karşı hassas hale gelmektedir. Dolayısıyla, hem spermatogenez hem de Leydig hücresi steroidogenezi oksidatif stresle hasar görmektedir (89). Testis bu tehlikeyi önlemek için; hem enzimatik hem de nonenzimatik öğelerden oluşan antioksidan sistemleri devreye sokmaktadır (90).

Bu antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir. Çünkü peroksidatif hasar; testiküler torsiyon, diyabet ve ksenobiyotik maruziyeti gibi birçok durumda bozuk testiküler fonksiyonun tek önemli sebebiymiş gibi kabul edilmektedir (91).

Testis; steroidogenez ve sperm üretimini desteklemek amacı ile antioksidan açıdan korunmasına rağmen, bazı endojen ve ekzojen faktörler bu savunmayı alt üst edilebilmekte ve oksidan-antioksidan denge bozularak serbest radikaller oluşmakta ve oksidatif stres meydana gelmektedir. Ancak spermatogenezi destekleyen testis içi mekanizmaların zarar görmesiyle bu serbest radikallerin miktarı artmakta ve hücre membran yapısına ağır hasarlar vermektedir. Bu hasarın başında hücre membranı lipid peroksidasyonu gelmektedir. Son orbitallerinde eşlenmemiş elektron bulunan bu serbest radikaller ortamdaki diğer moleküller ile kolayca elektron alışverişinde bulunabilmektedirler. Bu şekilde oluşan reaktif oksijen türleri membran lipid peroksidasyonuna neden olmakta ve membran stabilizasyonunu ortadan

kaldırmaktadır. Hücre membranına hasar vererek, genetik materyali tehlikeye sokan ve DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık hale getiren serbest radikallerin hücrede miktarlarının artmasıyla oksidan-antioksidan dengesi bozulmakta ve oksidatif stres indüklenmektedir (86,90).

2.4. Apoptozis

Normal hücre siklusu büyüme, farklılaşma ve ölüm şeklinde devam eden bir süreçtir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur (92). Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (93).

Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (94). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır.

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (95). Apoptozis ve mitozis dokuda sürekli bir denge halindedir. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir (95,96).

1980 yılında Wyllie ve arkadaşları deneysel apoptozisi, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiştir. Apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (97). Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir (98).

Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP

seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir (99).

2.4.1. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin indüklenmesinde üç prototip sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir.

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması
2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme
3. Endoplazmik Retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

Apoptozisin başlamasında ya da durmasında çok çeşitli iç ve dış uyaranlar etkili olmaktadır. Gelişme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin sinyalleri olmadığında hücreler apoptoza giderler. Ayrıca toksinler, iyonize radyasyon, reaktif oksijen radikalleri, kimyasal ajanlar, yaşlanma veya iskemi sonucu gelişen hasarlar da hücredeki apoptotik süreci aktive eder (100).

2.4.2. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını alır. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise adından da anlaşılacağı üzere tümör baskılayıcı genlerdir (101). Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir. Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (102).

Proapoptotik proteinlere ise Bax, Bad ve Bid örnek olarak gösterilebilir. Proapoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt grublardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn, Bax, Bak),

diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Anti-apoptotik bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: bcl-2, bcl-X1, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanları ise: bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir (103).

2.4.3. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Bazı organların biyolojik gelişimleri esnasında apoptozise rastlamak mümkündür. Örnek olarak, Muller ve Wolf kanallarının involusyonu, kalp gibi bazı iç organların lümenlerinin oluşması gösterilebilir (95). Apoptozis ayrıca her türlü neoplastik oluşumda; hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir (96). Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir (95). Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır (104). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (98). Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar şunlardır:

Fizyolojik Olaylar:

a- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı (fetus implantasyonu, organogenezis ve gelişim sürecinde yaşanan involusyon) (98).

b- Erişkinde hormona bağımlı involusyon (menstruel siklusta endometriyum hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu) (98).

c- Sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi amacı ile hücre azaltılması (barsak kripta epitelleri) (96,98).

d- İmmun hücrelerin seçimi (hem B hem de T hücrelerinin sitokin depleksiyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması)(105).

Patolojik Olaylar:

- a- Tümörlerde hücre ölümü (hem büyüme hem de regresyon aşamasında) (105).
- b- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofi (kastrasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybı) (95,104).
- c- Parankimden zengin dokularda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi (pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi) (106).
- d- Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmün hastalıklar) (105).
- e- Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, antikanser ilaçları, hipertermi, hipoksi, travma) (106).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apoptozis yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının kanser, otoimmün bozukluklar, viral infeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu hastalıklar: (93)

Apoptozisin İnhibisyonu İle İlişkili Hastalıklar

- 1- Kanser: Foliküler lenfoma P53 mutasyonları ile oluşan karsinomlar, Hormon bağımlı tümörler, Akciğer kanseri, Prostat kanseri, Over kanseri
- 2- Otoimmün bozukluklar: Sistemik lupus eritematozus, İmmün ilişkili glomerulonefritler, Otoimmün diabet, Greft rejeksiyonu
- 3- Viral infeksiyonlar: Herpes virüs, Poliovirus, Adenovirus

Apoptozisin Aktivasyonu İle İlişkili Hastalıklar

- 1- AIDS
- 2- Nörodejeneratif hastalıklar: Alzheimer hastalığı Parkinson hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz, Retinitis pigmentosa, Serebellar dejenerasyon
- 3- Miyelodisplastik sendromlar: Aplastik anemi
- 4- İskemik hasarlar: Myokard infarktüsü, İnme, Reperfüzyon hasarı
- 5- Toksik nedenli karaciğer hasarı

2.4.4. Reaktif Oksijen Radikalleri ve Apoptoz

Apoptoz, reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir. Moleküler seviyede, ROS, DNA'yı direk etkiler ve apoptozu indüklemenin en etkili yöntemlerinden biri olduğu bilinen intrasellüler kalsiyum seviyelerini değiştirir (107). Hidrojen peroksitin apoptozu tetiklemede intrasellüler mekanizması tartışma konusudur. Bu molekülün kendisi reaktif olmayan bir yapıya sahiptir; peroksidatif hücresel toksik etkisinden, metal ile katalizlenen Fenton veya Harber-Weiss reaksiyonu sonucu üretilen oldukça reaktif hidroksil radikalının sorumlu olduğu düşünülmektedir (108). Bununla birlikte, Kasahara ve arkadaşlarının çalışmasında ise, hidroksil radikalının etkisizleştirilmesi için dimetil sülfoksit veya bir demir şelatörü kullanılmış ancak etkin bir koruma gözlenmemiştir (109). Bu da apoptotik yolun peroksidatif hasarla bir bağlantısının olmadığını gösterir.

2.4.5. Apoptozis ve Testis

Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar. Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (110). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptozis gerçekleştiği bildirilmiştir (111). Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin % 75'i apoptozise maruz kalır (112). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (97,100). Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir (113,114,). Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (114). Hipofizektomize immatür ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde masif apoptozis ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da hCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir (113). Ayrıca, gonadotropin ya da testosteron eksikliği dışında maturasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda

da apoptozis görülebilir (115). Obstrüktif azospermide farklı sonuçlar bildirilse de, apoptozis ve seminal parametreler incelendiğinde sperm konsantrasyonu ve motilite bozukluğu olan infertil tüm olgularda artmış DNA fragmantasyonu saptanmıştır (116)

İnsan çalışmalarında da hipospermatogenez ve spermatid düzeyindeki maturasyon arresti olan erkeklerde artmış apoptotik germ hücreleri gösterilebilmekte ancak sertoli cell only (SCO) olan hastalarda bu durum gözlenmemektedir (117). Ayrıca, normal hücrelerde bulunmayan endotelyal nitrik oksit sentazın (eNOS), apoptotik germ hücrelerinde varlığı bildirilmektedir (118). Bu gözlem, varikozeldeki germ hücre apoptozisinde nitrik oksit (NO) ve eNOS'ın rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan sensitivitesi de germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür (119).

2.4.6. Varikozelde Apoptozis

Varikozele bağlı infertilite oluşumunda pek çok faktör tanımlansa da, infertiliteye neden olan bu en önemli patolojide doku hasarı ve bozulmuş spermatogenezini ortaya çıkaracak net bir açıklama getirilememiştir. Varikozel nedeni ile incelenen hastaların testislerinde oluşan hasarda apoptozisin rolünü inceleyen bir çalışmada, testis histopatolojik incelemesinde olguların üçte birinde testiküler dokuda programlı hücre ölümünde anlamlı oranda artış saptanmıştır (120). Aynı şekilde diğer bir çalışmada ise, deneysel olarak varikozel oluşturulan erişkin tip ratlarda testis kan akımındaki artışa paralel olarak testiküler apoptoziste artma bildirilmiştir (8). Öte yandan, varikozele bağlı infertilite gelişen hastalarda testiküler dokuda apoptoziste azalmanın bildirildiği literatürdeki tek çalışma Fujisawa ve arkadaşlarına aittir (121). Ancak, araştırmacılar bu azalmayı açıklayacak mekanizma tanımlayamamışlardır.

Varikozeldeki ısı artışı ile apoptozis arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Lue ve arkadaşlarının çalışmasında varikozelin neden olduğu ısı artışının, hücreye ve evreye özgül olarak apoptozise neden olduğu ileri sürülmektedir

(122). Seminifer tübül epitelinin ısı artışına ve soğutma gibi faktörlere olan duyarlılığı sonucu da germ hücrelerinde apoptoziste değişiklik gözlenebilir (119). Kriptorşidizm modelinde de benzer durumun gözlenmesi, ısı etkili medyatörleri gündeme getirmiştir. Bunlardan en bilineni “heat shock protein”ler (HSP70-2) olup, sperm hücreleri üzerinde dağılım göstermekte ve ısı ile upregule olmaktadır (123). Ancak, varikozel patofizyolojisinde “heat shock protein”lerin rolü henüz bilinmemektedir.

Apoptozisle ilgili son durum ise toksik ajanlardır. Toksik bir madde olan metoksi etanol, etilen glikol eter ve bunların yan ürünü 2-metoksiasetik asit gibi toksik maddelerin hayvan deneylerinde apoptozise yol açarak spermatosit ölümüne neden olduğu bilinmektedir (124). Ayrıca varikozelde toksik adrenal metabolitlerin internal spermatik vene reflüsü söz konusudur. Buna ek olarak, varikozeli olan erkeklerde oligospermi, sigara içenlerde içmeyenlere göre 10 kat daha fazla görülmektedir (125). Spermatogenezle ilgili bir diğer toksik ajan olarak kadmiyum suçlanmaktadır. Ratlara kadmiyum klorid uygulanması DNA’da “merdiven paterni” şeklinde karakteristik apoptozise neden olmaktadır. Varikozeli olan erkeklerin testis biyopsilerinde de, seminifer tübül başına apoptotik hücre oranıyla kadmiyum birikimi arasında korelasyon gösterilmiştir (126). Bu hastalara varikozektomi uygulandığında seminal parametrelerde iyileşme ve gebelik oranlarının daha düşük çıkması, varikozel patofizyolojisi için kadmiyum toksisitesini gündeme getirebilir.

Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimülanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (119).

2.5. Matriks Metalloproteinazlar (MMPs) ve Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörleri (TIMP)

Ekstraselüler yapı iskeletini oluşturmasının yanı sıra büyüme faktörleri gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin bir rezervuarı olarak da rol oynayan ekstraselüler matriks (ECM), gelişme, doku oluşumu ve tamiri sırasında gereksinim duyulan hücresel çevreyi yaratmada önemli olan makromoleküllerden oluşur (127). Bu yapı hücrelerin özel fonksiyonları gerçekleştirmesi için kendilerini yönlendirecek hücre içi sinyalleme yolları ile direkt ya da indirekt olarak etkileşmesini sağlar (128).

Matriks ile hücreler arasında meydana gelen bu etkileşimler organizmanın normal gelişimi ve fonksiyonu için kritik rol oynar. ECM sentez, parçalanma ve yeniden yapılanma süreçlerindeki hücre regülasyonu, dönüşümü gibi etkilerini metalloproteinazlar (MMPs) aracılığı ile ortaya koyar (127).

MMPs ekstrasellüler matriksi parçalayan, nötral pH da aktif olan, multigenik bir endopeptidaz ailesidir. Tümü proenzim olarak fibroblastlar, osteoblastlar, kondrositler, endotel hücreleri, makrofajlar, nötrofiller gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerinden salgılanırlar. MMPs yara iyileşmesi, kemiğin yeniden yapılanması, uterus ve meme dokusu fizyolojik fonksiyonları, ovulasyon, embriyogenezis, embriyo implantasyonu, laktasyon gibi fizyolojik süreçlerde yer aldığı gibi aynı zamanda artrit, tümör hücrelerinin invazyonu ve metastaz gibi patolojik süreçlerde de rol oynarlar. Kanserde ECM tümör dokusunun büyümesi ve tümör hücrelerinin yayılımını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapar. Malign tümörler bu bariyeri aşmak için metalloproteinazları kullanırlar (129).

MMP'ler, kemotaktik moleküller, adezyon molekülleri, proteinaz inhibitörleri, hücre-yüzey reseptörleri, kan pıhtılaşma faktörleri, olgunlaşmamış büyüme faktörleri ve büyüme faktörlerine bağlı proteinler gibi çok çeşitli proteinler üzerine etkilidir (130).

Matriks metalloproteinaz ailesi aşağıdaki özelliklere sahiptir (129).

1. Ekstrasellüler matriksin en az bir komponentini parçalayan proteinazlardır.
2. Zn iyonu içerirler ve bu nedenle şelatlayıcı ajanlarla inhibe olabilirler.
3. Latent formda salgılanırlar ve proteolitik aktivitelerini göstermeleri için aktive olmaları gereklidir. İnvitro olarak organomerküriyel bileşenlerle aktive olabilirler.
4. Metalloproteinazlara spesifik doku inhibitörleri ile (Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs) inhibe olurlar.
5. Moleküler klonlama yöntemleri ile çeşitli grup üyelerinin aminoasit benzerlikleri olduğu gösterilmiştir.

2.5.1. MMP'lerin Yapısı

Klonlanmış MMPsların primer yapısı incelendiğinde bu proteinlerin birkaç farklı bölge içerdiği görülür (şekil-1).

Predomain: İlk bölge predomain olarak tanımlanan, molekülü sekresyon için hedefleyen, ancak daha sonra uzaklaştırılan ve latent enzimde bulunmayan sinyal peptid dizisidir. 80-90 aminoasit içeren aminoterminal propeptiddir.

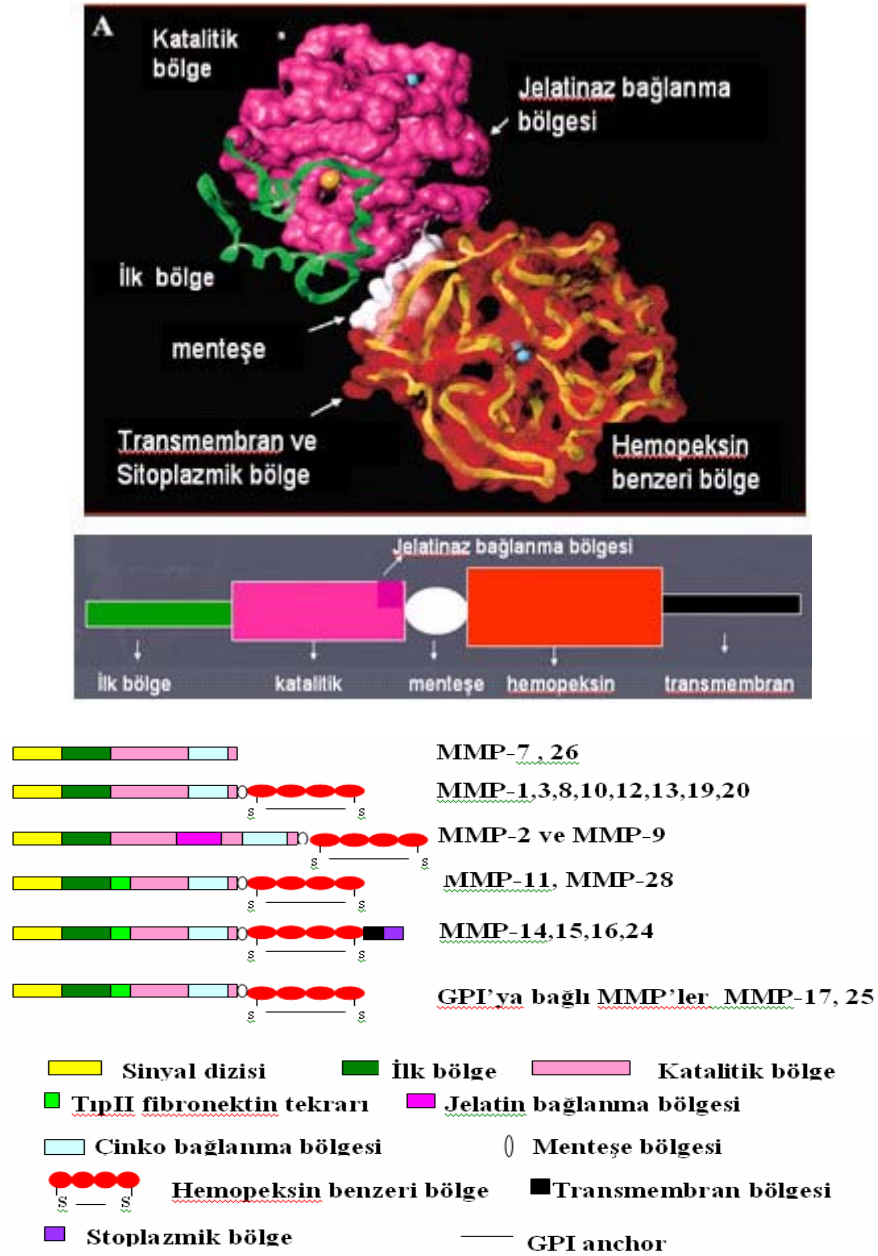
2. **Prodomain:** Enzim aktive olduğunda çıkarılır ve yüksek derecede korunmuş PRCGVDPV dizisi içerir. Prodomain yapısında bulunan sistein rezidülerinin enzimin latent formunun korunmasında rol oynadığına inanılır. Prodomainin çıkarılması, inaktif proenzimin aktif forma dönüşmesini sağlar.

3. **Katalitik bölge:** Katalitik bölge, histidin rezidüleri içeren, bakteriyel metalloproteinazlardan termolizine analog olan ve fonksiyonel stabilitenin korunması için gerekli olan çinko iyonunu içeren bölgedir.

4. **Prolinden zengin bölge:** Katalitik bölge ve son bölge arasında yer alır.

5. **Hemopeksin benzeri bölge:** Son kısımda hem bağlayan moleküllere dizin benzerliği nedeniyle, hemopeksin olarak adlandırılan bölge yer alır. Bu bölge N ve C terminal kısımları bağlayan disülfid bağı içerir ve katalitik bölgeye 5-10 aminoasitlik prolinden zengin bir bölge ile bağlanır. Matrilysin (MMP7) dışında tüm metalloproteinazlarda bulunur. Bu bölgenin fonksiyonu bilinmemekle birlikte substrat spesifitesini sağlama ya da plazminojen aktivatör ürokinaz sistemine analog olma özelliği ile hücre yüzey reseptör alanını tanıma fonksiyonu gösterdiği ileri sürülmektedir. Substrata bağlanma ve TIMPs ile etkileşime girmedi fonksiyonel rolü vardır (129).

Bu genel yapının dışında; Gelatinase A ve B; katalitik bölgelerinde fibronektinin kollajen bağlayan bölgesi ile ilişkili olan ve diğer matriks metalloproteinaz enzimlerinde bulunmayan, sisteinden zengin jelatin bağlayan bir ekstra domain içerirler (131).



Şekil 1. MMP'lerin moleküler (131) ve şematik şekli

2.5.2. Metalloproteinazların Sınıflandırılması

Matriks metalloproteinazlar hakkında ilk bilgi Jerome Gross ve Charles Lapiere tarafından 1962 yılında yayınlanmıştır. MMP'lerin molekül ağırlıkları 19 - 92 kDa arasında değişmektedir (132). Günümüzde MMP ailesinin 25 üyesi saptanmıştır. Substrat özgüllüğü, dizilim benzerliği ve "domain" organizasyonuna göre MMP'ler altı gruba ayrılabilir (127):

a) Kollajenazlar

- b) Tip IV kollajenaz (Jelatinaz= MMP-2 ve MMP-9)
- c) Stromelizinler
- d) Matrilizinler
- e) Membran tipi MMP'ler
- f) Diğer MMP'ler

Kollajenazlar

MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 (Xenopus) bu gruptadır. Bu enzimlerin esas özelliği interstisyel kollajen I, II ve III'ü N-terminal ucuna 3/4 uzaklıktaki özgül bir bölgeden koparabilmesidir. Kollajenazlar aynı zamanda diğer bazı ESM ve ESM dışı molekülleri de parçalayabilirler (127).

Jelatinazlar

Jelatinazlar, diğer MMP'lerden farklı olarak katalizör bölge ile aktif bölgesi arasında jelatin bağlayıcı bölge içeren enzim grubudur. Jelatinazlar, Tip IV, V, VII, X, XI ve XIV kollajen, jelatin, elastin, proteoglikan kor proteinleri, myelin temel proteini, fibronektin, fibrillin-1, TNF- α , Interlökin-1 α öncüllerini yıkma özelliğine sahiptirler. Bu grupta tip A ve tip B olmak üzere iki alt grup mevcuttur (127).

Jelatinaz A (MMP 2)

MMP-2 (jelatinaz A), 72 kDa olup keratinositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, kondrositler, osteoblastlar, monositler gibi pek çok değişik hücre ve transforme olmuş değişik hücreler tarafından üretilir. MMP-2 aynı zamanda tip 1 kollajeni; MMP-9 ise asidik ortamda tip 1 kollajenin N-terminalini yıkarak ECM'nin "remodeling" olayında önemli rol üstlenir (133).

MMP-2 geni, 16. kromozomun q13-q21 bölgesi üzerine yerleşmiştir. Aktif şekli, Tip IV, V, VII, X kollajeni, jelatini, elastini, fibronektini ve laminini parçalar (129).

Jelatinaz B (MMP 9)

MMP-9 (Jelatinaz B), ilk olarak 1974 yılında Sapota ve Dancemicz tarafından ilk olarak insan nötrofillerinden izole edilen nötral bir proteaz olarak tanımlanmıştır. (Şekil 1). Jelatinaz B ve Tip IV kollajenaz olarak da bilinir, tip VI

kollajen, proteoglikan ve laminleri parçalar. MMP-9, tümör hücresi, nötrofil, eozinofil, monosit, lenfosit ve alveolar makrofaj gibi inflamatuvar hücreler tarafından üretilir. Sıklıkla TIMP-1 ile kompleks halde salgılanır. MMP-9 normal hücrelere göre melanoma, akciğer tümörü, meme adenokarsinoması, hepatoselüler karsinoma ve gliomalarda daha fazla salgılanır (129).

MMP-9, MMP ailesinin en büyük üyesidir. MMP-9 geni, kromozom 20q11.1-13.1'e yerleşmiştir (134). Jelatin, tip I, III, IV ve V kollajen, elastin ve fibronektinlere etki eder (129).

Elde edilen bulgular; MMP ekspresyonunu ve aktivasyonunu düzenleyen olayların oksidatif stres, inflamasyon, yaralanma, hemodinamik ve vasküler remodeling mekanizmalarına katıldığı bilinmektedir (135). Örneğin NO ve süperoksitten doğal olarak oluşan peroksinitritin latent MMP'leri aktive ettiği ve TIMP-1'in yıkımına neden olduğu bildirilmiştir. Pro-MMP-9'un aktivasyonu; aktif bölgesinin NO'ya maruz kalmasıyla veya proteolitik aktivasyonla meydana gelir (136).

VSMC'den esas olarak MMP-2 eksprese edilir. NADPH oksidaz bağımlı ROS üretimi MMP upregülasyonunu şiddetlendirir. MMP-2'nin upregülasyonu başta MMP-9 olmak üzere birçok MMP'nin düzeylerini dramatik olarak artırır. IL-1, IL-4 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler VSMC'den düzenli bir şekilde başta MMP-1, -3, ve 9 olmak üzere MMP'lerin bir çoğunun üretimini uyarırlar. VSMC'in üzerine MMP'lerin etkisi; temel membranın migrasyonuna ve proliferasyonuna neden olur (137).

Endotelial hücrelerde de esas olarak MMP-2 eksprese edilir ve ROS tarafından upregülasyonu artırılır. VSMC'le benzer olarak endotelial hücreler TNF- α ve IL-1 α 'a cevap olarak MMP-1, 3, 8 ve 9 upregülasyonu görülür (137).

Stromelizinler

Stromelizin 1 (MMP-3) ve stromelizin 2 (MMP-10) benzer substrat özgülüğüne sahiptir. Ancak MMP-3'ün genelde MMP-10'dan daha yüksek proteolitik etkinliği vardır. MMP-3, ESM komponentlerini sindirmesinin yanı sıra birçok proMMP'leri aktive eder ve kısmen işlenmiş proMMP-1'in tam olarak aktif MMP-1'e dönüştürülmesindeki rolü önemlidir (130).

Matrilizinler

Matrilizinler bir “hemopeksin domaini”nin olmaması ile karakterizedir. “Endometaz” olarak da adlandırılan matrilizin 1 (MMP-7) ve matrilizin 2 (MMP-26) bu gruptadır. Birçok ESM komponentlerini parçalarlar. ESM komponentlerinin yanı sıra MMP-7 pro- α -defensin, Fas-ligand, proTNF- α (pro-tumor necrosing factor- α ; protümör nekroze edici faktör- α) ve E-kaderin gibi hücre yüzey moleküllerini de etkiler (127).

Membran Tipi Matriks Metalloproteinazlar

Altı adet membran tipi MMP (MT-MMP) vardır: dördü (MMP-14, MMP-15, MMP-16 ve MMP-24) tip I transmembran proteinlerdir, ikisi (MMP-17 ve MMP-25) ise glikozilfosfatidilinozitol’e tutunan proteinlerdir. MT4-MMP dışındakilerin tümü proMMP-2’yi aktive etme yeteneğine sahiptir. Bu enzimler aynı zamanda birçok ESM moleküllerini sindirebilirler ve MT1-MMP tip I, II ve III kollajenler üzerine kollajenolitik aktiviteye sahiptir. MT1-MMP anjiyogeneziste de önemli rol oynar (138).

Diğer matriks metalloproteinazlar

Yedi MMP yukarıda sözü edilen gruplar içerisinde sınıflandırılmamıştır. Metalloelastaz (MMP-12) esas olarak makrofajlarda bulunur ve makrofaj migrasyonu için önemlidir. Elastinin yanı sıra diğer birçok proteinleri de parçalar (139). MMP-19 cDNA klonlama ile karaciğerden ve T-hücre kökenli bir otoantijen (RASI) olarak romatoid artritli hastalardan (129,137) elde edilmiştir. Amelogenin’i sindiren enamelizin (MMP-20) primer olarak yeni oluşmuş diş minesinde bulunur. Mine oluşumundaki defekte bağlı gelişen genetik bir bozukluk olan amelogenin imperfekta, MMP-20’nin ayrılma noktasındaki mutasyonlara bağlıdır (140). MMP-22 ilk olarak civciv fibroblastlarından klonlanmıştır ve insan homologu EST dizilimlerine göre tayin edilmiştir. Bu enzimin fonksiyonu bilinmemektedir (127,135). “Cysteine array MMP” diye de adlandırılan MMP-23 esas olarak reproduktif dokularda (üretimle ilgili dokularda) bulunur. MMP ailesine en son eklenen, esas olarak keratinositlerde bulunan epilizin ya da MMP-28’dir. Sağlam ve hasarlı derideki bulunuş paterni MMP-28’in doku hemostazında ve yara tamirinde fonksiyonu olabileceğini düşündürmektedir (140).

2.5.3. MMP Ekspresyonunun Regülasyonu

MMP'lerin çoğunun ekspresyonu normal yetişkin dokularında düşük düzeyde bulunur. Bazı fizyolojik ve patolojik remodeling süreçlerinde ekspresyonları upregüle olur. MMP fonksiyonları, hem gen aktivasyonu hem de protein aktivasyonu aşamalarında düzenlenir. MMP'lerin transkripsiyonel regülasyonu, proksimal promoter bölgelerinde yer alan AP-1 düzenleyici eleman ile sağlanır. MMP gen transkripsiyonu ekstrasellüler yerleşimli pek çok madde ile uyarılabilir: mesela sitokinler (Interlökin 1-4), büyüme faktörleri (EGF, TGF- α , TGF- β 1, TNF- α , basic fibroblast growth faktör.), hücre-hücre etkileşimleri ve hücre-matriks etkileşimleri gibi. Bu aktivatörlerin reseptöre bağlanması ile en az 3 değişik sınıf mitojen aktive edilmiş kinazlar (MAP) tarafından sağlanan intrasellüler olaylar zinciri ile hücrenel AP-1 transkripsiyon faktörü aktif hale geçirilir ve AP-1 cis elementine bağlanarak MMP geninin transkripsiyonunu sağlar (141,142).

MMP gen ekspresyonu onkojenik hücrenel transformasyon, fiziksel stres, kimyasal ajanlar (forbol esterleri ve ilaçlar), sitokinler, büyüme faktörlerini kapsayan efektörler, tümör promotörleri, onkojen ürünleri ile upregüle edilir ve süpresyon faktörleri ile (TGF-beta, retinoik asit, glukokortikoidler) ile down regüle edilir (143).

2.5.4. Matriks Metalloproteinaz-Aracılıklı Ayrışma ile Oluşturulan Biyolojik Aktiviteler

MMP'lerin önemli bir fonksiyonu doku rezorpsiyonunda ESM'nin uzaklaştırılmasıdır. ESM ise basit bir ekstrasellüler yapı iskelesi değildir; aynı zamanda büyüme faktörleri gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin bir rezervuarı olarak rol oynar. Bazı ESM komponentlerinin proteolizis üzerinde gizli biyolojik fonksiyonları bulunabilir. Bu nedenle ESM komponentlerinin MMP'ler tarafından parçalanması hücrenel çevreyi ve fenotipleri değiştirebilir (127,135). Örneğin; tip I kollajenin kollajenaz tarafından parçalanması osteoklast aktivasyonu, reepitelizasyon sırasında keratinosit migrasyonu ve doğum başlamadan önce amnion epitel hücrelerinin apoptozisi ile birliktedir (144). Görüldüğü gibi, MMP'lerin fonksiyonları basit bir yıkım değil, son derece kompleks ve incedir. MMP'lerin substratı olan ve biyolojik aktiviteler sergileyen ESM dışı proteinlerin de sayılarının

giderek arttığı göz önüne alındığında MMP'lerin sağlık ve hastalık durumlarındaki rollerinin karmaşıklığı daha iyi anlaşılacaktır.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda MMP'lerin ESM komponentleri yanında ESM dışı molekülleri de substrat olarak kullandığına ve biyolojik aktivitelerini düzenlediğine ilişkin kanıtlar elde edilmiştir. Bunlar arasında IGF-BP ("insulin like growth factor-binding protein"; insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein), proTGF- β ("pro-transforming growth factor- β "; pro-transforme edici büyüme faktörü- β), gibi büyüme faktörü öncüleri ve bağlayıcı proteinler; proTNF- α ("pro-tumor necrosing factor- α "; pro-tümör nekroze edici faktör- α), proIL-1 β (pro-interlökin-1 β) ve IL-2 (interlökin-2) gibi sitokinler, E-kaderin, β 4-integrin, sindekan-1, ICAM-1 (interselüler adezyon molekülü-1), α v integrin gibi adezyon reseptörleri vardır. Bu yeni tanımlanan özellikler, MMP'lerin daha önce anlaşıldığından çok daha fazla fizyolojik ve patolojik olayla ilişkili olduğunu öngörmektedir (145).

2.5.6. Endojen Matriks Metalloproteinaz İnhibitörleri

MMP'lerin proteolitik aktiviteleri hem non-spesifik (α -2 makroglobulin, α -1 antiproteaz gibi) hem de spesifik inhibitörler doku metalloproteinaz inhibitörleri ile engellenebilir (133). TIMP'lar, 6 disülfid bağı oluşturan 12 sistin rezidüsü içerir ve MMP'lerin çinko içeren katalitik bölgelerine bağlanırlar. MMP'lerin TIMP'lar tarafından inhibisyonu, 1:1 sitokiyometride ve nonkovalent şekilde gerçekleştirilir. Şu ana kadar tanımlanan 4 farklı grup TIMP mevcuttur (141). Dolaşımdaki genel proteaz inhibitörlerinden biri α -2 makroglobulindir. Bu yapı; enzimlere kovalent olarak bağlanarak onların yapısını değiştirir, kollajenin ve diğer matriks makromoleküllerinin parçalanmasına engel olur (144).

TIMP-1; 28,5 kDa ağırlıkta ve ilk olarak tavşan kemiğinden elde edilen bir glikoproteindir. Sonradan insan vücut sıvıları ve dokularında da olduğu anlaşılmıştır. Bütün aktive kollajenazları inhibe edebilir. TIMP-1: Mt-1-MMP ve MMP-2 dışındakileri inhibe eder. Fibroblast büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, forbol esterleri ve interlökin-1 gibi birçok uyaran TIMP-1'in fibroblastlardaki ekspresyonunu artırır (146). TIMP-1, 92 kDa'luk jelatinaz sınıfından olan pro-MMP-9'a bağlanır. Bu ikili proMMP-9/TIMP-1 kompleksi bütün

aktif MMP'leri inhibe eder ve daha aktif stabil form olan üçlü proMMP-9/TIMP-1/MMP kompleksi oluşur (144).

TIMP-2, ilk kez melanom hücrelerinden izole edilen 21 kDa ağırlıkta non-glikolize bir proteindir. TIMP-2, MMP-9 dışındakileri inhibe eder. MMP-2'yi inhibe eder ve fibroblast gibi bazı hücrelerde pro-MMP-2 ile birlikte sekrete edilir. Ancak alveolar makrofajlarda olduğu gibi tek başına da sekrete edilebilirler (146).

TIMP-3; MMP-1, 2, 3, 9 ve 13'ü inhibe eder (147).

TIMP-4: MMP-2, 7 ve 9'u inhibe eder. Son zamanlarda insan kalbinde saptanan TIMP ailesinin son üyesi TIMP-4'ün de tümör invazyon ve metastazını inhibe ettiği gösterilmiştir (146,147).

2.5.7. Metalloproteinazların Doku İnhibitörlerinin Biyolojik Fonksiyonları

Metalloproteinaz inhibe edici aktivitelerinin yanında TIMP'ler diğer biyolojik fonksiyonlara da sahiptirler. TIMP-1 ve TIMP-2'nin eritroid güçlendirici ve hücre büyümesini artırıcı aktiviteleri vardır (148,149). TIMP-1'in fibroblastların nukleusunda bulunduğu, meme karsinomu hücrelerinin yüzeyine bağlandığı ve nukleusuna göç ettiği gösterilmiştir (150). TIMP-1, TIMP-2 ve TIMP-3'ün aşırı salınımı tümör büyümesini inhibe eder (151). TIMP-2, bazal fibroblast büyüme faktörünün sebep olduğu endotelial hücre gelişimini inhibe eder. Bu aktiviteler de MMP inhibisyonundan ayrıdır ve mekanizmaları büyük oranda açıklanmamıştır (127).

TIMP-3 muhtemelen TNF- α hücre reseptörü 1, Fas ve TNF- α ilişkili apoptozisin stabilizasyonu ile proapoptotik aktiviteye sahiptir. Diğer yandan TIMP-1 ve TIMP-2 ise antiapoptotik aktiviteye sahiptir (152).

MMP'lerin özgül inhibitörlerinin yapılarının gelecekte açıklanması önemlidir. Bu inhibitörler yalnızca MMP'lerin biyolojik rollerine ışık tutmak için değil, aynı zamanda dengesiz ESM parçalanması ile ilgili hastalıklar için tedavi girişimlerinin geliştirilmesi için de yararlıdır (127).

2.6. Varikoselde Tanı

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

Varikoselin tespitinde fizik muayenenin yanısıra renkli doppler ultrasonografi, radyonüklid anjiyografi, skrotal termografi, venografi kullanılabilir (5). Varikosel tanısında en değerli yöntem venografidir. Ancak, invaziv bir tetkik olduğu için rutin olarak kullanılmamakla beraber tedavinin antegrad embolizasyon ile yapıldığı merkezlerde ek olarak spermatik venografi ile de tanı konabilir (13). Varikosel tanısında fizik muayenenin en geçerli yöntem olduğu ve tanı için ek olarak görüntüleme yöntemi gerekmediği ortak bir görüş halini almıştır (5). Skrotal kesenin küçük olması, testislerin skrotumun yukarısında yerleşmiş olması, krameterik hiperrefleksi, uygunsuz ortam ve uyumsuz hasta gibi fizik muayenenin güçleştiği durumlarda renkli doppler ultrasonografi kullanılabilir.

Fizik muayene, oda ısısında ve hasta ayakta iken spermatik kord iki parmak arasında palpe edilerek yapılır. Dilatasyon palpe edilemediyse hastaya valsalva manevrası yaptırılır (derin nefes aldırılır veya ıkınması istenir) ve venlerde dilatasyon olup olmadığına bakılır. Klinik varikosel, muayene bulgularına göre derecelendirilmektedir. Bu derecelendirme 1970 yılında Dubin ve Amelar tarafından yapılmış ve halen yaygın olarak kullanılmaktadır (153):

Derece (grade) I: Varikosel, sadece Valsalva manevrası ile palpe edilebilmektedir.

Derece (grade) II: Varikosel, dinlenme anında ve normal solunumda palpe edilebilmektedir.

Derece (grade) III: Varikosel, dinlenme anında ve normal solunumda gözle görülebilmektedir.

Varikosel muayenesi yapılan her hastada testis volümleri kaydedilmelidir. Bu işlem bir orkidometre aracılığıyla yapılabileceği gibi uzunluk, genişlik, kalınlık

ölçülerek elips formülü (uzunluk x genişlik x kalınlık x 0,52 = volüm) ile de hesaplanabilir (154).

Fizik muayenede tespit edilmemiş, ancak radyolojik yöntemlerle tanı konulmuş varikosele subklinik varikosel denir. Subklinik varikoselin tedavi edilmesinin sperm parametreleri ve gebelik oranlarına etkisi kesin olarak ispatlanmış değildir. Bu sebeple, bugünkü veriler subklinik varikoselin tedavi edilmesine gerek olmadığı yönündedir (5).

2.7. Varikoselde Tedavi

Varikoselin tedavisindeki amaç, testisin fonksiyonunu ve seminal parametreleri iyileştirmek, testis fonksiyonlarında (spermatogenez ve steroidogenez) azalmayı engellemek ve böylelikle gebelik oranını arttırmaktır. Çiftler çocuk sahibi olmak istiyor ve erkek partnerde de varikosel mevcutsa, varikosel tedavisi için şu kriterlerin bulunması gerekir (155);

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

Adölesan varikoselin tedavi endikasyonu kesin ve rölatif olmak üzere ikiye ayrılır.

Kesin endikasyon etkilenen testiste 2 ml. veya % 10'dan fazla volüm kaybı olmasıdır.

Rölatif endikasyonları ise:

- 1- Testis kıvamında yumuşama,
- 2-Sperm parametrelerinde bozulma
- 3-Bilateral palpabl varikosel varlığı
- 4-Semptomatik ileri derecede varikosel varlığı

5-GnRH stimülasyonuna aşırı FSH-LH yanıtı olması (155)

Semptomatik varikozelde semen değerleri de normal sınırlardaysa, cerrahiden önce konservatif tedavi seçenekleri denenmelidir. Bu amaçla analjezik, antiinflatuar, skrotal elevasyon gibi tedaviler verilmeli, bu tedavilere cevap vermeyen olgularda cerrahi tedavi düşünülmelidir. Ayrıca ağrı nedeninin varikozele bağlı olduğu kesinleştirilmelidir. Skrotal ve inguinal ağrı yapabilecek diğer sebepler ekarte edilmelidir. Ancak bu şekilde tedaviden başarı elde edilebilir (156).

Varikozel tedavisinde perkütan embolizasyon, laparoskopik ve açık cerrahi (yüksek inguinal, inguinal, subinguinal ve skrotal) yaklaşımları mevcuttur (5). Varikozel tedavisinde amaç, testiküler arteri, lenf damarlarını, vas deferens ve damarlarını koruyarak tüm internal ve eksternal spermatic ven dallarını bağlamaktır. Ameliyat sonrası testiküler venöz drenaj, vas deferensin venlerinden olur.

İdeale en yakın cerrahi yöntemler düşük ligasyon yöntemleri olan inguinal ve subinguinal mikrocerrahi varikozelektomi, diğer yöntemlere nispeten daha başarılı sonuçlar vermektedir. Her iki yöntemde de eksternal spermatic ven bağlanabilmektedir. Subinguinal varikozelektomi daha distalde olduğu için daha fazla ven bağlanabilirken testiküler arteri yaralama riski daha fazladır. Ancak inguinal varikozelektomi daha az ven ligasyonu ve daha az arter yaralanması riski ile ön plana çıkmaktadır. Mikrocerrahi yaklaşım, postoperatif hidrosel oluşumu ve testiküler atrofi veya azospermi gibi komplikasyonlarda da azalmaya neden olmaktadır. Bunun sebebi lenfatiklerin ve arterin daha kolay belirlenmesi ve korunmasıdır (156).

Varikozel tedavisinde en ideal yöntem; varikozel nüksü, arter yaralanması, postoperatif hidrosel oluşumu gibi komplikasyonları en az olan ve postoperatif sperm parametrelerinde iyileşme ile gebelik oranlarında en fazla artış sağlayan yöntemdir.

2.8. Varikozelin Medikal Tedavisi

Varikozelde “medikal tedavi” ile ilgili olarak literatürde az sayıda deneysel çalışma mevcuttur. Sofitikis ve arkadaşları cerrahi ve medikal tedaviyi kontrollü olarak değerlendirdikleri sıçan deneysel varikozel modelinde HCG, kallikrein, indometasin ve hidralazin medikal tedavi gruplarını oluşturmuşlardır. Çalışma

sonucunda cerrahi tedavi tüm medikal tedavi gruplarına göre üstün bulunmuştur. Ayrıca sperm sayısı, motilitesi, testis volümü ve fertilité oranları açısından buna en yakın sonuçların HCG+kallikrein tedavisi alan grupta olduğunu bildirmişler ve cerrahi sonrası beklenen yanıtın oluşmadığı hastalarda bu şekilde planlanacak eşzamanlı Sertoli ve Leydig hücrelerinin uyarılmasının fertilité üzerine olumlu etkileri olacağını da ileri sürmüşlerdir (157).

Son yıllarda varikozel ve oksidatif strese yönelik deneysel varikozel modelleri gündeme gelmiştir. Çam ve arkadaşları deneysel varikozel modelinde her iki testiste apoptosis ile reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı göstermişlerdir ve vitamin E'nin koruyucu rolü üzerinde durmuşlardır (158). Onur ve arkadaşları testiste proapoptotik bax protein artışı, antioksidan enzim aktivitesinde azalmayı ve malondialdehit düzeylerindeki artışı ortaya koyarken bir antioksidan olan melatoninin bu mekanizmalar üzerine olan düzeltici etkisini göstermişlerdir (80).

2.9. Saflaştırılmış Mikronize Flavonoid Fraksiyonu (MPFF) [Daflon® 500mg]

Flavonoidler günümüzde kronik venöz yetmezlik ana başlığı altında, bacak varisi, hemoroid ve lenfödemde damar koruyucu ajan olarak medikal tedavide etkin bir şekilde kullanılmaktadır ve etkilerini başlıca lökosit-endotel arasındaki inflamatuvar proçesi düzenleyerek göstermektedir. Böylece variköz venlerdeki mikrosirkülasyonu düzenleyerek kapiller permeabilityi azaltmakta ve ödemi düzelterek semptomların iyileşmesini sağlamaktadır (159). Ayrıca bu ilaçlar anti-inflamatuvar, antioksidan özellik, immünomodülasyon, antialerjik aktivite, antiviral etkisi, antiproliferatif aktivite ve antikanser aktivite gibi ortak biyolojik fonksiyonlara sahiptir (160). Ek olarak, flavonoidler ilaç metabolize enzim aktivitesini, ksantin oksidaz ve hücrel protein fosforilasyonunu etkileyebilir (161,162,163). Flavonoidler genellikle fosfolipaz A2, siklooksijenaz ve lipoksijenaz gibi enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği bilinmektedir (164,165,166). Bu farmakolojik etkileri sayesinde, flavonoidler perivasküler ödem ve iltihabi hastalık alanlarında, özellikle de tedavi uygulamalarında geniş bir yer tutmaktadır (167). Bu ilaçlar etken maddelerine göre başlıca aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar (159)

1-Doğal olanlar

*Benzopironlar

- α - Benzopironlar=Kumarinler
- γ - Benzopironlar= Flavonoidler (Diosmin, Hesperedin, Oxerutinler)

*Saponozidler

*Diğer(Ginkgo biloba, Ergo derivelere, vb.)

2-Sentetik olanlar (Kalsiyum dobesilat, Adenozin fosfat, vs.)

Diosmin çeşitli bitkisel kaynaklardan izole edilebilen veya hesperidinden türetilmiş doğal bir flavonoid glikozittir. Diosmin ilk kez 1925 yılında “Scrophularia nodosa”dan izole edilmiştir ve 1969 yılında ilk terapötik ajan olarak kullanılmıştır. Diosmin kronik venöz yetmezlik, hemoroid, lenfödem ve varis tedavisinde kullanılan bir damar-koruyucu ajan olarak kabul edilir. Bir flavonoid olan diosmin, anti-inflamatuar, serbest radikal temizleyici ve antimitojenik özellikler de gösterir.

Diosmin (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavone 7-rutinoside, Şekil-2)- merkezinde karbon halkasındaki iki karbon atomları arasında bir çift bağın varlığı ile hesperidinden (3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanone rhamnoglucoside, Şekil-2) moleküler olarak ayrılır. Hesperidinin kabuğu ayrıldıktan sonra diosmine dönüşür. Diosmin flebotonik ve damar-koruyucu bir ajan olarak 30 yılı aşkın süredir kullanılmasının ardından son zamanlarda kanser, premenstrüel sendrom, kolit, diyabet gibi diğer tedavi edici amaçlar için araştırılmaya başlanmıştır (168).

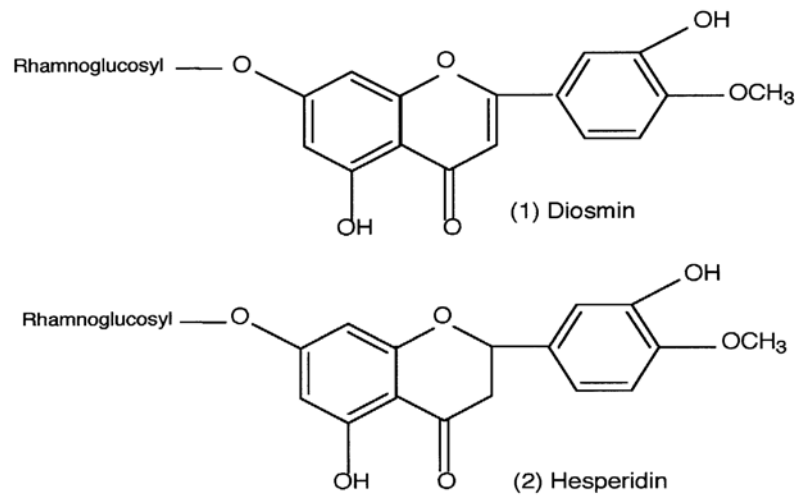
2.9.1. Biyokimyası

Flavonoidler aynı temel kimyasal yapıyı paylaşan geniş bir bitki pigmentler grubudur; yani hidroksil (OH) grubu ile bağlı üç halkalı moleküldür. Diosmin ($C_{28}H_{32}O_{15}$) diğer glikozitler gibi doğal olarak oluşur ve üç halkalı flavonoid yapısına bağlı bir şeker molekülü mevcuttur (168).

2.9.2. Etki Mekanizmaları

Hesperidin Diosminin'in aktivitesini arttırarak venöz tonusun normal halde tutulması dahil, artmış lenfatik drenaj, kan viskozitesi üzerine olumlu etkileriyle

mikrosirkülasyonun korunması, inflamatuvar reaksiyonların inhibisyonu, azalmış kapiller geçirgenlik gibi etki mekanizmalarına sahiptir (169-172). Diosmin dahil bazı flavonoidler, lökosit aktivasyonu, migrasyonu ve adezyon inhibitörleri olan prostaglandin E2 (PGE₂) ve tromboksan A2 (TXA₂)'in güçlü inhibitörleridir. Diosmin endotelial adezyon moleküllerinin plazma düzeylerinde ve nötrofil aktivasyonunda anlamlı bir azalmaya neden olarak mikrosirkülasyon hasarına karşı koruma sağlar (173,174).



Şekil 2. 1-diosmin ve 2-hesperidinin kimyasal yapıları (168)

2.9.3. Klinik Endikasyonları

Variköz Venler ve Kronik Venöz Yetmezlik

Kronik venöz yetmezlik, ağrı, bacakta ağırlık, şişkinlik hissi ve kramplar ile karakterizedir ve variköz venler ile ilişkilidir. Diosmin- hesperidin klinikte alt ekstremite venöz yetmezliği ve hemoroid gibi venöz sistem hastalıklarında kullanılan bir ilaçtır. Venöz tonusu artırıcı, kapiller rezistansı ve kapiller permeabiliteyi düzenleyici ve lenfatik drenajı artırıcı etkileri bilinmektedir. Bunun yanı sıra serbest radikal tutucu ve lökosit adheransını azaltıcı etkileri olduğunu belirten çalışmalarda mevcuttur (175).

Hemoroidler

Birkaç büyük klinik çalışma diosminin-hesperidinin, hemoroidin akut ve kronik semptomların tedavisinde etkili olduğu göstermiştir (176).

Lenfödem

Diosmin, lenfatik akım ve lenf onkotik basınç artışı sağlayarak lenfatik sistem üzerine etki eder (177,178). Pecking ve arkadaşları meme kanseri operasyonu sonrası meydana gelen üst ekstremitelerde lenfödemde, diosmin-hesperidinin etkilerini araştırdıkları bir çalışmada diosmin hesperidinin lenfödemdeki lenf akış hızını arttırarak, intralenfatik basıncı anlamlı olarak azalttığı ve aynı zamanda interstisyel sıvının kapillere geri dönüşünü arttırdığı, böylece lenfödem tedavisini olumlu etkilediğini göstermişlerdi (177).

Ayrıca kanser, staz dermatiti, yara iyileşmesi, premenstrüel sendrom mastodynia, dermatofibrosklerozis, viral enfeksiyonlar ve kolit için diosmin-hesperidin kullanımı araştırılmıştır (168).

2.9.4. Etkileşimi

Farmakokinetik araştırmalar, diosminin bağırsak florası tarafından hızla aglycone formuna dönüştürüldüğünü göstermiştir. Diosmetin emildikten sonra 26-43 saatlik bir plazma yarılanma ömrü ile hızla vücuda dağılır. Diosmetin fenolik asitler veya glisin-konjuge türevlerine indirgenir ve idrar yoluyla elimine edilir. Absorbe edilmeyen diosmin veya diosmetin dışkıyla atılır (179,180).

Hayvan çalışmalarında, % 90-diosmin ve % 10-hesperidin içeren flavonoid karışımının LD50'si 3g/kg fazladır. Ek olarak, hayvan çalışmalarında 13 ve 26 hafta boyunca tekrarlanan oral uygulamadan sonra, terapötik dozun 35 katı uygulanması sonucu subakut, akut ya da kronik toksisite görülmemiştir. Diosminin mutajenik aktivite, embriyo toksisitesi ve üreme fonksiyonları üzerinde anlamlı bir yan etkisi olmadığı kabul edilmektedir. Transplasental göç ve anne sütüne geçişi en az düzeydedir (181).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma için, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulundan onay alınarak Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanı Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarında (SDÜ-HÜDAL) gerçekleştirildi. Çalışma SDÜ-HÜDAL'dan temin edilen 66 adet adolesan dönemdeki (ortalama 6 haftalık) Spraque-Dawley tipi erkek sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. Ratların ağırlıkları 172-252 gr arasında değişmekte olup ortalama ağırlıkları 217 gramdı. Hayvanlar sabit sıcaklık ve nem oranında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olan standart laboratuvar ortamında barındırıldılar. Barınma süresince deney hayvanları standart beslenme, barınma ve bakım koşullarına tabi tutuldular ve deney hayvanlarına standart dışı kısıtlama uygulanmadı.

3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Ratlar toplam 7 gruba ayrıldılar. Cerrahi sırasında mikro cerrahi setler kullanıldı.

Pilot çalışma için 6 adet rat kullanıldı.

Grup 1: Kontrol grubu. Herhangi bir işleme tabi tutulmadı ve 8 hafta sonra sakrifiye edildi (7 rat).

Grup 2: Sham grubu. Sol renal ven etrafı dönüldü ancak ligasyon yapılmadan bırakıldı ve 8 hafta sonra sakrifiye edildi (9 rat).

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

Grup 4: Varikozel oluşturuldu ve 4 hafta sonra varikozektomi uygulanıp takiben MPFF 4 hafta boyunca verildi (9 rat).

Grup 5: Varikozel oluşturuldu ve oluşturulduktan hemen sonra 8 hafta boyunca MPFF verildi (12 rat).

Grup 6: Varikozel oluşturuldu ve 4 hafta sonra MPFF 4 hafta boyunca verildi (10 rat).

Grup 7: Varikozel oluşturuldu ve 4 hafta sonra varikozektomi yapıldı (10 rat).

3.3. Cerrahi İşlem

Deneysel sol varikozel oluşturulacak ve sham operasyonu uygulanacak ratların tümü işlemden 18 saat öncesinden başlayarak sadece su içmelerine izin verilerek aç bırakıldı. Ratlar antisepsi kurallarına uyulup, vücut ısıları korunarak laboratuvar şartlarında operasyona alındı. Standart anestezi uygulaması olarak intraperitoneal % 5 ketamin hioklorür (50-100 mg/kg) verildi. Tüm ratlar sırt üstü yatırıldı ve batın orta hat çizgisi her iki yanda 1'er cm'lik alan traş edilerek tüylerden arındırıldı. Cerrahi alan açığa çıkarıldıktan sonra % 10 Povidone Iodine ile uygun saha temizliği yapıp yalnızca cerrahi alan açıkta kalacak şekilde batın steril örtülerle kapatıldı.

Varikozel modeli: Steril cerrahi aletlerle karın ön yüzüne 2 cm'lik bir insizyon uygulandı. Linea alba üzerinden cilt, cilt altı, karın ön duvarı ve periton geçilerek batın içerisine ulaşıldı. Barsaklar mediyale devrilerek sol renal ven, vena kava ve sol spematik ven üzerindeki yağ ve bağ dokuları diseke edilerek uygun görüntü sağlandı ve sol renal ven serbestleştirildi. Varikozel modeli oluşturulacak gruplardaki ratlarda vena kavaya yakın renal venin etrafı bir ince uçlu klemp yardımı ile dönüldükten sonra 4/0 ipek geçildi. Takiben 20 G anjiyoket (0,85 mm) renal ven üzerine paralel olacak şekilde yerleştirildi ve sol internal spematik venin renal vene girdiği yerin proksimalinden 4/0 ipek sütür ile renal ven anjioketi saracak şekilde daraltıldı. Daha sonra anjioket geri çekilerek renal vende % 50 oranında daralma gözlemlendi.

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

Varikosektomi Modeli: Eski abdominal orta hat insizyon yerinden yeni bir insizyon yapılarak batına girildi. Bu gruptaki hayvanlarda sol spermatik ven dilate ve tortüöz olarak izlendi. Daha sonra sol spermatik ven renal venle birleşmeden önce serbestleştirilerek 4/0 ipek suture ile bağlandı ve yüksek ligasyon yöntemi ile varikosektomi yapıldı. İşlem sonrası 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sutureler ile batın 2 tabaka halinde kapatıldı.

3.4. MPFF Uygulaması ve Periyotlar

Çalışma gruplarının süreleri planlanırken, daha önceden literatürde sıçanlar üzerinde yapılmış olan varikozel çalışmaları da dikkate alındı. Buna göre varikozelin testis ve vasküler yapılar üzerindeki etkilerinin en optimal gözlenebildiği süre 4. haftadan sonra, 12. haftadan önce olarak bildirilmekteydi (6,7). Ancak, varikozel oluşturulan ratlarda yapılan farklı çalışmalarda genellikle uygulanan deney süresi 30 gündür (7,28,54). Aynı şekilde varikosektominin olası etkisinin gerçekleşmesi için varikosektomi operasyonu yapıldıktan sonra 4 hafta kadar beklendi.

Literatürde MPFF'nin testiküler ven patolojilerinde kullanımı ile ilgili bir çalışmaya rastlanmadı. Ancak MPFF ile yapılan diğer çeşitli çalışmalarda, ilacın olası etkinliğini ortaya koyabilmek için beklenen süre 20 gün ile 6 ay arasında değişmektedir ve ortalama 1-2 ay kadar sürmektedir (182,183).

Çalışmamızda grup-4,6'ya ratlar için kullanılan feeding tüp ile gavaj yapılarak MPFF [Daflon® 500mg, Micronised Purified Flavonoid Fraction (MPFF) (Les Laboratoires Servier, France)] (300 mg/kg/gün vücut ağırlığı, 900 ppm diosmin, 100 ppm hesperidin) koruyucu dozda 4 hafta uygulandı.

Grup-5'e ise 8 hafta uygulandı (183).

Varikosektomi operasyonlarının ardından varikosektominin etkisinin gerçekleşmesi için 4 hafta daha beklendikten sonra intraperitoneal ketamin anestezisi altında tüm hayvanlara sağ-sol orşiektomi uygulandı. (Grup 3 ve grup 5'den birer hayvanda testiküler atrofi geliştiği için, grup 2 ve grup 4'den birer hayvan kanama nedeni ile kaybedildiği için, grup 1'den 2 hayvan deney aşamasında herhangi bir işlem yapılmamasına rağmen kaybedildiği için bu ratlar çalışma dışı bırakıldı). Daha sonra sakrifikasyon işlemi için torakotomi yapılarak diafram ve perikardiyum kesildi.

İntrakardiyak yüksek doz ketamin enjeksiyonu yapılarak asistol sağlandı ve sakrifikasyon işlemi tamamlandı.

Çıkarılan testis dokuları hassas tartı (AND® GR-200, Japon) ile ölçülerek enine ikiye bölündü. Yarısı ışık mikroskopik inceleme için % 10'luk Formol solüsyonu içine alınarak takip edildi. Ayrıca, diğer yarısı biyokimyasal analiz için fosfat tampon içinde 2 ml'lik ependorflarla -80°C'ye konuldu.

3.5. Testiküler Mikrovasküler Kan Akım Ölçümü

Testiküler mikrovasküler kan akım ölçümleri PeriFlux System 5000 Laser Doppler Blood Perfusion Monitoring and tcpO2/tcpCO2 (Perimed, Stockholm, Sweden) marka cihaz ile ölçüldü (Resim-1)



Resim 1. PeriFlux System 5000 Laser Doppler Blood Perfusion Monitoring and tcpO2/tcpCO2 (184)

PeriFlux System 5000 düşük güçte lazer ışığı fiber optik prob ile dokuya iletilir ve dönen ışık, dokudaki kan hücrelerinin göreceli sayı ve hızını kan akımı olarak hesaplayarak verir. Lazer doppler, cilt dokusunu değerlendirme ve çoğu diğer organ için yaygın olarak kullanılmaktadır. Tekniğin yakın zamanda hipoksi ve iskemi ile ilişkili doku bozukluklarının tanı ve tedavisinde önemi artırmıştır ve bazı hastalıklarda değerli bilgi sağlamaktadır (184):

- Periferik damar hastalığının tanı ve tedavisinde
- Diyabet tedavisinde
- Amputasyon seviyesinin tespitinde
- Tedavinin izleminde
- Plastik cerrahide (Flep değerlendirilmede)
- Yanık tedavisi

3.5.1. Mikrosirkülasyon

Mikrosirkülasyon, arteriyoller, venüller, şantlar ve kapiller gibi dolaşım sisteminin en küçük damarlarındaki kan akımıdır. Mikrosirkülasyon bütün dokularda ve kornea hariç organlarda bulunmaktadır. Başlıca görevleri şunlardır (184):

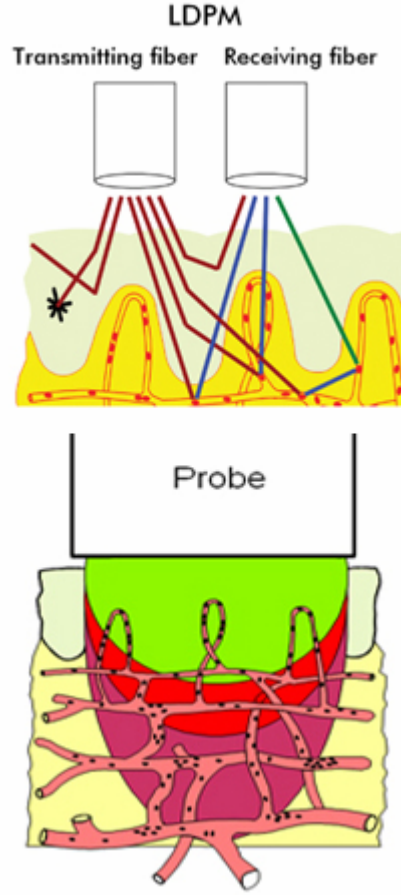
- Kan hücreleri ve dokulara oksijen gibi madde taşınımı (besleyici akış)
- Kan basıncının düzenlenmesinde
- Isı düzenleyicisi (cilt) gibi davranır

3.5.2. Laser Doppler Teorisi

Lazer doppler, kapiller (besin akışı), arteriyoller, venüller ve şant damarları dahil toplam lokal mikrosirkülasyonu kan akımını ölçer. Teknik bir fiber optik prob ile taşınan lazer ışık demetinin emüsyonuna dayanmaktadır (Şekil-3). Işık daha sonra dağılarak kısmen çalışılan doku tarafından emilir. Işık, hareketli kan hücrelerine isabet edince dalga boyu (doppler kayması) değişirken, statik nesnelere isabet edince değişmez. Dalga boyundaki bu değişikliğin büyüklüğü ve frekans dağılımı doğrudan kan hücrelerinin sayısı ve hızı ile ilgilidir. Işığın geri döndüğü fiber tarafından toparlanan bilgi, elektronik sinyale dönüştürülür ve analiz edilir.

Ölçüm derinliği, kapiller yatağın yapısı ve yoğunluğu, pigmentasyon, oksijenasyon gibi doku özelliklerine bağlıdır. Ayrıca, lazer ışığının dalga boyu ve lazer doppler probundaki gönderici ve alıcı fiberler arasındaki mesafeye de bağlıdır.

Geçerli bir lazer doppler cihazı mutlak perfüzyon değerleri (ml/min/100 gr doku gibi) sağlayabilir. Ölçümler isteğe bağlı Perfüzyon Birim (PU) olarak ifade edilebilir (184).



Şekil 3. PeriFlux System 5000 Lazer Doppler probunun çalışma prensibi (184)

Testiküler doku kan akımı ölçümü, sakrifikasyon işleminden önce testis skrotumdan abdomene doğurtularak testis yüzeyinde kan damarlarının en az bulunduğu farklı 2 bölgeden (medial ve lateral) stabil sinyal değerleri elde edildikten sonra ölçülen değerlerin ortalaması alındı. Bütün gruplarda ölçüm yapılan testis alanlarının aynı olmasına dikkat edildi.

3.6. Histopatolojik İnceleme

3.6.1. Fiksasyon ve Doku Takip Aşamaları

Dokular tamponlanmış %10'luk nötral formaldehit (Merck) içine alındı. Fikse olmaları için 24-48 saat beklendikten sonra doku takip işlemine başlandı. Öncelikle bir gece boyunca akarsuda yıkama yapıldı. Fiksatiften arındırılan dokular yükselen derecelerdeki alkollerden (Merck) geçirilerek dehidrate edildi. Daha sonra şeffaflaşmaları için ksilol (Merck) içerisinde bekletildi. Gömme işlemi için 65 °C'lik etüvde, 1:1 oranında ksilol-parafin ve parafin içerisinde bekletildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Takip sırasında kullanılan kimyasallar ve süreleri şu şekildedir:

Kullanılan kimyasal Süre

Çeşme suyunda yıkama	1 gece
% 50'lik etil alkol	2 saat
% 70'lik etil alkol	1 saat
% 80'lik etil alkol	1 saat
% 90'luk etil alkol	1 saat
% 96'luk etil alkol	1 saat
% 100'lük etil alkol	1 saat
% 100'lük etil alkol	1 saat
Ksilol	1-10 dk
Ksilol-Parafin	1-10 dk
Parafin	3 saat

Elde edilen parafin bloklardan Leica marka kızaklı mikrotomda 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler rutin histolojik incelemeler için normal lamlara, immünohistokimyasal incelemeler için Poly-L-lysine kaplı lamlara (Thermo Scientific) alındı. İmmünohistokimyasal boyamada kolaylık olması açısından her lam üzerine ardışık 4-5 kesit düşmesine özen gösterildi. Rutin histolojik incelemeler için dokular Hematoksilen-Eosin boya ile boyandı.

3.6.2. İmmünohistokimyasal Çalışma Protokolü:

İmmünohistokimya için lizinli lamlara alınan dokular deparafinizasyon için etüvde 15-60 dk ısıtıldıktan sonra ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek hidrate edildi. Endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde çözünmüş % 3'lük H₂O₂ (Merck) solüsyonunda bekletilen dokular PBS'de (Fosfat tamponlu salin) (Sigma) yıkandı. Ardından Sitrat tamponuna (Thermo Scientific) alınan dokular ısı aracılı epitop açığa çıkarma işlemi için mikrodalga fırında iki kez ısıtılıp soğutuldu ve yine PBS'de yıkandı.

Kullanılacak kimyasalların birbirine karışması ve fazla kimyasal kullanılmasının engellenmesi için bu aşamadan itibaren lamların üzerindeki doku örneklerinin çevresi hidrofobik PAP pen kalem ile çizildi ve boyama süresinde bu işlem gerektiğçe tekrarlandı. Nonspesifik antikor bağlanmasını engellemek için Ultra V Block (Thermo Scientific) solüsyonu damlatılan dokular PBS-Tween 20 (Thermo Scientific) solüsyonunda yıkandı.

Bloklamanın ardından inkübasyon kabına alınan lamlar üzerinde yer alan ardışık kesitlere Rabbit Aktif Kaspaz-3 (Santa Cruz, sc-13847) antikorları damlatıldı. Lam üzerindeki son kesite primer antikor damlatılmayarak negatif kontrol olarak değerlendirildi. Örnekler antikorlar ile +4°C'de bir gece inkübe edildi. Buraya kadarki aşamalar aşağıda özetlenmiştir:

<u>Kullanılan kimyasal</u>	<u>Süre</u>
Ksilol-1	→ 10 dk
Ksilol-2	→ 10 dk
% 100'lük Etil Alkol	→ 5dk
% 100'lük Etil Alkol	→ 5dk
% 90'lık Etil Alkol	→ 5dk
% 80'lik Etil Alkol	→ 5dk
% 70'lik Etil Alkol	→ 5dk
Distile Su	→ 5dk

% 3'lük H ₂ O ₂	→ 5 - 10 dk
PBS'de yıkama	→ 5 dk x 3 kez
Sitrat tamponunda mikrodalga fırında	→ 1,5 - 2 dk
Oda ısısında soğutma	→ 20 dk
Sitrat tamponunda mikrodalga fırında	→ 1 dk
Oda ısısında soğutma	→ 20 dk
PBS'te yıkama	→ 5 dk x 3 kez
Ultra V Block	→ 5 - 10 dk
PBS-Tween 20	→ 5 dk x 3 kez
Primer antikor (+4°C'de)	→ 1 gece

Boyama işleminin geri kalanına Santa Cruz firmasının Rabbit için hazırlanmış ABC Staining Kiti kullanılarak devam edildi. Firmanın talimatlarına göre hazırlanan solüsyonlar aşağıdaki sırayla kesitlere uygulandı:

<u>Kullanılan kimyasal</u>	<u>Süre</u>
PBS'de yıkama	→ 5 dk x 3 kez
Biyotinli sekonder antikor	→ 30 dk
PBS'de yıkama	→ 5 dk x 3 kez
AB enzyme reagent	→ 30 dk
PBS'te yıkama	→ 5 dk x 3 kez
Peroksidaz substrat	→ 2 - 8 dk
Distile suda yıkama	→ 5 dk x 3 kez
Hematoksilen (Mayer)	→ 20 sn - 1 dk
Distile suda yıkama	→ 5 dk x 3 kez
% 70'lik Etil Alkol	→ 5dk
% 80'lik Etil Alkol	→ 5dk
% 90'lık Etil Alkol	→ 5dk

% 100'lük Etil Alkol	→ 5dk
Ksilol-1	→ 10 dk
Ksilol-2	→ 10 dk

Kapatma

Entellan kullanılarak lamel ile kapatılan dokular kuruduktan sonra ışık mikroskopunda inceleme için saklandı.

3.6.3. Johnsen Skorlaması

Her hayvanın sağ ve sol testisinden alınan enine kesitinde, 20 adet yuvarlak tübüler enine kesit, seminiferöz epitelin kalitesi açısından değerlendirildi. Aşağıda görüldüğü gibi, spermatojenik hücre tiplerinin varlığına veya yokluğuna göre 1–10 arası skor veren Johnsen metodu kullanıldı (185).

- 1- Tübül kesitinde hiç hücre yoktur.
- 2- Germ hücresi yoktur, sadece Sertoli hücresi bulunur.
- 3- Sadece germ hücreleri, spermatogonya mevcuttur.
- 4- Sadece birkaç spermatosit (5'den az) görülür, spermatid ya da spermatozoa yoktur.
- 5- Tübülün genelinde rastgele düzenlenmiş immatür spermatidler gözlenir, her birinin soluk kromatinli yuvarlak nükleusu vardır, piknotik cisimler yoktur.
- 6- Soluk kromatinleri ve oval başları ile orta-faz spermatidler gözlenir, ırsal bir düzenlenme söz konusudur, piknotik cisim yoktur.
- 7- 10'dan daha az spermatozoa gözlenir, hücrelerin çoğunluğu matür spermatidlerdir ve daha az yoğun nükleer boyanma göstererek perifer yerleşmiştir, piknotik cisimler yoktur.
- 8- Yoğun nükleer boyanma ve kanca baş yapısı gözlenen 10'dan fazla immatür spermatozoa vardır ve tübül içine perifer olarak yerleşmiştir, piknotik cisimler yoktur.

9- 10 JS ile benzer kriterler gözlenir ancak germinal epitelyum birkaç yerinden yarılmış olabilir ve dağınık lümen yapısı gözlenmektedir.

10- Tam matür spermatogenez gözlenir (tübül lümeni içersinde yoğun nükleer kromatini bulunan, matür ve kanca şeklini almış spermatozoa), piknotik cisimler mevcuttur.

3.6.4. Apoptotik İndekslerin Hesaplanması

Apoptotik hücre sayım işlemi, kesit üzerinde x400'lük büyültmede, her testiste, seminifer tübüldeki pozitif işaretlenmiş germ hücreleri sayılarak yapıldı. Apoptotik germ hücresi sayıları, kesit başına düşen toplam seminifer tübül sayısına bölünerek apoptotik indeksler oluşturuldu. Johnsen skorları ve apoptotik indeksleri çıkartılan kesitler, x400 büyültmede Olympus BX50 mikroskoba bağlı fotoğraf ataşmanı ile fotoğraflandı.

3.7. Biyokimya Protokolü

Ependorflarda -80°C'de saklanan dokular -20°C'ye alındı ve daha sonra tartıldı. Ağırlıklarına uygun oranlarda hazırlanan fosfat tamponu (pH 7,4) ile 10 kat dilue edildi. Janke & Kunkel Ultraturax T-25 (Almanya) marka doku parçalayıcı ile ve daha sonra UW-2070 Bandeun Electronic (Almanya) marka sonikatör ile sonike edilerek homojenizasyonu tamamlandı. Doku örneği, Eppendorf 5415-R (Almanya) marka soğutmalı santrifüj ile 4000 devir/dk, 15 dk. santrifüj edildi ve süpernatanı alınarak ependorf tüplere aktarıldı.

LPO ürünlerinden olan MDA; Draper ve Hadley'in tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü.

MMP-2 Cusabio Biotech marka (Amerika) ticari kit ile Elisa yöntemiyle çalışıldı.

MMP-9 Cusabio Biotech marka (Amerika) ticari kit ile Elisa yöntemiyle çalışıldı.

TIMP-1 RayBio marka (Amerika) ticari kit ile Elisa yöntemiyle çalışıldı.

3.8. İstatistiksel İnceleme

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows (Statistical Programme for Social Sciences) paket programı kullanıldı. Verilerin analizinde deskriptif analizler uygulandı. Varyans analizi yapılırken Kruskal – Wallis testi uygulandı. Çoklu karşılaştırılmalarda ve ölçüm ortalamalarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p<0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Testis Volümleri

8 haftalık varikozel modeli süresi sonunda; tüm gruplardaki deney hayvanlarının sağ ve sol testis örnekleri alınarak hassas tartı (AND® GR-200, Japon) ile tartılmıştır. Grupların her iki testis ortalama ağırlıkları (gr) Tablo-1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Grupların her iki testis ortalama ağırlıkları (gr) ve kontrol grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	Sağ Testis Ağırlığı (g)	‘P’ DEĞERİ	Sol Testis Ağırlığı (g)	‘P’ DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	1,47±0,13		1,49±0,11	
2-SHAM GRUBU	1,48±0,10	0,671	1,45±0,11	0,366
3-VARİKOSEL GRUBU	1,31±0,7	0,015	1,12±0,10	0,001
4-VARİKOSEL +VX+MPFFGRUBU	1,47±0,11	0,916	1,43±0,11	0,314
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	1,41±0,12	0,499	1,43±0,14	0,422
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	1,33±0,07	0,035	1,24±0,06	0,001
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	1,40±0,07	0,328	1,42±0,09	0,107

P=Mann Whitney U, anlamlı değer $p<0.05$

Sol testis için grup I’in ortalama testis ağırlığı (1,49±0,11) ile grup 2’in (1,45±0,105) arasında anlamlı istatistiksel farklılık yoktu ($p=0,366$).

Grup-3’ün ortalama testis ağırlığı (1,12±0,10) idi ve diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

Grup-4,5,7’nin ortalama testis ağırlıkları ile grup-I arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

Grup-6’nın ortalama testis ağırlığı (1,24±0,06) idi ve grup-I’den istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($P=0,001$).

Grup-6'nın ortalama testis ağırlığı, grup-3'e en yakın değer olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($P=0,003$).

Sağ testis için grup I'in ortalama testis ağırlığı ($1,47\pm 0,13$) ile grup 2'nin ortalama testis ağırlığı ($1,48\pm 0,10$) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,671$).

Grup-3'ün ortalama testis ağırlığı ($1,31\pm 0,7$) idi ve grup-I'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($P=,015$).

Grup-4,5,7'nin ortalama testis ağırlığı ile grup-I arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

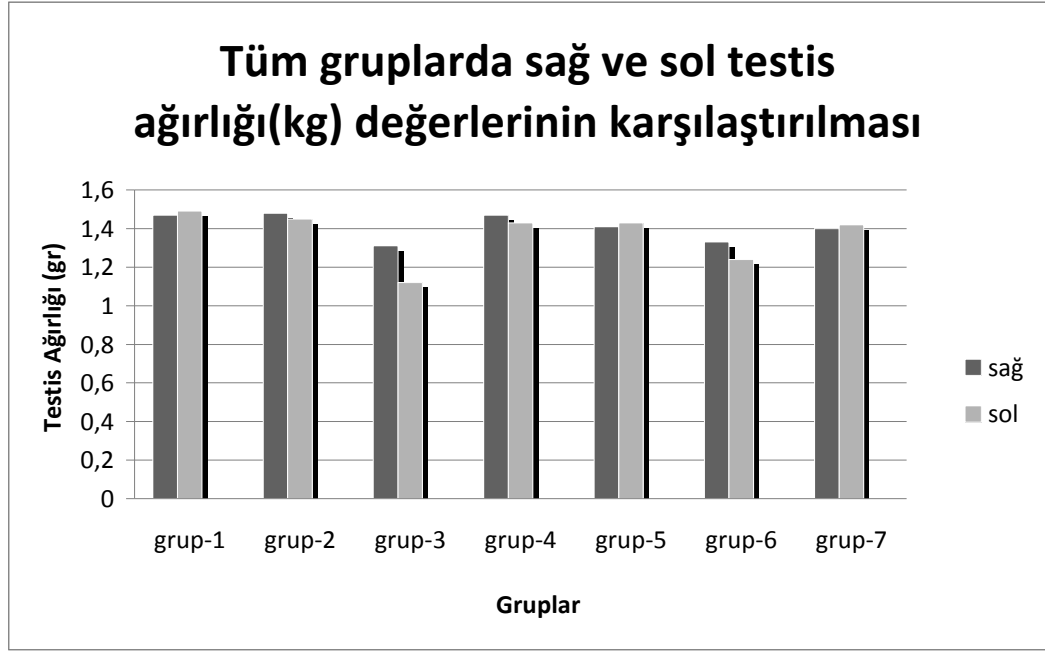
Grup-6'nın ortalama testis ağırlığı ($1,33\pm 0,07$) idi ve grup-I'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($P=0,035$). Grup-3 ile aralarında anlamlı farklılık yoktu ($P=0,567$).

Grup-3'ün ortalama sağ testis ağırlığı diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

Tablo 2. Grupların her iki testis ağırlıklarının varikozel grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	Sağ Testis Ağırlığı (g)	'P' DEĞERİ	Sol Testis Ağırlığı (g)	'P' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	$1,47\pm 0,13$	0,015	$1,49\pm 0,11$	0,001
2-SHAM GRUBU	$1,48\pm 0,10$	0,002	$1,45\pm 0,11$	0,000
4-VARİKOSEL+VX+MPFF GRUBU	$1,47\pm 0,11$	0,009	$1,43\pm 0,11$	0,000
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	$1,41\pm 0,12$	0,046	$1,43\pm 0,14$	0,000
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	$1,33\pm 0,07$	0,567	$1,24\pm 0,06$	0,003
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	$1,40\pm 0,07$	0,024	$1,42\pm 0,09$	0,000

P=Mann Whitney U, anlamlı değer $p<0.05$



Şekil 4. Grupların her iki testis ağırlığının(gr) karşılaştırılması

4.2. Testiküler Mikrovasküler Kan Akım Ölçümleri

Sakrifikasyon aşamasında PeriFlux System 5000 Laser Doppler Blood Perfusion Monitoring and tcpO₂/tcpCO₂ (Perimed, Stockholm, Sweden) marka cihaz ile her iki testiste doku düzeyinde mikrovasküler kan akım ölçümleri yapıldı. Değerlendirme sonrası kontrol (grup 1), sham (grup-2), varikozel oluşturulan ve (grup 3), varikozel oluşturularak 4 hafta sonra varikosektomi uygulanan ve takiben 4 hafta boyunca MPFF verilen (grup 4), varikozel oluşturulduktan hemen sonra 8 hafta boyunca MPFF verilen (grup 5), varikozel oluşturularak 4 hafta sonra MPFF verilen (grup 6), varikozel oluşturularak 4 hafta sonra varikosektomi uygulanan (grup 7)'deki ratların her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri tabloda-3 görülmektedir.

Tablo 3. Her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	Sağ Testis kan akımı	'P' DEĞERİ	Sol Testis kan akımı	'P' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	94±5,03		92,85±6,2	
2-SHAM GRUBU	92,44±2,69	0,490	93,44±3,28	0,915
3-VARİKOSEL GRUBU	119,66±6,44	0,001	120,77±6,05	0,001
4-VARİKOSEL+VX+MPFF GRUBU	94,66±3,84	0,710	94,77±4,57	0,488
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	95,50±6,12	0,582	96,25±5,52	0,253
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	103,50±5,46	0,007	104±4,29	0,002
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	94,60±5,08	0,844	95,20±4,15	0,432

P=Mann Whitney U, anlamlı değer $p<0.05$

Gruplar arasında sol testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri incelendiğinde grup 1,2,4,5,7 arasında istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

Grup 3'ün sol testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Grup 6'nın sol testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değeri grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($P=0,002$) ve grup 3'den ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($P=0,000$).

Grup 7'nin sol testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değeri ile grup 4'ün sol MKA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,869$).

Grup 6'nın sol MKA düzeyi grup 5'den istatistiksel olarak yüksek saptandı ($P=0,003$).

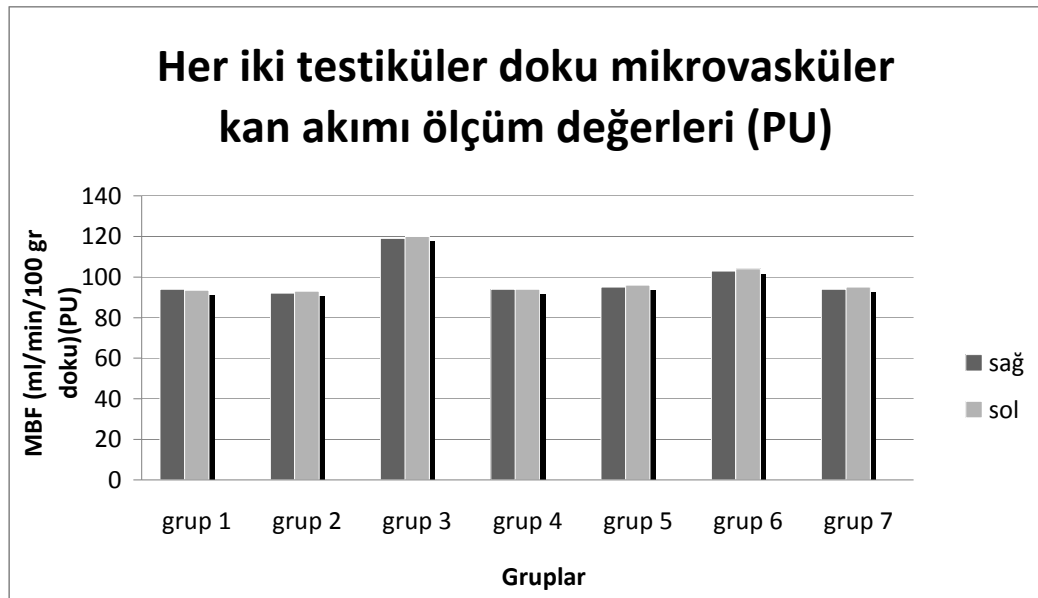
Yapılan araştırmalarda her iki testisin kan akımlarının arasında fark olmadığı tespit edilmesine rağmen bu çalışmada karşı taraf testisin ortalama mikrovasküler

kan akım ölçümleri de yapıldı. Sağ testisin doku ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri bütün gruplarda, sol testis ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri ile yaklaşık olarak aynı tespit edildi.

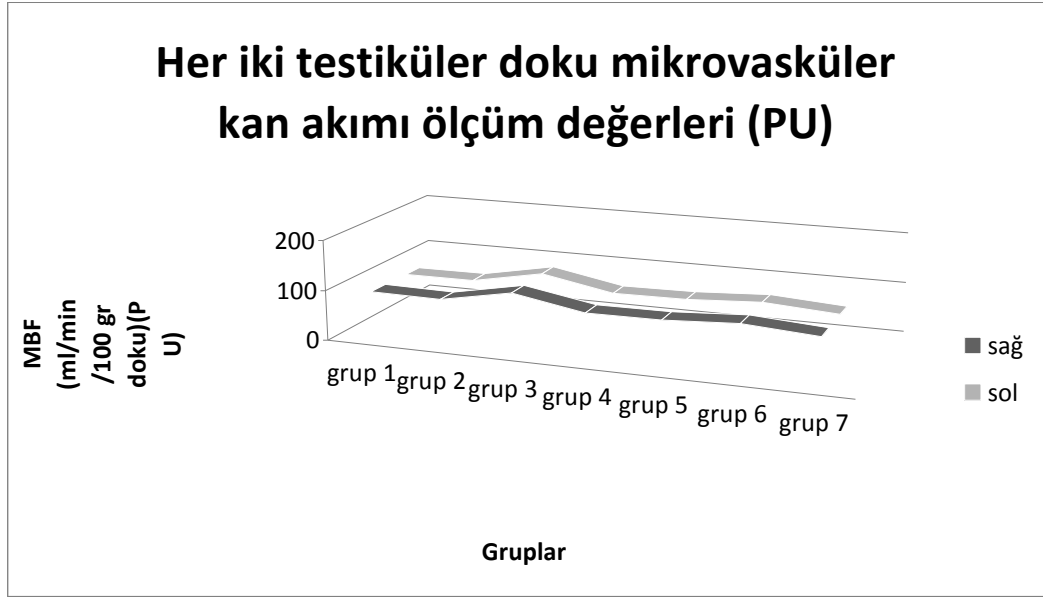
Tablo 4. Her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerlerinin varikozel grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	Sağ Testis kan akımı	'P' DEĞERİ	Sol Testis kan akımı	'P' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	94±5,03	0,000	92,85±6,2	0,000
2-SHAM GRUBU	92,44±2,69	0,000	93,44±3,28	0,000
4-VARİKOSEL+VX+MPFF GRUBU	94,66±3,84	0,000	94,77±4,57	0,000
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	95,50±6,12	0,000	96,25±5,52	0,000
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	103,50±5,46	0,000	104±4,29	0,000
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	94,60±5,08	0,000	95,20±4,15	0,000

P=Mann Whitney U, anlamlı değer p<0.05



Şekil 5. Her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri (PU)



Şekil 6. Her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama mikrovasküler kan akım ölçüm değerleri

4.3. Doku MDA Düzeyleri

Tabloda-2’de kontrol (grup 1), sham (grup-2), varikozel oluşturulan ve (grup 3), varikozel oluşturularak 4 hafta sonra varikosektomi uygulanan ve takiben 4 hafta boyunca MPFF verilen (grup 4), varikozel oluşturulduktan hemen sonra 8 hafta boyunca MPFF verilen (grup 5), varikozel oluşturularak 4 hafta sonra MPFF verilen (grup 6), varikozel oluşturularak 4 hafta sonra varikosektomi uygulanan (grup 7)’deki ratların her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama MDA değerleri görülmektedir.

Tablo 5. Grupların her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama MDA değerleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	Sağ Testis Doku MDA Düzeyi (nmol/mgprotein)	'p' DEĞERİ	Sol Testis Doku MDA Düzeyi (nmol/mgprotein)	'p' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	0,429±0,044		0,365±0,056	
2-SHAM GRUBU	0,376±0,038	0,025	0,424±0,067	0,125
3-VARİKOSEL GRUBU	0,699±0,091	0,002	0,780±0,115	0,001
4-VARİKOSEL+VX +MPFF GRUBU	0,415±0,069	0,556	0,401±0,028	0,325
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	0,476±0,049	0,075	0,441±0,039	0,01
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	0,564±0,027	0,001	0,604±0,030	0,001
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	0,443±0,032	0,556	0,463±0,040	0,01

P=Mann Whitney U, anlamlı değer $p<0.05$

Gruplar arasında sol testis doku MDA düzeyleri incelendiğinde grup 1 ile grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

Grup 7'nin sol testis doku MDA düzeyi ile grup 1 ve grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

Grup 4'ün sol testis doku MDA düzeyi grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$) ama grup 2 ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

Grup 3'ün sol testis doku MDA düzeyi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$)

Grup 6'nın sol testis doku MDA düzeyi grup 1,2,4,5,7'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$) ve grup 3'den ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($P<0,05$).

Grup 7'nin sol testis doku MDA düzeyi grup 4 ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p=0,012$).

Grup 7'nin sol testis doku MDA düzeyi grup 1 ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p=0,01$) ama grup 2 ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

Bu çalışmada ipsilateral testiküler doku incelenmesine paralel olarak karşı testiste de doku düzeyindeki lipid peroksidasyonunun derecesi incelendi.

Gruplar arasında sağ testis doku MDA düzeyleri incelendiğinde grup 1,4,5,7 arasında istatistiksel olarak aralarında anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

Grup 2'nin sağ testis doku MDA düzeyi grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p=0,025$).

Grup 3'ün sağ doku MDA düzeyi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

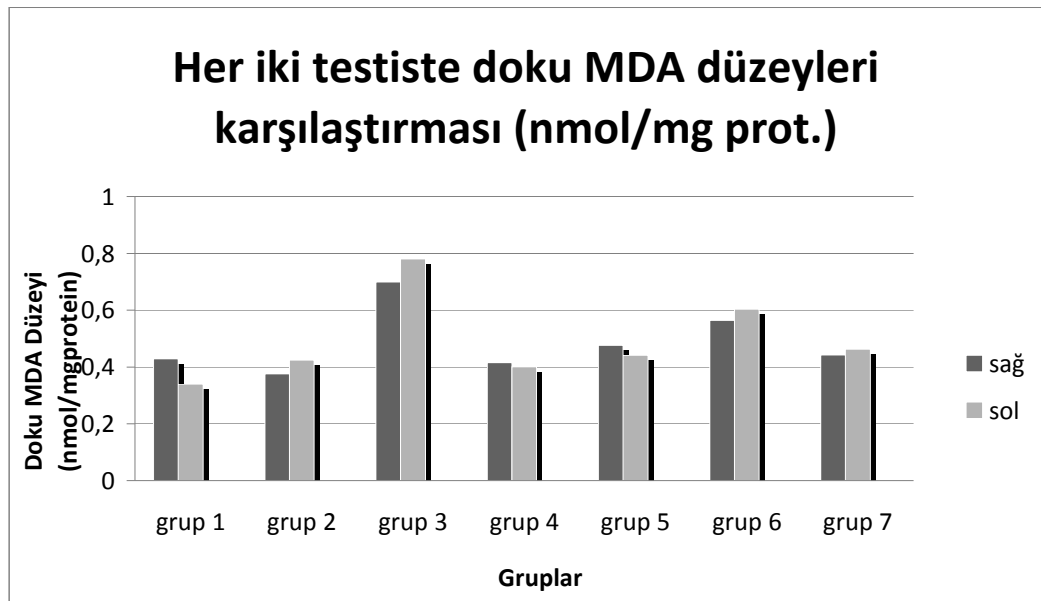
Grup 6'nın sağ testis doku MDA düzeyi grup 5'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p=0,000$).

Ayrıca varikozel modeli oluşturulan grupta sağ ve sol testiküler doku MDA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,310$).

Tablo 6. Grupların her iki testiküler doku düzeyindeki ortalama MDA değerlerinin varikozel grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	Sağ Testis Doku MDA Düzeyi (nmol/mgprotein)	'P' DEĞERİ	Sol Testis Doku MDA Düzeyi (nmol/mgprotein)	'P' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	0,429±0,044	0,002	0,365±0,056	0,001
2-SHAM GRUBU	0,376±0,038	0,001	0,424±0,067	0,001
4-VARİKOSEL+VX+MPFF GRUBU	0,415±0,069	0,001	0,401±0,028	0,001
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	0,476±0,049	0,000	0,441±0,039	0,000
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	0,564±0,027	0,005	0,604±0,030	0,006
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	0,443±0,032	0,001	0,463±0,040	0,002

P=Mann Whitney U, anlamlı değer $p<0,05$



Şekil 7. Her iki testiste MDA düzeylerinin karşılaştırılması (nmol/mg protein)

4.4. Johnsen Skorlarının Değerlendirilmesi

Her hayvanın sol testisinden alınan enine kesitinde, 20 adet yuvarlak tübüler enine kesit seminiferöz epitelin kalitesi açısından değerlendirildi. Değerlendirme sonrası kontrol (grup 1), sham (grup-2), varikozel oluşturulan ve (grup 3), varikozel oluşturularak 4 hafta sonra varikosektomi uygulanan ve takiben 4 hafta boyunca MPFF verilen (grup 4), varikozel oluşturulduktan hemen sonra 8 hafta boyunca MPFF verilen (grup 5), varikozel oluşturularak 4 hafta sonra MPFF verilen (grup 6), varikozel oluşturularak 4 hafta sonra varikosektomi uygulanan (grup 7)'deki ratların her iki testiküler ortalama Johnsen Skorları tablo-7'de verilmiştir.

Tablo 7. Her iki testiste grupların Johnsen skorlarının ortalamaları ve kontrol grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	Sağ Testis Ortalama Johnsen Skoru	'P' DEĞERİ	Sol Testis Ortalama Johnsen Skoru	'P' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	9,75 ± 0,05		9,68 ± 0,09	
2-SHAM GRUBU	9,66 ± 0,13	0,128	9,72 ± 0,08	0,389
3-VARİKOSEL GRUBU	8,76 ± 0,21	0,001	7,48 ± 0,28	0,001
4-VARİKOSEL+VX+MPFF GRUBU	9,60 ± 0,18	0,057	9,56 ± 0,10	0,037
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	9,5 ± 0,12	0,001	9,32 ± 0,11	0,000
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	9,28 ± 0,21	0,001	8,80 ± 0,24	0,001
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	9,63 ± 0,14	0,067	9,51 ± 0,13	0,021

P=Mann Whitney U, anlamlı değer $p<0,05$

Grupların sol testis ortalama Johnsen skorları karşılaştırıldığında grup 1 ile grup 2 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Grup 3,4,5,6 ve 7'nin sol testis ortalama Johnsen skorları grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

Grup 3'ün sol testis ortalama Johnsen skoru diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

Grup 5'nin sol testis ortalama Johnsen skoru grup 6'dan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Grup 7'nin sol testis ortalama Johnsen skoru grup grup 4 ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Grupların sağ testis ortalama Johnsen skorları karşılaştırıldığında grup 1 ile grup 2,4,7 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Grup 3,5,6'nın sağ testis ortalama Johnsen skorları grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

Grup 3'ün sağ testis ortalama Johnsen skoru diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p < 0,05$).

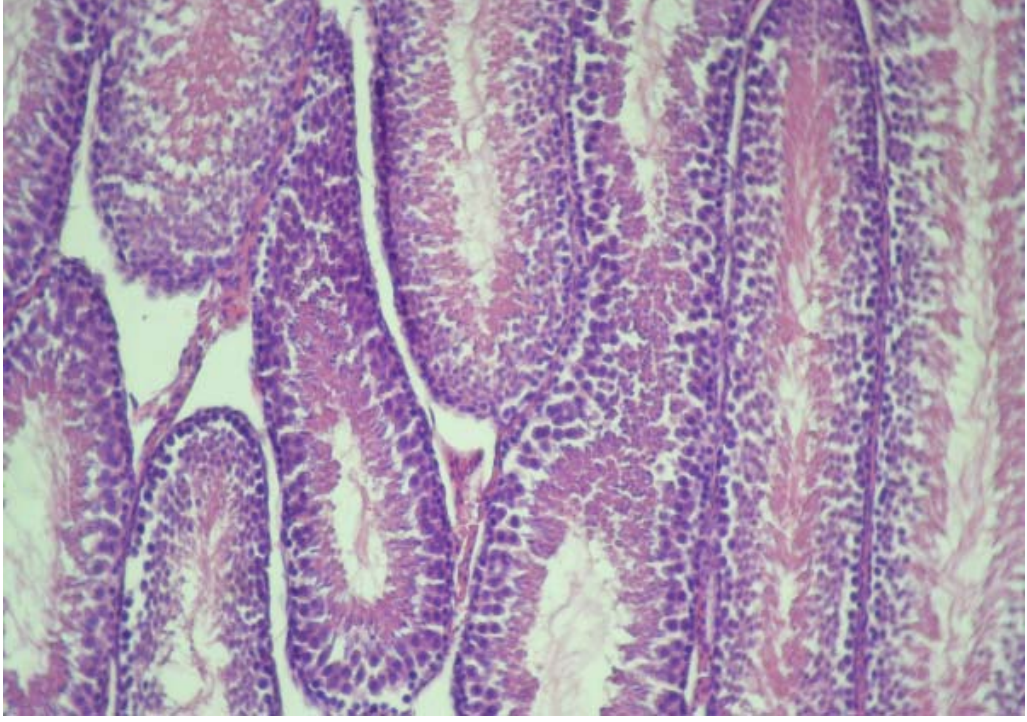
Grup 5'nin sağ testis ortalama Johnsen skoru grup 6'dan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p < 0,05$).

Grup 7'nin sağ testis ortalama Johnsen skoru grup 4 ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0,05$).

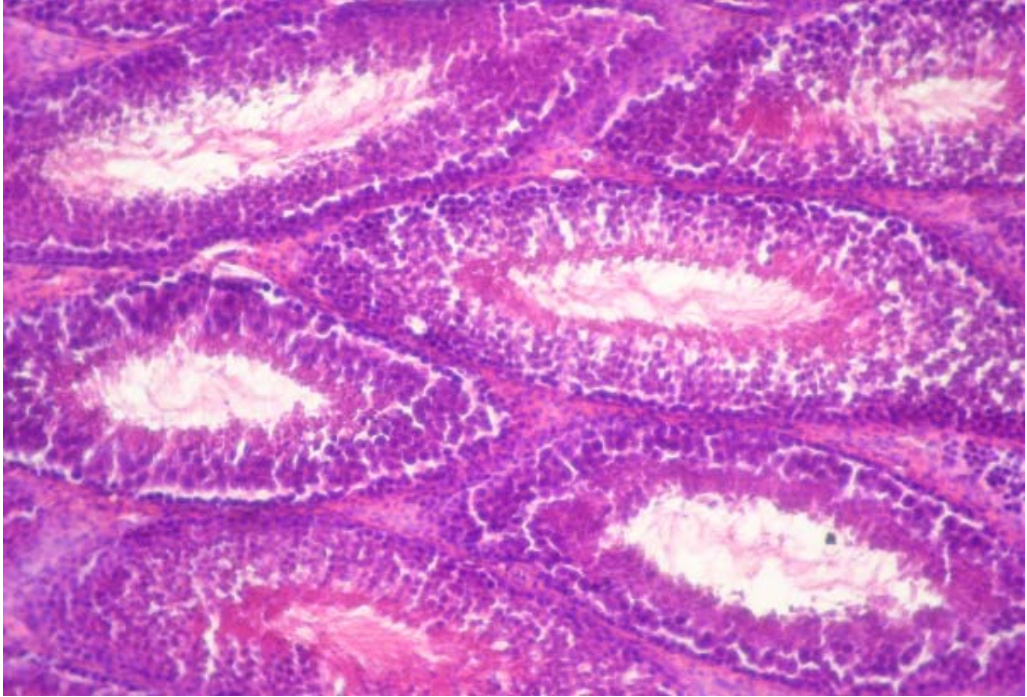
Ayrıca varikozel modeli oluşturulan grupta sağ ve sol testis ortalama Johnsen skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ve sol testis Johnsen skorunda sağa göre daha fazla düşme saptandı ($p = 0,008$).

Tablo 8. Her iki testiste grupların Johnsen skoru ortalamalarının varikozel grubu ile karşılaştırılması

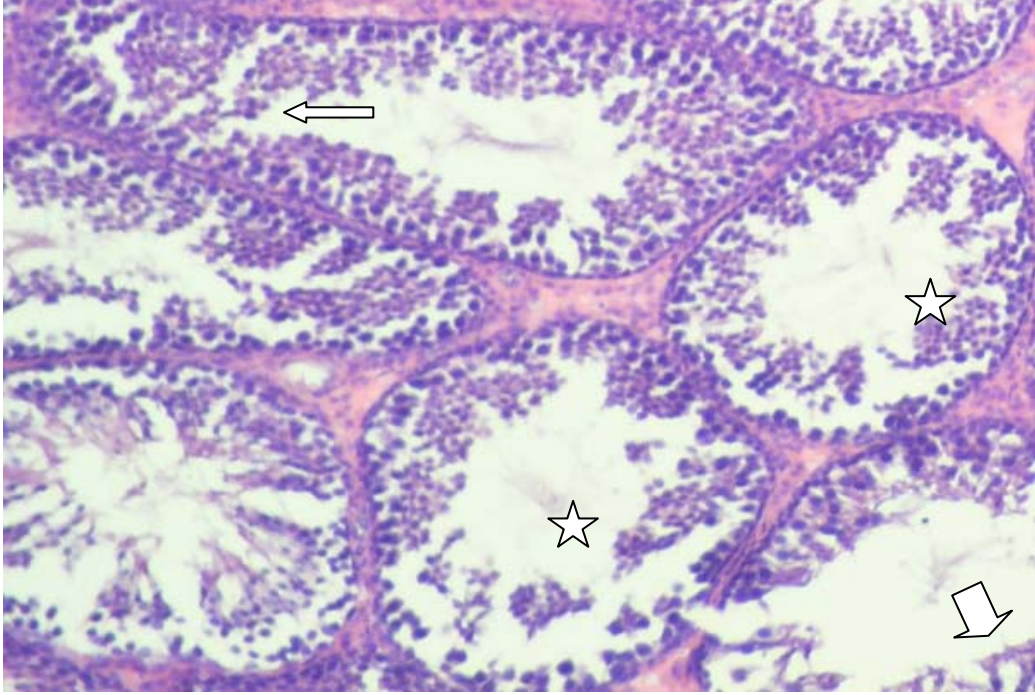
GRUPLAR	Sağ Testis Ortalama Johnsen Skoru	'P' DEĞERİ	Sol Testis Ortalama Johnsen Skoru	'P' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	9,75 ± 0,05	0,000	9,68 ± 0,09	0,000
2-SHAM GRUBU	9,66 ± 0,13	0,000	9,72 ± 0,08	0,000
4-VARİKOSEL+VX+MPFF GRUBU	9,60 ± 0,18	0,000	9,56 ± 0,10	0,000
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	9,5 ± 0,12	0,000	9,32 ± 0,11	0,000
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	9,28 ± 0,21	0,001	8,80 ± 0,24	0,000
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	9,63 ± 0,14	0,000	9,51 ± 0,13	0,000



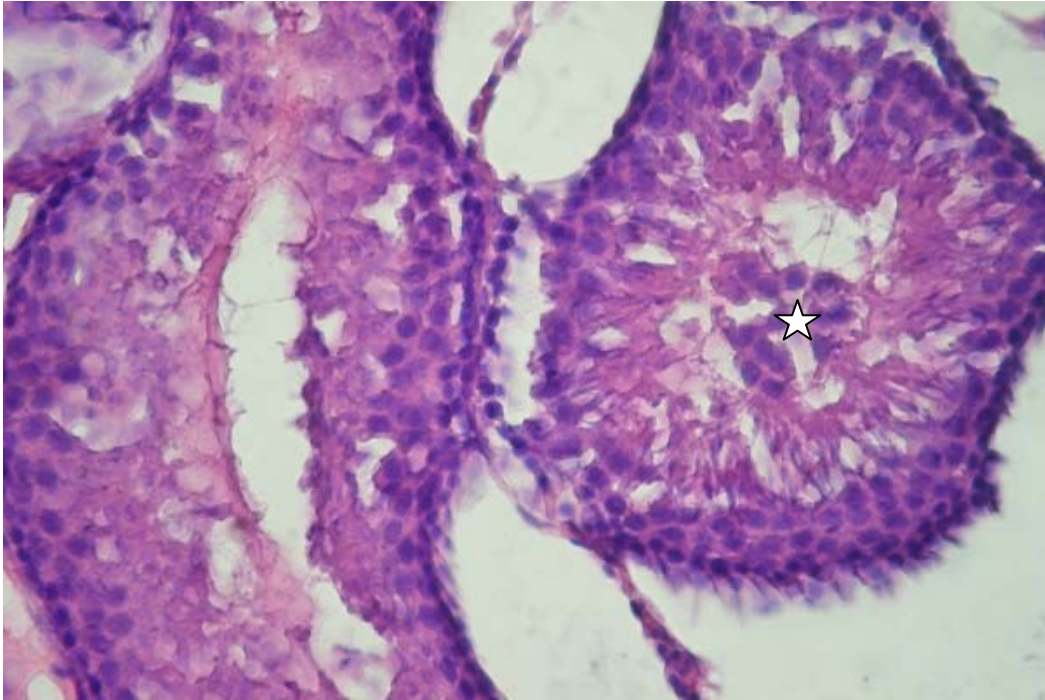
Resim 2. Kontrol grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübüller normal görünümde. Boyama Hematoksilen-Eosin (H-E), Büyütme 200X.



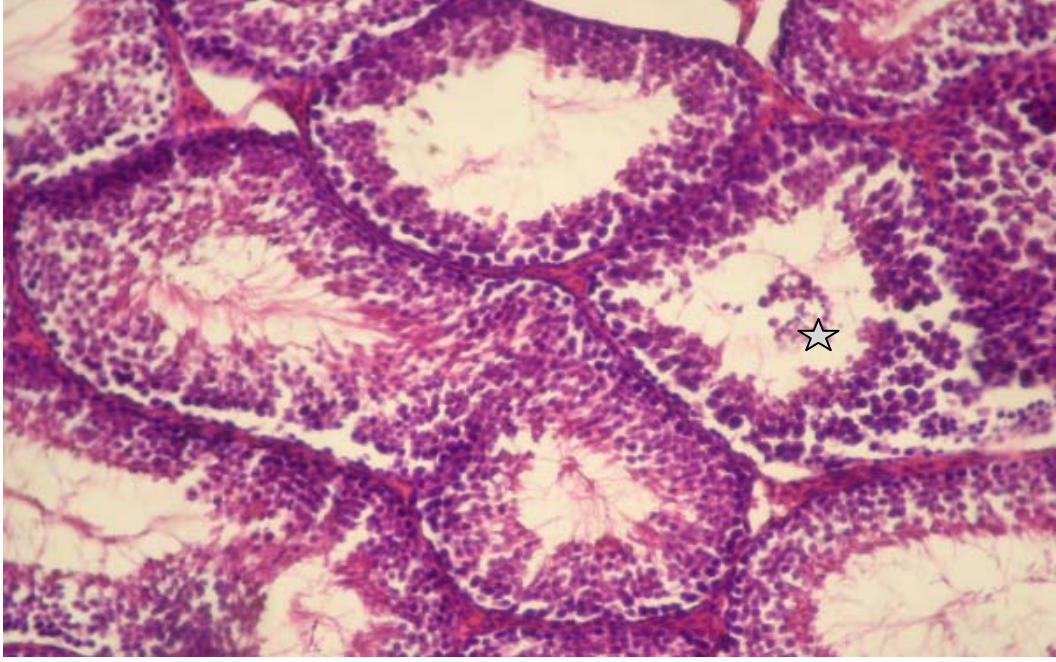
Resim 3. SHAM grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübüllerde normale görünümde (H-E, 200X).



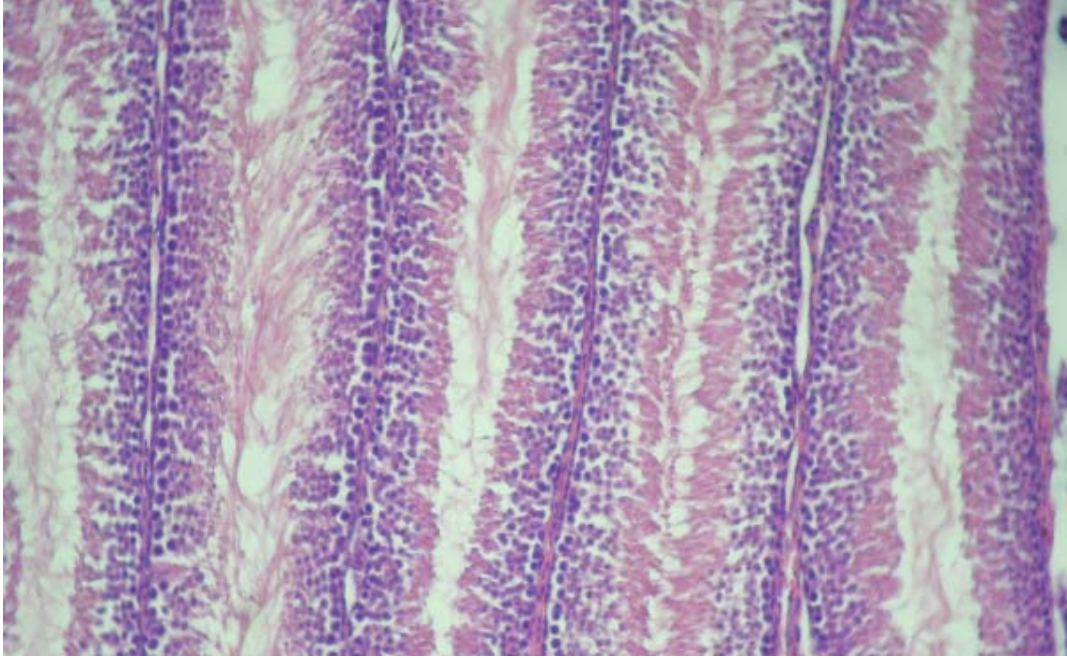
Resim 4. 3. grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübül yapısı hasar görmüş durumda. Tübüllerin çoğunda organizasyon bozukluğu (ince ok), bazı tübüllerde de spermatid (kalın ok) ve spermatozoa (yıldız) bulunmadığı gözlemlendi. (H-E, 200X).



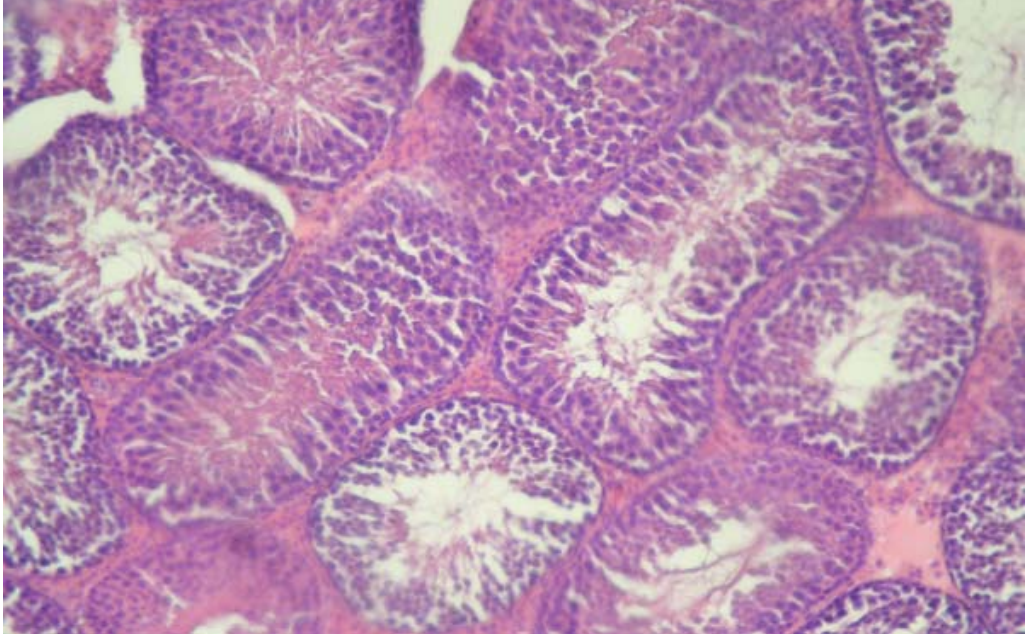
Resim 5. 3. grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübüllerde hasar görünmekte. Sağdaki tübülde lümenine atılan spermatozoa (yıldız) görülüyor (H-E, 400X).



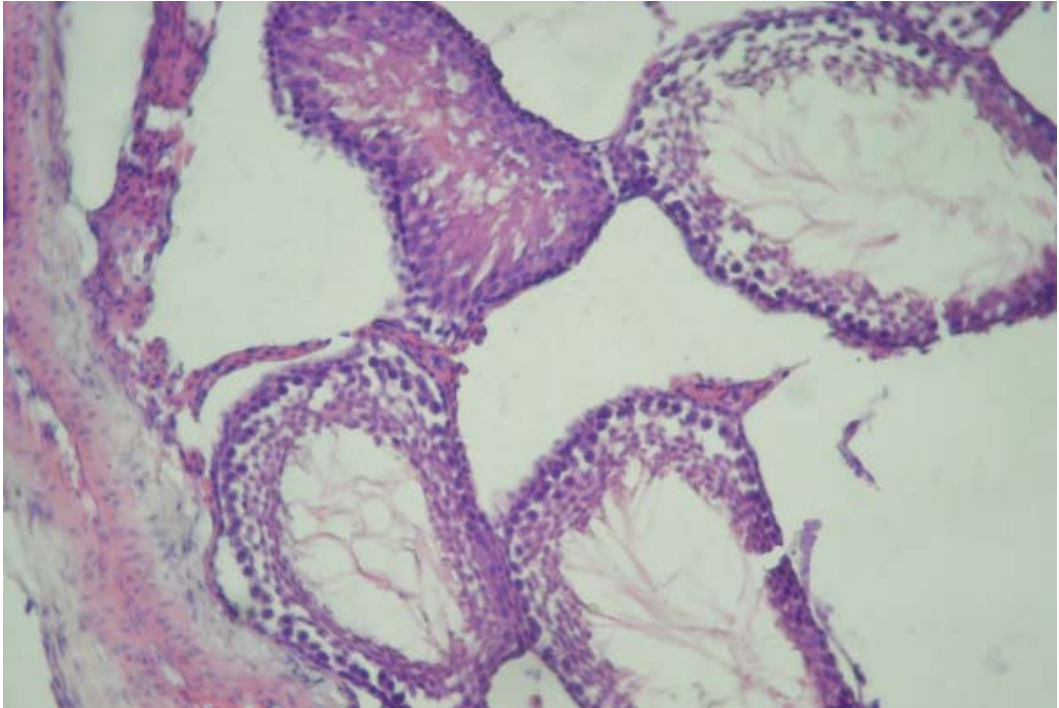
Resim 6. 3. grubuna ait sağ testis kesiti. Seminifer tübüllerde hasar ve yer yer lümeneye atılmış spermatozidler (yıldız) görülüyor (H-E, 200X).



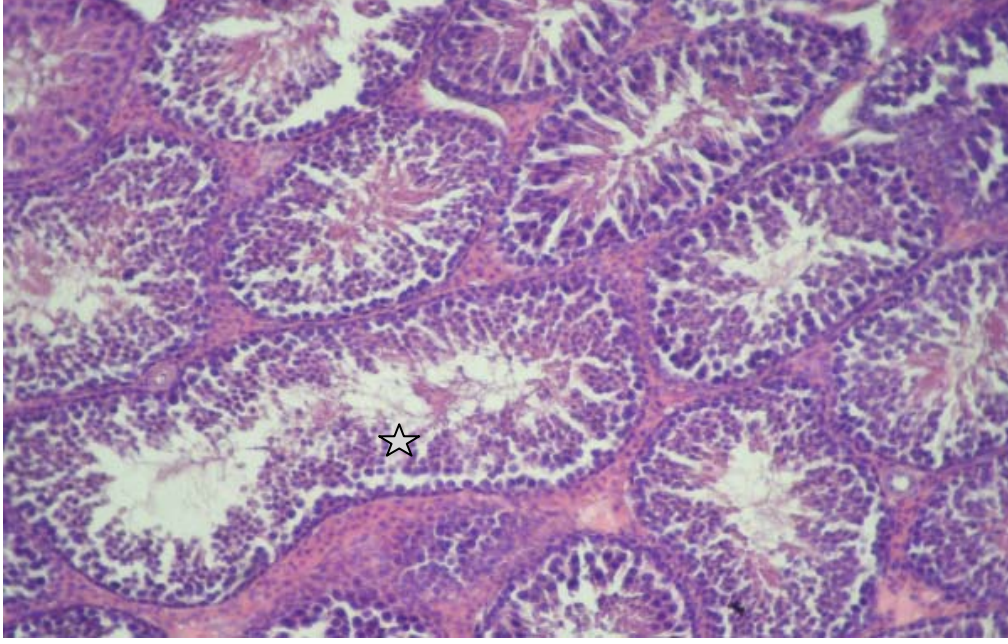
Resim 7. 4. gruba ait sol testis kesiti. Tübüller kontrol grubuna benzer olarak gözlemlendi (H-E, 200X).



Resim 8. 5. gruba ait sol testis kesiti. Tübüllerde minimal hasar ve yer yer tübül organizasyonunda değişimler olmakla birlikte kontrol grubundan belirgin bir farklılık gözlenmedi (H-E, 200X).



Resim 9. 6. grubuna ait sol testis kesiti. Seminifer tübüllerde orta seviyede hasar görünmektedir. Tübül organizasyonunda yer yer düzensizlik mevcut (H-E, 200X).



Resim 10. 7. gruba ait sol testis kesiti. Tübüllerde minimal hasar ve yer yer tübül organizasyonunda değişimler (yıldız) olmakla birlikte kontrol grubundan belirgin bir farklılık gözlenmedi (H-E, 200X).

4.5. Apoptozisin Değerlendirilmesi

Alınan doku örnekleri, Caspase 3 Poliklonal Antikoru ile işaretlenerek değerlendirildi. Değerlendirme sonrası grupların ortalama apoptotik indeksleri tablo-12'de verilmiştir.

Tablo 9. Her iki testiste grupların apoptotik indeks ortalamaları ve kontrol grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	Sağ Testis Apoptotik İndeks Ortalaması	'P' DEĞERİ	Sol Testis Apoptotik İndeks Ortalaması	'P' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	0,154 ± 0,012		0,172 ± 0,011	
2-SHAM GRUBU	0,167 ± 0,014	0,128	0,143 ± 0,021	0,018
3-VARİKOSEL GRUBU	0,398 ± 0,015	0,003	0,491 ± 0,019	0,003
4-VARİKOSEL+VX +MPFF GRUBU	0,164 ± 0,008	0,199	0,184 ± 0,011	0,116
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	0,174 ± 0,024	0,034	0,212 ± 0,015	0,002
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	0,316 ± 0,030	0,003	0,478 ± 0,018	0,003
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	0,193 ± 0,011	0,003	0,195 ± 0,019	0,038

P=Mann Whitney U, anlamlı değer $p<0.05$

Grupların sol testis ortalama apoptotik indeksleri karşılaştırıldığında grup 1'in ortalama apoptotik indeksi grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış bulundu ($p<0,05$).

Grup 5,6 ve 7'nin sol testis ortalama apoptotik indeksi, grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı ($p<0,05$).

Grup 3'ün sol testis ortalama apoptotik indeksi, grup 6 hariç tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulundu ($p<0,05$).

Grup 4'ün sol testis ortalama apoptotik indeksi ile grup 1'in arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Grup 5'nin sol testis ortalama apoptotik indeksi grup 6'dan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük saptandı ($p<0,05$).

Grup 7'nin sol testis ortalama apoptotik indeksi grup 4 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Grupların sağ testis ortalama apoptotik indeksleri karşılaştırıldığında grup 1 ile grup 2,4 arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$).

Grup 3,5,6,7'nin sağ testis ortalama apoptotik indeksleri grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı ($p<0,05$).

Grup 3'ün sağ testis ortalama apoptotik indeksi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı ($p<0,05$).

Grup 5'nin sağ testis ortalama apoptotik indeksi grup 6'dan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük saptandı ($p<0,05$).

Grup 7'nin sağ testis ortalama apoptotik indeksi grup 4 ile karşılaştırıldığı zaman istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük saptandı ($p<0,05$).

Ayrıca varikozel modeli oluşturulan grupta sağ ve sol testis ortalama apoptotik indeksleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ve sol testis apoptotik indeksinde sağa göre daha fazla artma olduğu tespit edildi ($p=0,043$).

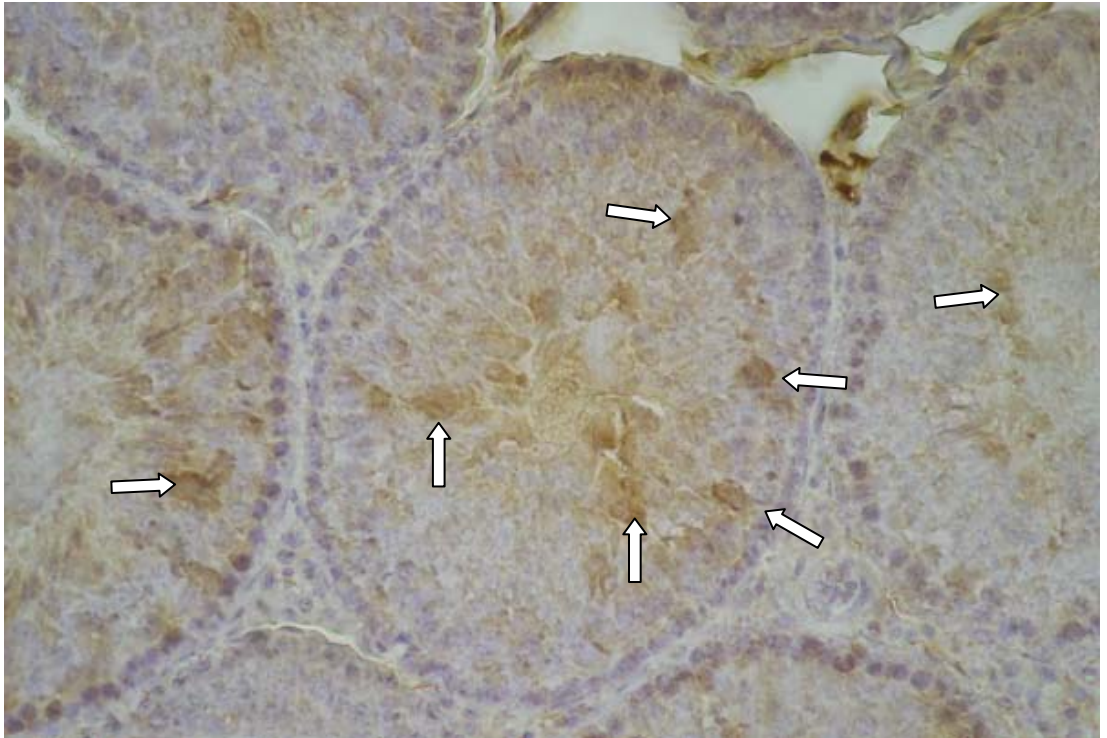
Tablo 10. Her iki testiste grupların apoptotik indeks ortalamalarının varikozel grubu ile karşılaştırılması

GRUPLAR	Sağ Testis Apoptotik İndeks Ortalaması	'P' DEĞERİ	Sol Testis Apoptotik İndeks Ortalaması	'P' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	0,154 ± 0,012	0,003	0,172 ± 0,011	0,003
2-SHAM GRUBU	0,167 ± 0,014	0,003	0,143 ± 0,021	0,002
4-VARİKOSEL+VX+MPFF GRUBU	0,164 ± 0,008	0,003	0,184 ± 0,011	0,002
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	0,174 ± 0,024	0,001	0,212 ± 0,015	0,001
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	0,316 ± 0,030	0,003	0,478 ± 0,018	0,225
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	0,193 ± 0,011	0,002	0,195 ± 0,019	0,002

P=Mann Whitney U, anlamlı değer $p<0.05$



Resim 11. Kontrol grubuna ait antikor eklenmemiş (negatif kontrol) sol testis kesiti (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).



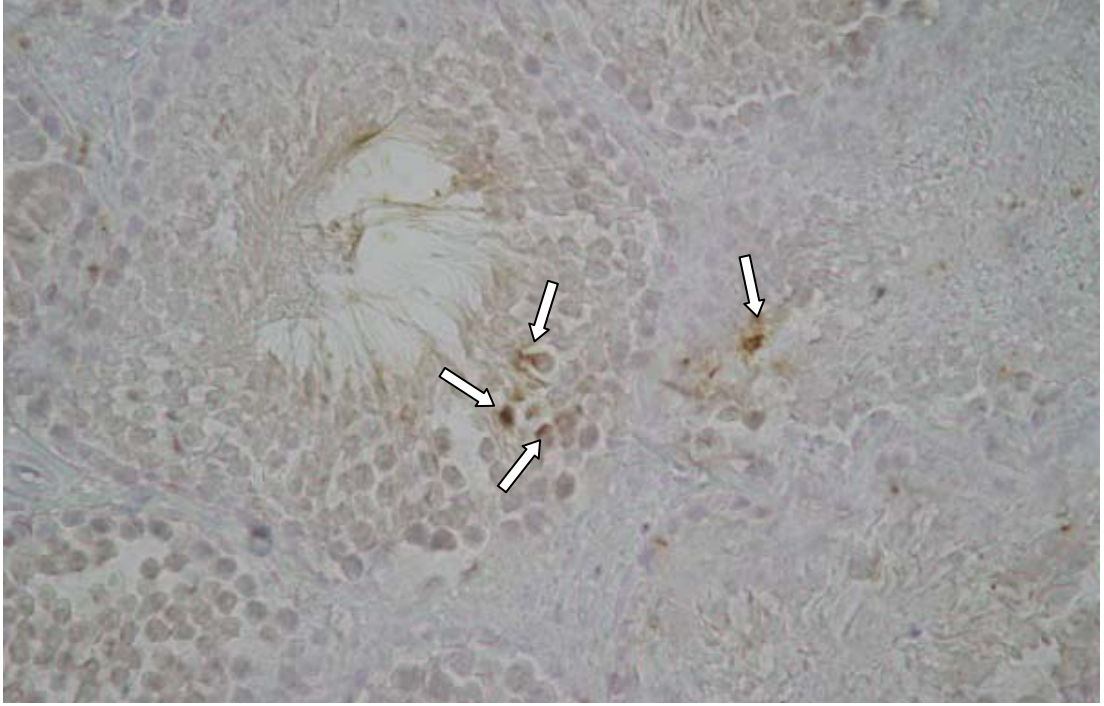
Resim 12. 3. gruba ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikorunun pozitif boyandığı hücreler (oklar) görülüyor. (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X).



Resim 13. 3. gruba ait sağ testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikorunun pozitif boyandığı spermatozidler (oklar) görüntülenmiş. Özellikle lümene atılan spermatozidlerde yoğun boyanma gözleniyor. (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X)



Resim 14. 4 grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikorunun pozitif boyandığı spermatozidler (oklar) görüntülenmiş (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X)



Resim 15. 5. grubuna ait sol testis kesiti. Aktif kaspaz 3 antikorunun pozitif boyandığı spermatozitler (oklar) görüntülenmiş (Zıt boyama Hematoksilen, Büyütme 200X)

4.6. Matriks Metalloproteinaz-2, 9 (MMP-2,9) ve Matriks Metalloproteinaz Doku İnhibitörü'nün (TIMP-1) Sol Testis Doku Düzeyleri

4.6.1. Sol Testis Doku MMP-2 Düzeyleri

Çalışma sonucundaki ratların sol testislerindeki doku MMP-2, 9 ve TIMP-1 düzeyleri ELİSA yöntemi ile ölçüldü. Değerlendirme sonrası grupların ortalama değerleri tablo-11'de verilmiştir.

Grup 1'in sol testis doku MMP-2'si ile grup 2'nin değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($P>0,05$).

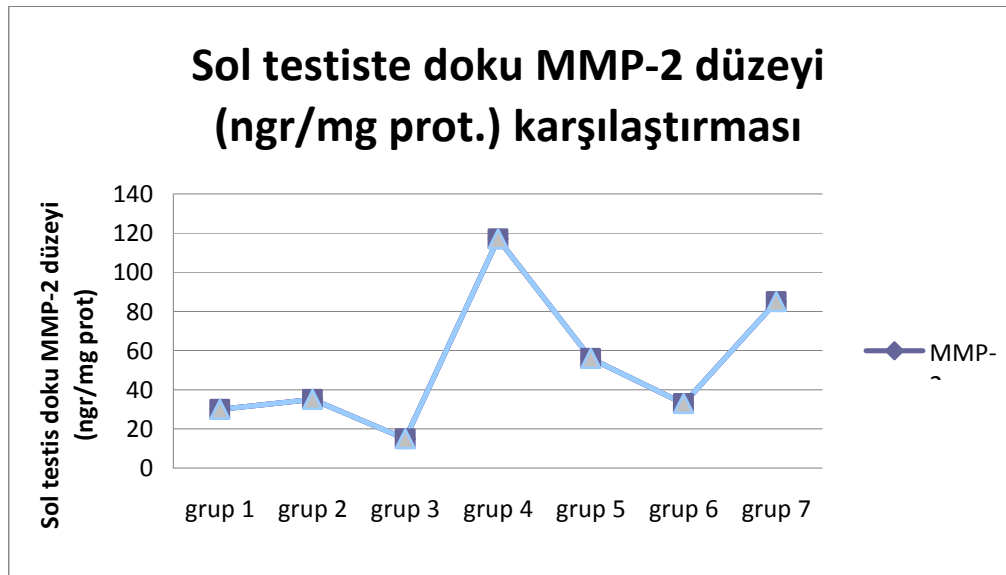
Grup 4,5,7'nin doku MMP-2 düzeyleri grup 1'den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Grup 6 ile grup 1'in doku MMP-2 düzeyleri karşılaştırıldığı zaman aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($P=0,205$).

Grup 3'ün doku MMP-2 düzeyi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

Tablo 11. Tüm grupların ortalama sol testis doku MMP-2, MMP-9, TIMP-1 düzeyleri

GRUPLAR	Sol Testis Doku MMP-2 Değeri (ng/mg prot)	'P' DEĞERİ	Sol Testis Doku MMP-9 Değeri (ngr/mg prot)	'P' DEĞERİ	Sol Testis Doku TIMP-1 Değeri (ngr/mg prot)	'P' DEĞERİ
1-KONTROL GRUBU	30,42±3,13		0,151±0,007		0,007±0,001	
2-SHAM GRUBU	35,39±5,84	0,081	0,144±0,011	0,223	0,007±0,0009	0,186
3-VARİKOSEL GRUBU	15,27±3,72	0,001	0,099±0,011	0,001	0,014±0,0009	0,001
4-VARİKOSEL+VX +MPFF GRUBU	117,83±13,12	0,001	0,199±0,017	0,001	0,01±0,001	0,003
5-VARİKOSEL+8 HF MPFF GRUBU	56,31±8,95	0,000	0,532±0,062	0,000	0,009±0,001	0,001
6-VARİKOSEL+4 HF MPFF GRUBU	33,56±7,99	0,205	0,137±0,01	0,008	0,01±0,0009	0,001
7-VARİKOSEL+VX GRUBU	85,46±8,48	0,003	0,168±0,012	0,01	0,009±0,0006	0,007



Şekil 8. Sol testiste doku MMP-2 düzeylerinin (ngr/mg protein) karşılaştırılması

4.6.2. Sol Testis Doku MMP-9 Düzeyleri

Tüm grupların ortalama sol testis doku MMP-9 düzeyleri tablo-11’de verilmiştir.

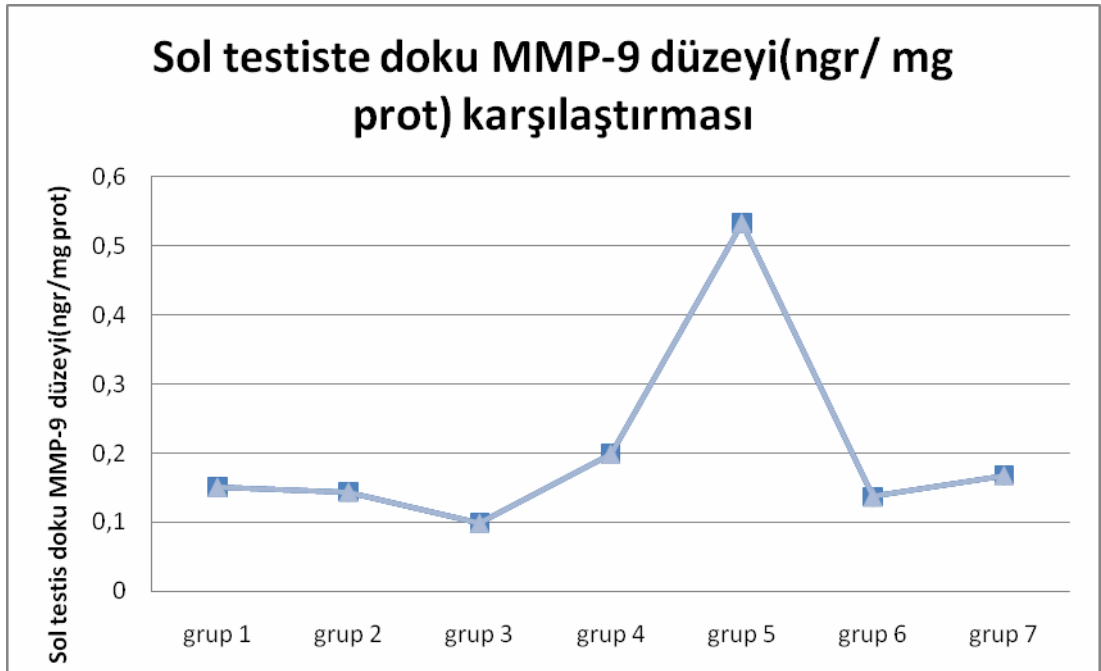
Grup 1’in sol testis doku MMP-9 düzeyi ile grup 2’nin arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($P>0,05$).

Grup 4,5’in doku MMP-9 düzeyleri grup 1’den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,01$).

Grup 6’nın doku MMP-9 düzeyi grup 1’den istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($P=0,008$).

Grup 7’nin doku MMP-9 düzeyi grup 1’den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekken ($P=0,001$) Grup 4’den ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($P=0,007$).

Grup 3’ün doku MMP-9 düzeyi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,01$).



Şekil 9. Sol testiste doku MMP-9 düzeylerinin (ngr/mg protein) karşılaştırılması

4.6.3. Sol Testis Doku TIMP-1 Düzeyleri

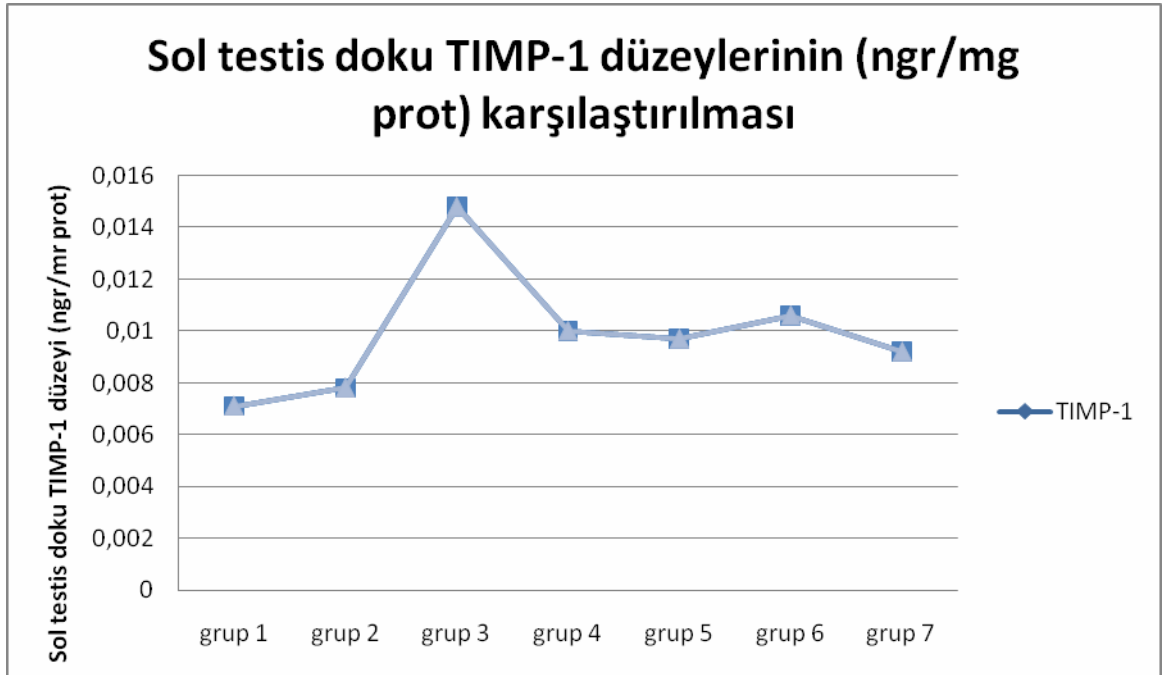
Tüm grupların ortalama sol testis doku TIMP-1 düzeyleri tablo-11’de verilmiştir.

Grup 1’in sol testis doku TIMP-1’i ile grup 2’nin değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($P>0,05$).

Grup 4,5,6,7’nin doku TIMP-1 düzeyleri grup 1’den istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Grup 3’ün doku TIMP-1 düzeyi diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Grup 4 ile 7 ve grup 5 ile 6’nın doku TIMP-1 düzeyleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($P>0,005$).



Şekil 10. Sol testiste doku TIMP-1 düzeylerinin (ngr/mg protein) karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın amacı, varikozel gibi kronik venöz yetmezlik zemininde gelişen alt ekstremite varisi ve hemoroidin semptomatik tedavisinde kullanılan MPFF'nin, testiküler venöz sistem üzerinden etki ederek, spermatik ven ve testiste, varikozele bağlı olarak meydana gelebilecek patolojileri önlemede ne kadar etkili olduğunu ve varikozelin günümüzde tek tedavisi olan varikozektominin etkinliğini göstermektir.

İlerleyici testis hasarı, atrofi ve semen parametrelerinde bozulma sonucu infertiliteye neden olabilen varikozelin adölesan yaş grubundaki olguların % 77'sinde unilateral ya da bilateral testiküler büyüme geriliğine neden olduğu bildirilmiştir (155,186). Varikozelde karşı testis hacminde artış olduğunu söyleyen yayınlar olduğu gibi, hacimde azalmaya neden olduğunu bildiren yayınlar da mevcuttur (61-66). Thomas ve Elder ile Zini ve arkadaşlarının farklı zamanlarda yaptıkları çalışmalarda varikozelde aynı taraf testiste rölafif atrofi görüleceğini bildirmişlerdir (62,64). Ancak Hans ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda semen kalitesi düşüklüğünün testiküler büyüme geriliği ve testiküler volüm ile birlikteliğinin net olmadığını belirtmişlerdir (60). Salama ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada varikozel modelinin oluşturulmasını takip eden 1 aylık dönemde, diğer çalışmaların aksine testis volümlerinde artış olduğunu saptamışlar ve bunun sebebi olarak da varikozel nedeniyle oluşan kapiller permeabilite artışının oluşturduğu intersitisiyel ödemi sorumlu tutmuşlardır (31). Testiküler büyüme geriliği, seminifer tubül elemanlarının kaybı ve tubül çapında azalma olarak tanımlanabilir ve bu patoloji de anormal semen parametreleri ve subfertilitenin başlıca nedenini oluşturmaktadır

Günümüzde varikozel tedavisinde radyolojik ve cerrahi girişimler olmak üzere iki yaklaşım bulunmakta ve bunlar cerrahi girişim ve perkütan embolizasyondur. Tulloch'un 1952 yılında azospermik hastada uyguladığı bilateral varikozektomi sonrası sperm sayısında artma ve sonucunda gebelik bildirmesi tedavide bir dönüm noktası olmuş ve varikozektomi erkek infertilitesinde en sık yapılan operasyon haline gelmiştir (155). Bununla birlikte varikozektomi sonrası bazı hastalarda sperm parametrelerinde düzelme ve fertilite sağlanırken bazı

hastalarda düzelme görülmemesi varikozelde subfertilite ya da infertiliteye yol açan mekanizmaların henüz yeterince aydınlatılamamasına bağlanabilir.

Birçok araştırmacı semen örneği veremeyen ve testis volümünde azalmanın eşlik ettiği adölesan varikozele cerrahi müdahale gerektiğini savunmaktadır ve varikozel tedavisinin amacı fertiliteyi korumak olarak bildirmişlerdir (187). Ayrıca çocuk sahibi olmak isteyen infertil erkeklerin bir veya daha fazla anormal semen parametresinde bozukluk olması da (sperm sayısı, hareket veya morfolojisinde bozukluk olması) cerrahi müdahaleyi gerektirmektedir (155). Varikozelin adölesan dönemde testiküler büyüme ve histoloji üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiler progressif olmakta ve cerrahi tedavi ile sadece olguların % 20-50'si normal fertilitelerini tekrar kazanabilmektedirler. İnfertilite nedeni ile başvuran hastaların da gebelik şansı en çok % 50 olarak bildirilmiştir (188) .

Cerrahi müdahale ile volüm kaybı olan testiste % 53 ila % 100 arasında büyüme oranları bildirilmiştir (190). Ayrıca etkilenen testisin karşı taraf testise göre daha yumuşak olduğunu ve cerrahi girişim sonrası bu testisin normal kıvamını da aldığını bildiren yayınlar olduğu gibi cerrahi müdahale sonrası testis hacimlerinin normale ulaşamayacağını bildiren yayınlar da mevcuttur (186).

Çalışmamızda varikozel grubuna ait sıçanların sol testis ağırlıkları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olarak bulundu ($P=0,000$). Sağ taraf testis ağırlığındaki gruplar arası değişim sol ile benzerlik gösterirken sağ testisin ağırlık olarak varikozele bağlı hasardan daha az etkilendiği tespit edildi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P<0,05$). Çeşitli araştırmalarda da % 10-75 arasında varikozele bağlı olarak özellikle sol testis ağırlığında azalma bildirilmiştir (114). Yaptığımız bu çalışma da diğer birçok çalışmayla uyumlu olarak sol varikozelin bilateral testis hacminde azalmaya yol açtığını göstermiştir (61,62,64,65).

Varikozektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grup ile sadece varikozektomi yapılan grubun sol testis ağırlığı varikozel oluşturulan gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olması ve kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmaması varikozektominin testis hacmi

üzerine olan olumlu etkisine bağlanabilir ve bu olumlu etki karşı testiste de gözlemlenmiştir.

Varikoselektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grup ile sadece varikoselektomi yapılan grubun varikozel oluşturulan gruba göre bilateral testis ağırlığındaki artış literatürle uyumlu olduğu tespit edildi (186,188,189). Varikoselektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grubun sol testis ağırlığındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmasa da varikoselektomi yapılan gruptan daha fazla olması MPFF'nin olumlu etkisine bağlanabilir.

Varikozel modeli oluşturulmasından başlayarak 8 hafta MPFF verilen grubun sol testis ağırlığı varikozel oluşturulan gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($P<0,05$) ve kontrol grubundan daha düşük olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($P>0,05$). Ayrıca bu grup ile varikoselektomi yapılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($P>0,05$). Varikozel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen grubun sol testis ağırlığı kontrol grubundan ve diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüken, varikozel grubundan ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($P<0,05$). Sağ tarafta ise varikozel oluşturulan gruba göre testis ağırlığındaki gruplar arası değişim, sol ile benzerlik gösterirken sol testiste ağırlık olarak artış daha fazla tespit edildi.

Özeren antiinflamatuvar, venöz mikrosirkülasyon düzenleyici ve antioksidan bir flavonoid türevidir olan oxerutin'in sıçan testisi üzerindeki etkisini değerlendirdiği deneysel bir çalışmada, oxerutin'in varikozelin testis üzerindeki olumsuz etkisini kontrol grubu ile karşılaştırılabilir düzeye getirdiğini, ayrıca 12 haftalık tedavi ile fertilitiyi koruduğunu bildirmiştir. Testis ağırlığı üzerine olan bu olumlu etkisini testiküler kitlenin büyük çoğunluğunu oluşturan seminifer tubülün içeriğini yansıtan germinal epitelyum kalınlığındaki artışa bağlamıştır (159). Ayrıca birçok araştırmacı testiküler volüm azalmasından kasıtın seminifer tubül elemanlarının kaybı ve tubül çapında azalma olduğunu ileri sürmüşlerdir (30).

Çalışmamızda da varikozel modeli oluşturulmasından başlayarak 8 hafta MPFF verilen grup ile varikozel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen grubun bilateral testis ağırlığındaki artışı, ileride bahsedeceğimiz gibi

seminifer tubül üzerine olan olumlu etkisine (Johnsen skorunda artış) ve apoptozisi azaltmasına bağlamak (apoptotik indekste düşme) mümkündür. Ayrıca varikosele bağlı internal spermatik vende gelişen hidrostatik basınç artışı, testiküler kapiller ve vasküler geçirgenlikte artışa yol açarak testiküler interstisyel sıvı oluşumunda değişikliğe neden olmaktadır (29). Yapılan bazı çalışmalarda, deneysel varikozel oluşumundan sonra, 30 gün içinde interstisyel sıvı oluşumunda artış olduğu gösterilmiştir. Seminifer tübülü ve interstisyel dokudaki hücreleri saran bu sıvı testis volümünde artışa neden olmaktadır (31). Varikozel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen gruptaki testis ağırlığı artışının daha az olması, MPFF'nin kısa dönem (4 hafta) kullanımının volüm kaybını önlemede etkisinin yeterli olmadığı şeklinde yorumlanabileceği gibi antiinflamatuvar etki ile interstisyel sıvı oluşumunda azalmaya yol açarak erken dönemde testis volümündeki artışı sınırlandırmış olabilir şeklinde de yorumlanabilir.

Yaptığımız çalışma göstermiştir ki varikozektomi tedavisi, varikozel modelinde bilateral testis volümlerini kontrol grubuna yaklaştırmakta hatta aynı seviyeye getirmektedir ve uzun dönem (8 hafta) MPFF tedavisi de varikozektomi kadar etkin bir tedavi yöntemidir.

Varikozelin vasküler bir olay olmasından dolayı, patofizyolojisinin aydınlatılmasında vasküler yapıya yönelik birçok çalışmanın yapılmasına yol açmıştır. Biz de bu çalışmada varikozelin, varikozektominin ve diosmin-hesperidinin her iki testisteki doku mikrovasküler kan akımları üzerine olan etkilerini araştırdık.

Çalışmamızda varikozel oluşturulan grubun sol testis mikrovasküler kan akımının diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu saptandı ($P<0,05$). Varikozektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grup ile varikozektomi yapılan grubun mikrovasküler kan akımı ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmedi ($P>0,05$). Her iki grubun da mikrovasküler kan akımı varikozel oluşturulan gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($P<0,05$).

Her iki testis mikrovasküler kan akımı ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ve birbirleri ile paralellik gösterdi ($P<0,05$).

Bütün gruptaki sağ ve sol testiküler mikrovasküler kan akımları literatürle uyumlu olarak yaklaşık birbiri ile aynı idi ve bu da sol varikoselde her iki testisin etkilendiğini göstermesi açısından önemli bir bulgudur (7).

Deneysel hayvan çalışmalarında, varikosel ve testiküler kan akımı değişiklikleri konusunda çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Son dönemde deneysel varikosel oluşturulmuş çeşitli hayvan modellerinde testiküler kanlanmada artış ve buna bağlı testiküler ısı artışı gösterilmiştir (6,7). Turner ve arkadaşları tek taraflı varikosel varlığında her iki testiste de aynı oranda kan akımı artışını göstermişlerdir (7). Ayrıca Saypol ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, deneysel olarak oluşturulan varikoselin testiküler kan akımında artışa neden olurken erken cerrahi onarımı takiben bu artışın normal düzeylere indiği gösterilmiştir (6). Snyder ve Cameron tavşanlar ve köpekler üzerinde yaptığı çalışmada deneysel olarak oluşturulan varikoselin her iki testiküler kan akımında artışa ve ısı artışına yol açtığını bildirmişlerdir (190). Saypol, Green, Hurt ve arkadaşlarının birbirinden ayrı olarak yaptıkları çalışmalarda bu kan akımı ve ısı artışının testiste spermatogenezini azalttığını bildirmişlerdir (6,40,191). Goldstein ve Eid ise varikoselli insanlarda yaptıkları çalışmalarda testiküler ısı artışını doğrulamışlardır (192). Ayrıca Mellinger ve Ross'un renkli doppler ile yaptığı bir çalışmada varikoselli insanların testisinde kan akımındaki artışı göstermişlerdir (193,194).

Bu bulguların tam aksine, varikoselin testiküler kan akımında azalmaya yol açtığını bildiren çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. Li ve arkadaşları, sol renal venin parsiyel ligasyonu ile oluşturdukları deneysel varikosel modelinde kan akımının azaldığını göstermişlerdir ve bunun da bozulmuş Sertoli hücre fonksiyonunun göstergesi olduğunu savunmuşlardır (27). Bu farklı sonuçların nedeni olarak, oluşturulan modelin süresi veya ölçüm yöntemindeki farklılıklar bildirilmektedir.

Varikosektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grup ile varikosektomi yapılan grubun her iki testis mikrovasküler kan akımı ölçüm değerlerinin kontrol grubuna yakın değerler olması diğer çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (6,7,40,191,193,194).

Ayrıca, yaptığımız çalışmada varikosel modeli oluşturulmasından başlayarak 8 hafta MPFF verilen grubun sol testis mikrovasküler kan akımı ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmezken varikosel oluşturulan gruptan ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü. Varikosel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen grubun sol testis mikrovasküler kan akımı kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldi ve varikosel oluşturulan gruptan ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü.

Literatürde MPFF veya benzeri venoaktif ilaçlarla yapılan deneysel varikosel modelinde testiküler mikrovasküler kan akım ölçümlerine rastlanmadı.

Flavonoidler variköz venlerdeki mikrosirkülasyonu düzenleyerek kapiller permeabiliteyi azaltmakta ve ödemi düzelterek semptomların iyileşmesini sağlamaktadır (159). Ayrıca, venöz tonusun normal halde tutulması, artmış lenfatik drenaj, kan viskozitesi üzerine olumlu etkileriyle mikrosirkülasyonun korunması, inflamatuvar reaksiyonların inhibisyonu, azalmış kapiller geçirgenlik gibi etki mekanizmalarına sahiptir (169-172). Diosmin-hesperidin de dahil olduğu flavonoidler, lökosit aktivasyonu, migrasyonu ve adezyon inhibitörleri olan prostaglandin E2 (PGE2) ve tromboksan A2 (TXA2)'in güçlü inhibitörleri olup endotelial adezyon moleküllerinin plazma düzeylerinde ve nötrofil aktivasyonunda anlamlı bir azalmaya neden olarak mikrosirkülasyon hasarına karşı koruma sağlar (173,174).

Deneysel hayvan çalışmalarında ve insanlarda yapılan birçok çalışmada MPFF'nin mikrosirkülasyon üzerine etkisi araştırılmıştır. Le Devehat ve arkadaşlarının kronik venöz hastalarda yaptığı çalışmada, MPFF tedavisinin mikrosirkülasyon üzerine olumlu etkisi olduğunu göstermişlerdir (180). Bouskela ve arkadaşları iskemi-reperfüzyon modelinde yaptıkları bir çalışmada, MPFF tedavisinin arteriöl ve venül çapı ile bu damarlardaki kan akımını etkilemediklerini ama endotelial adezyon moleküllerinin plazma düzeylerinde, nötrofil aktivasyonunda ve mikrovasküler permeabilitede azalmaya yol açtıklarını bildirmişlerdir (195). Potter ve arkadaşları ise aynı model üzerinde yaptıkları çalışmada iskemiye bağlı dokuda hipotermi olduğu zaman MPFF'nin etkisi ile

arteriöl ve venöl çapı ile bu damarlardaki kan akımında bariz artış olduğunu bildirmişlerdir (196).

Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu mikrovasküler kan akımının azaldığı dokularda gerçekleştirilmiştir (175,176,177,178,195,196). MPFF, mikrovasküler kan akımının azaldığı dokularda oluşabilecek hasarı engellemek için ve azalan doku mikrosirkülasyonu düzenlemeye yönelik olarak mikrovasküler kan akımında artışa neden olmaktadır. Doku mikrovasküler kan akımının arttığı durumlarda MPFF'nin etkisi net olarak bilinmemektedir. MPFF'nin varikösel modeli oluşturulan ratlarda her iki testis doku mikrovasküler kan akımını azaltması, dokuda mikrosirkülasyonun korunmasına ve düzenlenmesine yönelik gösterdiği olumlu etki ile açıklanabilir.

Yaptığımız alışma sonucu; varikosektomi tedavisi, varikösel modelinde bilateral testiküler mikrovasküler kan akımlarını kontrol grubuna yaklaştırmakta hatta aynı seviyeye getirmektedir ve uzun dönem MPFF tedavisi de varikosektomi kadar etkin bir tedavi yöntemidir. Varikösel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen grubun sol testis mikrovasküler kan akımının varikösel oluşturulan gruptan anlamlı düşük olması ve kontrol grubundan ise anlamlı yüksek olması ilacın kısa dönem kullanımında yeterli etkiyi göstermediğini ve daha uzun süreli kullanıma gereksinim olduğunu göstermektedir.

Variköselde bilateral mikrovasküler kan akımında artış ve buna bağlı testiküler ısı artışı gösterilmiştir (6,7). Bu ısı artışının da, variköselde serbest oksijen radikallerini artırdığı ve testiküler hasara yol açtığı ileri sürülmüştür (8). Variköseli olan fertil veya infertil erkeklerin semen örneklerinin değerlendirilmesinde, variköseli olanlarda olmayanlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda ROS bulunduğu bildirilmiştir (9). Ek olarak yine, variköseli olan hastaların testis biyopsileri değerlendirildiğinde, variköseli olmayanlara göre ROS ile tetiklenen lipid peroksidasyonunun indirekt bir belirteci olan malondialdehit konsantrasyonları anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu durum, varikösel patofizyolojisi için potansiyel mekanizmada ROS'un katkısını desteklemektedir (197). Ayrıca variköseli infertil grupta yüksek olan serbest oksijen radikali üretimi, varikosektomi sonrası variköseli olmayan fertil grup seviyesine inmektedir (198). İnfertil hastalarda seminal oksidatif stres bulgularının varlığı infertilite patolojisinde

oksidan sistemin rolünün bir göstergesi olabilir ve dolayısı ile bu hasta grubunda infertilite tedavisinde seçilecek olan medikal ya da cerrahi yöntemlerdeki amaç, oksidatif stresin azaltılması olmalıdır.

Bu çalışmada gruplar arası incelenen parametrelerden biri de doku hasarının biyokimyasal olarak incelemesinde kullanılan ve lipit peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleridir.

Gruplar arasında sol testis doku MDA düzeyleri incelendiğinde kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$). Varikozel oluşturulan grubun sol doku MDA düzeyi diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Varikosektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grubun sol testis doku MDA düzeyi ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edilmezken varikozel oluşturulan gruptan ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü. Varikosektomi yapılan grubun sol testis doku MDA düzeyi varikozel oluşturulan gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($P<0,05$). Varikosektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grubun sol testis doku MDA düzeyi varikosektomi yapılan gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşüktü ($p=0,012$). Bu iki grupta sol testis doku MDA düzeyi varikozel oluşturulan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük saptanması literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir (198). Varikosektomi uygulamasını takiben MPFF verilen gruptaki sol testis doku MDA düzeyindeki düşüşün varikosektomi uygulanan gruptan daha fazla olması MPFF'nin olumlu etkisine bağlanabilir.

Literatürde, Diosmin-hesperidinin varikozel üzerine antioksidan etkisi hakkında klinik veya eksperimental çalışmalara rastlanmadı. Ama, yapılan birçok çalışmada, MPFF'nin çeşitli dokularda antioksidan özelliği olduğu ve doku MDA düzeyini kontrol grubu düzeyine kadar düşürdüğü gösterilmiştir (168,199,200).

Yaptığımız çalışmada da varikozel modeli oluşturulmasından başlayarak 8 hafta MPFF verilen ve varikozel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen gruplardaki sol testis doku MDA düzeylerinde varikozel oluşturulan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı azalma olması, varikozelin rat testisi üzerine olumsuz etkisine karşı MPFF'nin koruyucu rolünü göstermesi açısından dikkate

değer bulunmuştur. Varikosel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen gruptaki azalma anlamlı olmasına karşın diğer tedavi gruplarından istatistiksel olarak yüksekti. Bu da MPFF'nin kısa dönem kullanımında, antioksidan özelliğinin yeterli düzeyde ortaya çıkmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Ayrıca varikosel modeli oluşturulan ratların sağ ve sol testiküler doku MDA düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,310$).

Deneysel varikosel modelinde yapılan birçok çalışmada varikoselin bilateral testiste serbest oksijen radikallerini artırdığı ve testiküler hasara yol açtığı gösterilmiştir (8,80,197). Çalışmamızda da varikoselin her iki testis doku MDA düzeylerini artırdığı ve bunun da sol varikoselin bilateral testis üzerine etkisi olduğunu göstermektedir.

Çalışmamız sonucunda sol varikoselin her iki testiküler doku MDA düzeylerini artırdığı, varikosektominin bilateral doku MDA konsantrasyonlarını düşürdüğü, MPFF'nin de uzun dönem kullanımda varikosektomi kadar etkin olduğu ve varikosektomiye ek olarak uygulanan MPFF tedavisinin doku MDA düzeylerini düşürmede en etkili tedavi olduğu gözlenmiştir.

Son dönemde deneysel varikosel oluşturulmuş çeşitli hayvan modellerinde testiküler kanlanmada artış ve buna bağlı testiküler ısı artışı gösterilmiştir (6,7). Socher ve arkadaşları yaptıkları çalışmada testiküler ısı artışının germ hücrelerinde apoptozisi artırdığını göstermişlerdir (201). Günümüze kadar varikosel fizyopatolojisinde en önemli teoriyi oluşturan ısı artışının germ hücre apoptozisini artırdığını gösteren çalışmalar arttıkça varikosel ve apoptozis ilişkisi daha yakından araştırılmaya başlanmıştır.

Apoptozis vücudumuzda birçok dokuda düzenleyici rolü olan fizyolojik bir olaydır. Normal spermatogenezin gerçekleşebilmesi için de belli bir oranda gereklidir. Kerr ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptozis gerçekleştiği ve bu apoptozis sayesinde de germ hücre sayı ve kalitesinin düzenlendiği bildirilmiştir (94).

Lin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada idiyopatik testiküler yetmezliği olan infertil erkeklerin testis biyopsilerinde germ hücre apoptozisinde artış saptamışlar ve bu artışın testiküler fonksiyon bozukluğu ve infertiliteye neden olabileceğini ileri

sürmüşlerdir (117). Bacetti ve arkadaşları varikoselli hastaların ejakulatlarındaki apoptotik sperm hücre sayısını değerlendirdikleri bir çalışmada, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yaklaşık yüz kat yüksek bulunması, varikosele bağlı infertilitede apoptozisin kritik rolü olduğunu düşündürmektedir (202). Yılmaz ve arkadaşları deneysel varikosele modelinde, varikosele oluşumunu takip eden 14. günde germ hücrelerinde oluşan apoptozisin kontrol grubuna oranla 2 kat arttığını, 28. günde ise maksimum seviyeye ulaştığını ve varikoselektomi operasyonu sonrası germ hücre apoptozisinde azalma olduğu, ortalama apoptotik indekslerin kontrol grubuna yaklaştığını ve her iki testiste birbirleri ile korele artış ve azalış gösterdiklerini bildirmişlerdir (120). Varikoselede apoptotik hücrelerin azaldığını iddia eden tek çalışma Fujisawa ve arkadaşlarına aittir. Subfertil varikoselli erkeklerden aldıkları testis biyopsilerini sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırmış ve varikoselli grupta daha düşük sayıda apoptotik germ hücresi belirlemişlerdir (121). Yapılan birçok çalışmada da deneysel varikosele oluşturulmuş ratlarda, kontrol grubuna göre belirgin olarak germ hücrelerinde apoptozisin arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmalarda testiküler süperoksit seviyelerinin de varikoselede yükseldiği, süperoksit seviyelerini azaltan E vitamini, melatonin gibi birtakım maddelerin testislerdeki germ hücre apoptozisini azalttığı görülmüştür (80).

MPFF'nin bilinen bir etkisi de apoptozis regülasyonu üzerinedir (168,176,203). Bu çalışmalardan en dikkate değer Pascerella ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmadır. Pascerella ve arkadaşları venöz hipertansiyon modeli için oluşturdukları arterio-venöz fistülde ortalama apoptotik indeksin arttığını ve MPFF tedavisi ile bu oranın doz bağımlı olarak azaldığını bildirmişlerdir (203).

Yaptığımız çalışmada da deneysel varikosele oluşturulmuş ratlarda 'Caspase-3' yardımıyla germ hücre apoptozisi ve HE boyama ile Johnsen skoru değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda ortalama apoptotik indeks $0,172 \pm 0,011$ iken bu oran deneysel olarak varikosele oluşturulmuş grupta artmış olup $0,491 \pm 0,019$ 'e yükselmiştir. Varikosele grubunda germ hücre apoptozisindeki bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). Varikoselektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grupta ise ortalama apoptotik indeks $0,184 \pm 0,011$ olarak saptandı ve ortalama apoptotik indeksteki bu azalma varikosele grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p = 0,001$). Ayrıca kontrol grubu ile aralarında

istatistiksel olarak anlamlı farklılık da saptanmadı ($P>0,05$). Varikoselektomi uygulanan grupta ise ortalama apoptotik indeks $0,195\pm 0,019$ olarak saptandı. Varikoselektomi grubunda ortalama apoptotik indeksteki bu azalma varikozel grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,002$). Varikoselektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grup ile varikoselektomi uygulanan grup arasında, sol testis apoptotik indekste istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($P>0,05$). Varikoselektomi uygulanan grupta sağ testis apoptotik indeksi, varikoselektomi uygulamasını takiben MPFF verilen gruptan istatistiksel olarak daha yüksekti ($p=0,003$).

Yaptığımız çalışmada ayrıca varikozel modeli oluşturulmasından başlayarak 8 hafta MPFF verilen ve varikozel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen gruplardaki sol testis ortalama apoptotik indekslerindeki azalma varikozel oluşturulan gruba göre istatistiksel olarak anlamlıydı. Varikozel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen grubun sol testis ortalama apoptotik indeksi varikozel modeli oluşturulmasından başlayarak 8 hafta MPFF verilen grubunkinden istatistiksel olarak daha yüksekti ($p=0,001$).

Bu çalışmamızda sağ ve sol testisteki apoptotik germ hücre düzeylerinin tüm gruplarda beraber yükselip azaldığını tespit ederek tek taraflı varikozelde her iki testisin de etkilendiğini moleküler düzeyde de göstermiş olduk. Ayrıca, varikozelde germ hücre apoptozisinin bilateral testiküler dokuda arttığını ve varikoselektomi sonrası apoptoziste gerileme olduğunu göstermektedir. MPFF'nin uzun dönem kullanımının apoptozisi engellemede varikoselektomi kadar etkin bir tedavi olduğunu, kısa dönem kullanımının da apoptozisi azaltmada faydalı bir tedavi seçeneği olduğu kanısına varılmıştır.

Johnsen skoru değerlendirildiğinde ise varikozel oluşturulan grupta kontrol grubuna oranla düşük skorlar elde edilirken aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$). Diğer tedavi gruplarında ortalama Johnsen skorunda varikozel oluşturulan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlendi ($p<0,05$). Sağ testis ortalama Johnsen skoru tüm gruplarda sol ile paralellik göstermekteydi. Sağ testisteki ortalama Johnsen skoru sol testise göre daha yüksek bulundu ve aradaki fark istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p<0,05$).

Son yıllarda varikoselin tedavisi ile ilgili araştırmalar oldukça artmakta ve dikkatler moleküler düzeyde yapılan çalışmalara çekilmektedir. Literatürde deneysel varikosel modelinde matriks metalloproteinazlar (MMPs) ve matriks metalloproteinaz doku inhibitörleri (TIMP) ile yapılan çalışmalara rastlanmadı.

Bu çalışmada, moleküler düzeyde değerlendirdiğimiz parametrelerden MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerine bakıldı. Çalışmamız sonucunda varikosel oluşturulan grubun doku MMP-2 ve MMP-9 düzeyi tüm diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde dūřüktü ($p<0,01$). Varikoselektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grubun, varikoselektomi yapılan grubun ve varikosel modeli oluşturulmasından başlayarak 8 hafta MPFF verilen grubun sol testis doku MMP-2 ve MMP-9 düzeyleri kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,01$). Varikosel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen grubun doku MMP-2 düzeyleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($P=0,205$). Ayrıca bu grubun doku MMP-9 düzeyi kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde dūřüktü ($P=0,008$). Varikoselektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grubun doku MMP-2 ve MMP-9 düzeyi varikoselektomi yapılan gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$). Varikosel oluşturulan grubun doku TIMP-1 düzeyi diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,000$). Kalan diğer grupların doku TIMP-1 düzeyi ise kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Varikoselektomi uygulamasını takiben MPFF verilen grubun doku MMP- 2 düzeyi ile varikosel modeli oluşturulmasından başlayarak 8 hafta MPFF verilen grubun doku MMP-9 düzeyi diğer gruplardan belirgin olarak artmış tespit edildi.

Siu M.K.Y ve Cheng C.Y testis hücre kültüründe, ratlarda geri dönüşümlü infertiliteye yol açan AF-2364 molekülün MMP-2, MMP-9 ve TIMP-2 üzerine etkilerini incelemişlerdir. AF-2364, sertoli ve germ hücreleri arasındaki bağlantıları kopararak ve semineferöz epitelden germ hücre kaybına yol açarak etkili erkek kontrasepsiyonuna yol açmaktadır. Çalışmada adult ratlara gavaj yoluyla 50 mg/kg tek doz AF-2364 uygulama sonucu, 1-8. saatler arasında aktif MMP-2, aktif MT1-MMP ve TIMP-2 seviyesinde artış tespit edildiğini, bu zaman diliminin uzamış

spermatidlerin epitelyumdan dökülmeye başladığı zamana denk geldiğini ve immünohistokimyasal olarak da matür spermatidlerin lümeneye dökülmeye başladığı evre 7-8 de, MMP-2, MT1-MMP ve TIMP-2'nin tubül lümeninin apikal kompartımanında lokalize olduğunu bildirmişlerdir. Aktif MMP-2 ve aktif MT1-MMP seviyesinin 8. saatten sonra düşmeye başladığı ve 2 ila 15. günlerde MMP-2'nin kaybolduğunu ve bunu da AF-2364 uygulanmasından itibaren 1. ve 15. günler arasında inhibitörleri olan TIMP-2 indüksiyonuna bağlanmışlardır. Bu değişikliklerin uzamış spermatidlerin epitelyumdan tamamen döküldüğü zamana denk geldiğini ve bunu round spermatidlerin ve spermatozoidlerin kaybının izlediğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, adult rat testisinde testiküler ve germ hücre maturasyonunda MMP-2 seviyesinde büyük oranda artış olduğu kanaatine varmışlardır (204). Robinson ve arkadaşları fetüs testis hücre kültüründe MMP-1, MMP-2, MMP-9 ve diğer tüm TIMP'lerin interstisyum ve değişik seviyelerde seminifer tubüllerde bulunduğunu bildirmişlerdir (205). Juliette Longin ve arkadaşları testis hücre kültüründe sertoli hücrelerinde MMP-2, TIMP-2 ve MT1-MMP ekspresyonunun olduğunu ve FSH etkisi ile bu ekspresyonun arttığını göstermişlerdir. Ayrıca germ hücre kontrolünün sertoli hücrelerindeki MMP-2 aktivasyonuna bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Sertoli hücrelerinden salınan MMP-2'nin, spermatogenez aşamasında, germ hücrelerinin tubül lümenine hareketini sağladığını ve bu germ hücrelerinin de MMP-9'u aktive ettiklerini öngörmüşlerdir (206).

Deneysel varikozel modeli oluşturduğumuz ratlarda, varikozel oluşturulan grubun sol testis doku MMP-2, MMP-9 düzeylerinin azalması ve yüksek TIMP-1 düzeyleri, spermatogenezin azaldığını, hatta durduğunu, maturasyon arresti ve prematür ve anormal yapıda germ hücrelerinin büyük çoğunluğunun tubül lümenine dökülmüş olabileceği (Resim-6-13) şeklinde yorumlanabilir.

Yaptığımız çalışmada da varikoselektomi uygulanan ve MPFF verilen grup ile varikozel oluşturulmasından 4 hafta sonra yalnızca varikoselektomi yapılan grubun doku MMP-2 ve MMP-9 seviyelerindeki artışı spermatogenez üzerine olumlu etkisine bağlamak yerinde olacaktır. Varikoselektomiye ilaveten MPFF verilen gruptaki artışın daha fazla olmasını da MPFF'nin spermatogenez üzerine olumlu etkisi olabileceği şeklinde yorumlanabilir.

Yaptığımız çalışmada varikozel oluşturulmasından başlayarak 8 hafta MPFF verilen grupta MMP-2 ve özellikle MMP-9 seviyelerindeki artışı, yine MPFF'nin spermatogenez üzerine olumlu etkide bulunduğu şeklinde yorumlanabilir. Varikozel modeli oluşturulmasından 4 hafta sonra başlayarak MPFF verilen gruptaki doku MMP-2 seviyesinin kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmaması ve MMP-9 seviyesinin kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı düşük olması MPFF'nin spermatogenez üzerine olumlu etkisinde ve testiküler hasarı geri döndürebilmesinde yetersiz olduğu veya bu etkileri belirleyebilmek için daha uzun süreli kullanıma ihtiyaç olduğu kanısındayız.

TIMP-1, Mt-1-MMP ve MMP-2 dışındaki bütün aktive kollajenazları özellikle de MMP-9'u inhibe edebilir (144,146). TIMP'lerin orta seviyede MMP'leri aktive ederken yüksek düzeyde inhibe ettikleri bildirilmiştir (206). Varikozel grubunda yüksek seviyede tespit edilmesi MMP-9'daki azalmayı açıklayabilir ve diğer grublardaki orta seviyede artışları da MMP-9'u aktive ettikleri şeklinde yorumlanabilir.

6. SONUÇ

Bu çalışma sonucunda deneysel varikozel oluşturulmuş ratların her iki testisinde mikrovasküler kan akımının arttığı saptanmıştır. Bu artışa paralel olarak yine her iki testiste oksidatif stresin göstergesi olan MDA düzeyinde de artış gözlenmiştir. Ayrıca deneysel varikozel oluşturulmuş bu ratların solda daha fazla olmak üzere her iki testis ağırlığında azalma gözlenmiştir. Bu ratların testis histopatolojilerine baktığımız zaman Johnsen skoru bilateral azalırken apoptotik indekslerinde ise bilateral artış gözlenmiştir. Bu çalışmada deneysel varikozel oluşturulmuş ratlarda moleküler olarak apoptozisten başka MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 seviyelerine de bakılmıştır ve bu ratlarda MMP-2 ve MMP-9 seviyeleri normal düzeyin altına düşerken TIMP-1 seviyesi ise normalin çok üzerine çıkmıştır.

Bu çalışmamız, deneysel varikozel modelinde sol varikozelin bilateral testis hacminde azalmaya yol açtığını, varikosektomi tedavisinin bilateral testis volümlerini kontrol grubuna yaklaştırdığını hatta aynı seviyeye getirdiğini ve uzun dönem MPFF tedavisi de varikosektomi kadar etkin bir tedavi yöntemi olduğunu göstermiştir. Ayrıca sol varikozelin her iki testiküler doku mikrovasküler kan akımını artırmakta ve varikosektomi tedavisinin bilateral testiküler mikrovasküler kan akımlarını kontrol grubu ile aynı seviyeye getirmektedir ve uzun dönem MPFF tedavisi de varikosektomi kadar etkin bir tedavi yöntemidir. Bununla beraber sol varikozelin heriki testiküler doku MDA düzeylerini artırdığı, varikosektominin bilateral doku MDA konsantrasyonlarını düşürdüğü, MPFF'nin de uzun dönem kullanımda varikosektomi kadar etkin olduğu ve varikosektomiye ek olarak uygulanan MPFF tedavisinin doku MDA konsantrasyonunu azaltmada en etkili tedavi olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmamızda sağ ve sol testisteki apoptotik germ hücre düzeylerinin tüm gruplarda beraber yükselip azaldığını tespit ederek tek taraflı varikozelde her iki testisin de etkilendiğini moleküler düzeyde göstermekle beraber, varikozelde germ hücre apoptozisinin bilateral testiküler dokuda arttığını ve varikosektomi sonrası apoptoziste gerileme olduğu tespit edilmiştir. MPFF'nin uzun dönem kullanımının apoptozisi engellemede varikosektomi kadar etkin bir tedavi olduğunu, kısa dönem

kullanımının da apoptozisi azaltmada faydalı bir tedavi seçeneği olduğu kanısına varılmıştır.

Johnsen skoru değerlendirildiğinde ise varikozel oluşturulan grupta bilateral azalma olduğu ve varikoselektomiye takiben skorlarda artış gözlendiği, MPFF tedavisinin de etkili bir yöntem olmakla beraber uzun dönem kullanımının daha başarılı olduğu tespit edildi. Ayrıca deneysel varikozel modeli oluşturulan ratlarda, varikozelin sol testis doku MMP-2, MMP-9 düzeylerin azalttığı ve TIMP-1 düzeylerini artırdığı, varikoselektomi ve MPFF uzun dönem tedavisinin MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinde artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmamızdan çıkan sonuçlar beraber değerlendirildiği zaman, varikozel tedavisinde, varikoselektominin etkinliği bir kez daha gösterilmiş olup özellikle uzun dönem MPFF kullanımının tek başına ya da varikoselektomi ile birlikte varikozele bağlı gelişen testiküler hasarın önlenmesinde iyi bir tedavi seçeneği olabileceği yönünde olumlu izlenimler elde edilmiştir. Bununla birlikte moleküler düzeyde özellikle MMP'ler ve inhibitörlerinin varikozel ve infertilitedeki rollerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha kapsamlı deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

ÖZET

Deneysel Sıçan Varikosel Modelinde Varikoselin Oluşturduğu Testiküler Hasar Üzerine Diosmin-Hesperidinin Etkileri

Varikosel erkek infertilitesinin en sık görülen ve önemli düzeltilebilir bir patolojisidir. İnfertilite nedeniyle başvuranların ortalama %30-40'ında varikosel saptanmaktadır. Patofizyolojisinde, değişen testiküler kan akımı, testis-interstisyel sıvı ilişkisi, hipertermi, ikincil venöz basınç artışı, renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu, oksidatif stres ve apoptoz yer almaktadır. Özellikle reaktif oksijen radikallerinin testis hasarına yol açtıkları gösterilmiştir. Bu çalışmadaki amaç varikosel modelinde MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 düzeylerini saptayarak varikosel ile arasındaki ilişkiyi açıklamak ve varikoselektominin ve diosmin-hesperidinin, testiste varikosele bağlı olarak meydana gelebilecek patolojileri önlemedeki etkilerini araştırmaktır.

Çalışmaya 66 adet adolesan (6 haftalık) Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan alındı ve 7 grup olarak randomize edildi. Birinci gruba hiçbir işlem yapılmadı ve kontrol grubu olarak değerlendirildi. İkinci gruptaki hayvanlara sham operasyonu uygulandı. Üçüncü gruptakilere renal ven parsiyel ligasyonu sağlanarak varikosel modeli oluşturuldu ve hiçbir tedavi verilmedi. Dördüncü grupta yer alan hayvanlara varikosel oluşturuldu ve 4 hafta sonra varikoselektomi yapılarak diosmin-hesperidin verildi. Beşinci gruptaki hayvanlara varikosel oluşturulup 8 hafta diosmin-hesperidin verildi. Altıncı gruptaki hayvanlara varikosel oluşturulduktan 4 hafta sonra diosmin-hesperidin verildi. Yedinci gruptaki hayvanlara ise varikosel oluşturulduktan 4 hafta sonra varikoselektomi yapıldı. Sakrifikasyon işlemi varikosel oluşturma prosedüründen 8 hafta sonra gerçekleştirildi. Sakrifikasyondan önce tüm hayvanların bilateral testiküler mikrovasküler kan akımları PeriFlux System 5000 ile ölçüldü. İşlem sonrası bilateral orşiektomi yapılarak testis dokuları tartılıp enine iki eşit parçaya ayrılarak histopatolojik ve biyokimyasal inceleme için hazırlandı. Tüm testisler HE boyama ile Johnsen skorları açısından değerlendirildi. Apoptozis değerlendirilmesi için "Caspase 3" kullanıldı. Biyokimyasal olarak her iki testis dokusunda MDA, sol testis dokusunda MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 ölçümleri gerçekleştirildi.

Sonuç olarak varikosel oluşturulan testislerin ağırlıkları belirgin olarak azalmış ve bu testislerde semifer tübül hasarı belirgin olarak artmıştır. Bilateral testiküler kan akımları varikosel oluşturulan grupta belirgin olarak artmıştır. Biyokimyasal analizler de oksidatif stres artışını ortaya koymuştur. ELİSA analizleri sonucunda; MMP-2 ve MMP-9 düzeylerinin varikosel grubunda anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir. TIMP-1'in ise arttığı gözlenmiştir. Bunlara ek olarak, varikoselli testislerde apoptotik germ hücre sayısı belirgin olarak artmıştır. Grup 4,5,7'de bilateral doku MDA düzeyleri, testiküler kan akımları varikosel modeline göre anlamlı olarak azalmış bulundu ($p < 0,05$). Ayrıca bu gruplarda doku MMP-2, MMP-9 düzeyleride kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmış bulundu. Grup 4,5,7'de, varikosel grubu ile karşılaştırıldığında Johnsen skoru açısından anlamlı artış saptanırken, her üç grupta da varikosel grubuna oranla apoptotik indeks anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur.

Bu bulgular varikoselin testiste kan akımını ve MDA düzeyini artırdığını ve spermatogenezi etkilediğini, ortalama Johnsen skorlarında düşmeye ve apoptotik indekste artışa neden olduğunu göstermektedir. Varikozel sonucu gelişen testis hasarının önlenmesinde diosmin- hesperidin olumlu etkisi gözlenmiştir.

Anahtar sözcükler: Apoptozis, diosmin-hesperidin, metalloproteinazlar, rat, varikozel

SUMMARY

The Effects of Diosmin-Hesperidin on Testicular Damage Induced by Varicocele in an Experimental Rat Varicocele Model.

Varicocele is most commonly seen recoverable cause of infertility. Varicocele is determined about 30, 40 % rates of the men who apply with the complaint of infertility. Testicular blood flow changes, testes-interstitial liquid relation, hyperthermia, secondary venous pressure increase, renal-adrenal reflux, hormonal disfunction, autoimmunity, acrosome relation, oxidative stress and apoptosis have been taken place in its pathophysiology. Especially it is predicted that reactive oxygen species gave rise to the testicular damage. We sought to determine the temporal profile of MMP and TIMP-1 levels in animal models of varicocele and to investigate its relationship with varicocele. Additionally the aim of this study is to evaluate the efficacy of varicocelectomy and diosmin-hesperidin into the testis in a varicocele induced rat model.

The study included 66 adolescent (6 weeks) male Spraque-Dawley rats, and the rats were divided into seven groups. The first and second group was control and sham group respectively. In the third group, varicocele group, was created by partial ligation of left renal vein. Left varicocele was performed in the fourth group firstly, 4 weeks after the operation varicocelectomy was performed and diosmin-hesperidin was given for 4 weeks. In group 5 varicocele was performed firstly and diosmin-hesperidin was given for 8 weeks. In group 6 varicocele was performed and 4 weeks after diosmin- hesperidin was given. In group 7 varicocele was performed and 4 weeks after the procedure all rats underwent varicocelectomy. Scarification was performed 8 weeks after varicocele procedure. Testicular blood flow determined using PeriFlux System 5000 before the sacrifice. Bilateral testicles were harvested, measured and sectioned into two equal parts after the end of experimental rat model. Johnsen score was determined by histological examination on each testicle of the rats. Apoptosis was assessed by Caspase-3 and MDA levels in bilateral testicular tissues, MMP-2, MMP-9 and TIMP-1 determined in left testicular tissues of all groups were biochemically measured.

The tissue weights of varicocele induced testes decreased significantly, whereas, tubule degeneration was significant in these testes. Bilateral testicular blood flow in varicocele group was significantly higher than all groups. Biochemically analyses have confirmed increased oxidative stress in varicocele groups. ELISA analysis have confirmed that MMP-2 and MMP-9 levels increased, TIMP-1 level decreased significantly in this group. Moreover, the ratio of apoptotic germ cells in varicocele groups were significantly higher when compared to all groups. The levels of MDA and testicular blood flow was also found to be decreased bilaterally in group 4,5,7 when compared to varicocele group ($p < 0,05$). Additionally the levels of MMP-2, MMP-9 was found to be increased significantly in this group when compared to control group ($p < 0,05$). As compared with the varicocele group there was a significant decrease in apoptotic indexes in the group 4,5,7. However there was significant increased when compared to varicocele group according to Johnsen scores.

These findings suggest that varicocele model in rat causes increase testicular blood flow, MDA levels, apoptotic index and decreases Johnsen score, MMP-2 and MMP-9. Diosmin-hesperidin have a positive effect on recovery of testicular damage in experimental rat varicocele model.

Key words: Apoptosis, diosmin-hesperidin, metalloproteases, rat, varicocele

KAYNAKLAR

1. Raifer J. Varicocele. Congenital anomalies of the scrotum and testis. CAMPBELL'S UROLOGY. (Walsh P C, Retik A B, Vaughan E D, Wein A J, editors), Philadelphia, W.B. Saunders Company,1998: 2186-2195.
2. Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Behre HM. Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. Hum Reprod 1998; 13(8):2147-50.
3. Nagler HM, Luntz RK, Martinis FG: Varicocele. St. Louis. Mosby Year Book 1997: 336-359.
4. Varicocele and male infertility: Part II. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. Human Reproduction Update 2001; 7(5)5: 473 – 481.
5. Varikosel Kılavuzu, Türk Androloji Derneği Yayınları, 2004: 29-35.
6. Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED, Jr. Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. J Clin Invest 1981;68(1):39-45.
7. Turner TT. The study of varicocele through the use of animal models. Hum Rep Update 2001; 7(1): 78-84.
8. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stres. Biol Repr. 1999 61: 393-399.
9. Weese DL, Peaster ML, Kyle KH et al. Stimulated reactive oxygen species generation by the spermatozoa of infertile men. J Urol 1993; 149: 64-67.
10. Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. Br J Urol 2000; 86: 598-606.
11. Simsek F, Türkeri L, Cevik İ, Kamuran B, Akdas A. Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. Arch Esp Urol.1998; 51: 947-950.
12. Ahlberg NE, Bartley O. Right and left gonadal veins: Anatomical and statistical study . Acta Radiol Diag. 1966; 4: 596-601.
13. Kadioğlu A, Köksal T. Skrotum ve kapsamı hastalıkları. TEMEL ÜROLOJİ. (Anafarta K, Göğüs O, Arıkan N, Bedük Y, Editörler). Güneş Kitabevi, Ankara: 1998; 949-960.
14. Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP. Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. J Urol 1994;152(2 Pt 2):788-90.
15. Lipschultz LI, Corriere JN. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. J Urol 1977;117:175-180.
16. Grillo-Lopea AJ. Primary right varicocele, 1979;105:540-544.
17. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Varicocele and male infertility: Part II. Hum Rep Update 2001; 7(5): 473-481.
18. Kohler FP. On the etiology of varicocele. J Urol 1967; 97: 741-742.
19. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N et al. Phlebography in varicocele scroti (Abstract). Acta Radiol Diag 1966; 4: 517-528.

20. Coolsaet BLRA. The varicocele syndrome: venography determining the optimal level for surgical management. *J Urol* 1980; 124: 833-926.
21. Comhaire F, Kannen M, Nahourn C. Radiological anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. *Int J Androl* 1981; 4: 379-387.
22. Braedel HU, Steffens J, Ziegler M et al. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol* 1994; 151: 62-66.
23. Wishahi MM. Detailed anatomy of the internal spermatic vein and the ovarian vein. Human cadaver study and operative spermatic venography: clinical aspects. *J Urol* 1991;145(4):780-4.
24. Shafik A, Moftah A, Olfat S, Mohi-el-Din M, el-Sayed A. Testicular veins: anatomy and role in varicocelogenesis and other pathologic conditions. *Urology* 1990;35(2):175-82.
25. Beck EM, Schlegel PN, Goldstein M. Intraoperative varicocele anatomy: A macroscopic and microscopic study. *J Urol* 1992;148:1190-1195.
26. Francis X.S, Mark F.B: Varicocele. Abnormalities of the Testes and Scrotum and their Surgical. CAMPBELL'S UROLOGY. (Walsh P C, Retik A B, Vaughan E D, Wein A J, editors), Philadelphia, W.B. Saunders Company 1998.
27. Li H, Dubocq F, Jiang Y et al. Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology* 1999; 53: 1258- 1262.
28. Grasso LF, Pepe P, Panella P et al. Volocimetric evaluation of spermatic vessels with echo color Doppler in patients with idiopathic varicocele. *Minerva Urol Nefrol* 1997; 49: 179-182.
29. Kendirci M, Miroğlu C. Varikosel Patofizyolojisi: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi (Editörler: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B ve ark.). *Türk Androloji Derneği yayını, İstanbul, 2004; 427-439.*
30. Sharpe RM. Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 1984; 30(1): 29-49.
31. Salama N, Bergh A Damber JE. The changes in testicular vascular permeability during progression of the experimental varicocele. *Eur Urol* 2003; 43: 84-91.
32. Zorngiotti AW, MacLeod J. Studies in the temperature, human semen quality and varicocele. *Fertil Steril* 1973; 24: 295-301
33. Sigman M, Howards SS. Male Infertility. "CAMPBELL'S UROLOGY. (Walsh P C, Retik A B, Vaughan E D, Wein A J, editors), Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1, 43, 1998: 1287-1330.
34. Saypol DC. Varicocele. *J Androl.* 1981; 2: 61-67.
35. Lund L, Nielsen KT. Varicocele, testis and testicular temperature. *Br J Urol* 1996; 78: 113-115.
36. Dahl HV, Hendrick JF. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg Gynecol Obstet* 1959; 108: 697-705.
37. Salisz JA, Kass EJ, Steinert BW. The significance of elevated scrotal temperature in an adolescent with a varicocele. *Adv Exp Med Biol* 1991; 286: 245-251.
38. Wright EJ, Young GP, Goldstein M. Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology* 1997; 50: 257-259.

39. Lerchl A, Keck C, Spiteri-Grech J et al. Diurnal variations in scrotal temperature of normal men and patients with varicocele before and after treatment. *Int J Androl* 1993; 16: 195-200.
40. Green KF, Turner TT, Howard SS. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J Urol* 1984; 131: 1208-1211.
41. Shafik A, Wali MA, Abdel Azis YE et al. Experimental model of varicocele. *Eur Urol* 1989; 16: 298-303.
42. Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K et al. Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl* 1989; 22: 149-159.
43. Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O. Desoxyribonucleic acid polymerase activity in the testis of the infertile man with varicocele. *Fertil Steril* 1988; 50: 795-800.
44. Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C et al. Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *Am J Physiol* 1991; 260: 1581-1589.
45. Hsu HS, Chang LS, Chen MT et al. Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *Eur Urol* 1994; 25: 71-75.
46. Shafik A. Venous tension patterns in cord veins II after varicocele correction. *J Urol* 1983; 129: 749-751
47. Ito H, Fuse H, Minagawa H, Kawamura K, Murakami M, Shimazaki J. Internal Spermatic Vein Prostaglandins in Varicocele Patients. *Fertil Steril*. 1982; 37: 218-221
48. Yaman Ö, Özdiler E. Varikosele. *Klinik Androloji*. Ankara 2000:537-46.
49. Comhaire F, Vermeulen A. Varicocele sterility: cortisol and catecholamines. *Fertil Steril* 1974; 25: 88-95
50. Steeno O, Koumans J, De Moor P7. Adrenal cortical hormones in the spermatic vein of 95 patients with left varicocele. *Andrology* 1976; 8: 101-104
51. Rajfer J, Turner TT, Rivera F. Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. *Biol Reprod* 1987; Abstract 36: 933-937.
52. Turner TT, Lopez TJ: Testicular blood flow in peri-pubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to a unilateral lesion. *J Urol* 1990; 144: 1018-1021.
53. Çayan S, Kadioğlu A, Orhan I, Kandıralı E, Tefekli A, Tellaloglu S: The effect of microsurgical varicocelectomy on serum follicle stimulating hormone, testosterone and free testosterone levels in infertile men with varicocele. *BJU Int* 1999; 84(9): 1046-1049.
54. Hudson RW, Crawford VA, McKay DE. The gonadotropin response of men with varicoceles to a four-hour infusion of gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 1981; 36: 633-637.
55. Schiff I, Wilson E, Newton R et al. Serum luteinizing hormone, folliclestimulating hormone and testosterone responses to gonadotrophinreleasing factor in males with varicoceles. *Fertil Steril* 1976; 27: 1059-1061.
56. Jarrow JP and Sanzone JJ. Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol* 1992; 148: 1805-1807.
57. Turner TT, Jones CE and Roddy MS. Experimental varicocele does not affect the blood-testis barrier, epididymal electrolyte concentration or testicular blood gas concentration. *Biol Reprod* 1987; 36: 926-932.

58. Rogers BJ, Mygatt GG, Soderdahl DW et al: Monitoring of suspected infertile men with varicocele by the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1985; 44: 800-805.
59. Virgil P, Wohler C, Bustos-Obregon E et al. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* 1994; 26: 55-60.
60. Hans LCF, Laven JSE, Mail WPTM, te Velde ER, Wensing CJG. Testis volumes, semen quality, and hormonal patterns in adolescents with and without a varicocele. *Fertil Steril* 1991; 56: 731-6.
61. Kass EJ, Stork BR, Steinert BW. Varicocele in adolescence induces left and right testicular volume loss. *BJU Int.* 2001; 87: 499-501.
62. Thomas JC, Elder JS. Testicular growth arrest and adolescent varicocele: does varicocele size make a difference. *J Urol.* 2002; 168:1689-1691.
63. Akbay E, Çayan S, Doruk E, et al. The prevalence of varicocele and varicocele-related testicular atrophy in Turkish children and adolescents. *BJU Int.* 2000; 86:490-493.
64. Zini A, Buckspan M, Berardinucci D, et al. Loss of left testicular volume in men with clinical left varicocele: correlation with grade of varicocele. *Androl.* 1998; 41: 37-41.
65. Zini A, Buckspan M, Berardinucci D, et al. The influence of clinical and subclinical varicocele on testicular volume. *Fertil Steril.* 1997; 68: 671-674.
66. Ku JH, Son H, Kwak C, et al. Impact of varicocele on testicular volume in young men: significance of compensatory hypertrophy of contralateral testis. *J Urol.* 2002, 168:1541-1544.
67. Akcar N, Turgut N, Adapinar B, Ozkan IR. Intratesticular arterial resistance and testicular volume in infertile men with subclinical varicocele. *J Clin Ultrasound.* 2004;32: 389-393
68. Alukal JP, Zurakowski D, Atala A, et al. Testicular hypotrophy does not correlate with grade of adolescent varicocele. *J Urol.* 2005;174:2367-2370.
69. Paduch DA, Skoog SJ. Current management of adolescent varicocele. *Rev Urol* 2001; 3(3): 120-133.
70. Kim ED, Leibman BB, Grinblat DM et al. Varicocele repairs improves semen parameters in azoospermic men with spermatogenic failure. *J Urol* 1999; 161: 737-740.
71. Etriby A, Girgis SM, Hefnawy H et al. Testicular changes in subfertile males with varicoceles. *Fertil Steril* 1967; 18: 666-671.
72. Aggar P and Johnsen SG. Quantitative evaluation of testicular biopsies in varicoceles. *Fertil Steril* 1978; 29: 52-57.
73. Reichart M, Eltes F, Soffer Y et al. Sperm ultramorphology as a pathophysiological indicator of spermatogenesis in males suffering from varicocele. *Andrologia* 2000;32(3): 139-145.
74. Kumagai A, Kodama H, Kumagai J. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 2002;8(2):118-23.
75. Tanji N, Fujiwara T, Kaji H, Nishio S, Yokoyama M. Histologic evaluation of spermatic veins in men with varicoceles. *Int J Urol* 1999; 7: 355-360.
76. Lund L, Hahn-Pedersen J, Hljhus J. Varicocele testis evaluated by CT scanning. *Scand J Urol Nephrol* 1997; 31(2): 179-182.

77. Agarwal S. Vascular morphology in testes of infertile males with varicocele. *Indian J Med Res* 1991; 94: 228-231.
78. Santamaria L, Martin R, Nistal M, Paniagua R. The peritubular myoid cells in the testes from men with varicocele: an ultrastructural, immunohistochemical and quantitative study. *Histopathol* 1992; 21(5): 422-433.
79. Cameron DF, Snyder FE. The blood-testis barrier in men with varicocele: a Lanthanum tracer study. *Fertil Steril* 1980; 34: 255-258.
80. Onur R, Semercioz A, Orhan I, Yekeler H. The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urol Res* 2004 32: 204-8.
81. De Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation in whole sperm and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* 1993; 59: 1291-1295
82. Aitken RJ and Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefits and risk. *Bioassays* 1994; 16: 259-267
83. Aitken RJ and Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1987; 81: 459-465.
84. Buttke TM, Sandstrom PA. (1994). Oxidative stress as mediator of apoptosis. *Immunol Today*. 15:7-10.
85. Hendin BN, Kollettis PN, Sharma RK et al. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 1999; 161: 1831- 1834.
86. Çavdar C SA, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997; 3-4: 92-95.
87. Burçak G AG. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 35.
88. Benoff S, Goodwin LO, Millan C, Hurley IR, Pergolizzi RG, Marmar JL. Deletions in L-type calcium channel alpha1 subunit testicular transcripts correlate with testicular cadmium and apoptosis in infertile men with varicoceles. *Fertil Steril* 2005;83(3):622-34.
89. Free MJ, Schluntz GA, Jaffe RA. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol Reprod* 1976;14(4):481-8.
90. Tekcan M. Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. *İnfertilite* 2001; 3:131-136.
91. Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, et al. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* 2002; 8(2):118-23.
92. Ameisen J S. The origin of programmed cell death. *Science* 272: 1278, 1996.
93. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrin* 1998;18: 482-491.
94. Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-245.
95. Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 1995; 6: 3-16.
96. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 1995;146: 3-15.

97. Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.
98. Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 1993; 15: 35-43.
99. Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 2000;25: 1859-1866.
100. Ayaşlıoğlu E. Apoptosis. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi* 2001; 21:57-62.
101. Akins P T, Liu P K, Hsu C Y. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe ? *Stroke*; 27: 1682-1687.
102. Nakano R. Apoptosis: Gene directed cell death. *Horm Res* 1997; 48: 2-4.
103. Wyllie A H. The genetic regulation of apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1995; 5: 97-104.
104. Cummings M C, Winterford C M, Walker N I. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997;21: 88-101.
105. Cohen J J. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.
106. Schwartzman R A, Cidloski J A. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews* 1993; 14: 133-144.
107. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456–1462.
108. Grisham MB, McCord JM. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Taylor AE, Matalon S, Ward PA (eds.), *Physiology of Oxygen Radicals*. Bethesda, MD: American Physiological Society; 1986: 1–8.
109. Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem. J* 2002; 365: 849-856.
110. Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol* 2000; 86: 598-606.
111. Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 95: 825-830, 1992.
112. Hsueh A J W, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal Celi Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research* 1996; 51: 432-457.
113. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Celi Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Celi Survival. *Pediatric Research*. 1996; 40: 351-356.
114. Yin Y, Hawkins K L, Devolf W C, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl* 1997; 18: 159- 165.
115. Lin W W, Lamb D J, Lipshultz L I, Kim E D. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int UrolNephrol*. 1999; 31(3): 361-370.
116. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Giuseppe F, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 2000;15: 4830-4839.

117. Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM et al. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 1997; 158: 1791-1793.
118. Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod* 1996; 55(5): 935-941.
119. Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl* 1998; 19: 487-497.
120. Fazlioglu A, Yilmaz İ, Mete Ö. The Effect of Varicocele Repair on Experimental Varicocele Induced Testicular Germ Cell Apoptosis. *Journal of Andrology* 2007.
121. Fujisawa M, Hiramane C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol* 1999; 17: 296-300.
122. Lue YH, Sinha-Hikim AP, Swerdloff R.S et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999; 140: 1709-1717.
123. Miller D, Brough S, Al-Harbi O: Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Hum Rep* 1992; 7: 637-645.
124. Ku WW, Wine RN, Chae BY et al. Spermatoocyte toxicity of 2- methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; Abstract 134: 100-110.
125. Kleiber EL, Broverman DM, Pokoly TB et al. Interrelationships of cigarette smoking, testicular varicoceles and seminal fluid indexes. *Fertil Steril* 1987; 47: 481-486.
126. Benoff S, Hurley IR, Barcia M et al. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Fertil Steril* 1997; 67(2): 336- 47.
127. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: Structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003; 92: 827-839.
128. Barnett Henry JM, Mohr JP, Bennett MS, Yatsu MF. Medical complications of stroke. *Stroke Pathophysiology, Diagnosis and Management Third Edition.* 1998; 1121 –1122.
129. Apakcan Aksun S, Özmen D, Bayındır O. Metalloproteinazlar, İnhibitörleri ve İlişkili Fizyolojik ve Patolojik Durumlar. *T Klin Tıp Bilimleri* 2001, 21: 332-342.
130. Brown P. Matrix Metalloproteinase İnhibitors. *Breast Cancer Research And Treatment* 1998; 52: 125-136 p.
131. Cox G, Steward K.J. The Plasmin Cascade And Matrix Metalloproteinases in Non-Small Cell Lung Cancer, *Thorax* 1999, 169-179.
132. Newby A. Matrix Metalloproteinases Regulate Migration, Proliferation, And Death Of Vascular Smooth Muscle Cells By Degrading Matrix And Non- Matrix Substrates, *Cardiovascular Research* 2005; 5:1-11.
133. Woessner J.F. Jr: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *Faseb J* 1991; 5(8):2145-54.
134. Shravan K, Chintala J, Jasti S. Matrix Metalloproteinases And Their Biological Function In Human Gliomas, *Int. J. Devl Neuroscience* 1999; 17: 495- 502.

135. Galis Z.S, Khatri J.J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res* 2002; 22;90(3):251-62.
136. Apple F.S, Wu A.H, Mair J, Ravkilde J, Panteghini M, Tate J, Pagani F, Christenson R.H, Mockel M, Danne O, Jaffe A.S. Committee on Standardization of Markers of Cardiac Damage of the IFCC: Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. *Clin. Chem* 2005; 51(5): 810-24.
137. Newby A.C: Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol. Rev* 2005; 85(1):1-31.
138. Ohuchi E, Imai K, Fujii Y, Sato H, Seiki M, Okada Y. Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix molecules. *J Biol Chem* 1997; 272: 2446-2451.
139. Shapiro SD, Kobayashi DK, Ley TJ. Cloning and characterization of a unique elastolytic metalloproteinase produced by human alveolar macrophages. *J Biol Chem* 1993; 268: 23824-23829.
140. Marchenko GN, Strongin AY. MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cystein-switch sequence is widely expressed in tumors. *Gene* 2001; 265: 87-93.
141. Matrisian L.M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990; 6(4):121-5.
142. Overall C.M. and López-Otín C.: Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer*: 2(9):657-72; 2002.
143. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2001 Jul;2(7):502-11.
144. Nelson A.R, Fingleton B, Rothenberg M.L, Matrisian L.M. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol* 2000; 18(5):1135-49.
145. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 2003; 200: 448-464.
146. Curran S. and Murray GI. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J.Pathol* 1999, 189(3):300-8.
147. Wang M, Liu Y.E, Greene J, Sheng S, Fuchs A, Rosen E.M, Shi Y.E. Inhibition of tumor growth and metastasis of human breast cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *Oncogene* 1997; 12;14(23): 2767-74.
148. Gasson JC, Golde DW, Kaufman SE, Westbrook CA, Hewick RM, Kaufman RJ, Wong GG, Temple PA, Leary AC, Brown EL, et al: Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroidpotentiating activity. *Nature*, 1985; 315: 768-771.
149. Stetler-Stevenson WG, Bersch N, Golde DW: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) has erythroid-potentiating activity. *FEBS Lett*, 1992; 296: 231-234.
150. Zhao WQ, Li H, Yamashita K, Guo XK, Hoshino T, Yoshida S, Shinya T, Hayakawa T: Cell cycle-associated accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in the nuclei of human gingival fibroblasts. *J Cell Sci*, 1998; 111: 1147-1153.
151. Gomez D.E, Alonso D.F, Yoshiji H, Thorgeirsson U.P: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol* 1997; 74(2): 111-22.

152. Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH: Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-independent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 13787-13795
153. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and the results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril* 1970; 21: 606.
154. Çayan S, Akbay E, Bozlu M, Doruk E, Yıldız A, Acar D, Kanık EA, Ulusoy E. Diagnosis of pediatric varicoceles by physical examination and ultrasonography and measurement of testicular volume: using the prader orchidometer versus ultrasonography. *Urol Int* 2002; 69(4): 293-296.
155. Oktar T, Ahmedov İ, Kadioğlu A. Varikosel tedavisi: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi (Editörler: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B ve ark.). Türk Androloji Derneği yayını, İstanbul, 2004; 463-472.
156. Çayan S, Kadioğlu A. Varikoselin Tanı ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Türk Üroloji Dergisi* 2005; 31 (1): 57-63.
157. Sofitikis N, Takahashi C, Kadowaki H, et al. Surgical repair vs medical treatment of varicocele in the rat: Pharmacological manipulation of the varicocele. *Eur Urol* 1992 22: 44-52.
158. Çam H K. Varikosel patogeneğinde serbest oksijen radikalleri ve apoptozisin rolünün rat modelinde araştırılması ve E vitaminin koruyucu etkileri. Uzmanlık tezi. Marmara U. Tıp Fak. Üroloji, 1998
159. Özeren C.B. Varikosel oluşturulan adölesan sıçanlarda, flavanoid grubu drog olan oxerutin'in, spermatik ven ve testis üzerine olan etkilerinin morfolojik yönden araştırılması. Uzmanlık tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp fakültesi Üroloji kliniği, 2004
160. Middleton EJ, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In Harborne, J.B. (eds) *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, London, 1994; 619-652.
161. Siess M.H, Le Bon A.M, Suschetet M. Dietary modification of drug-metabolizing enzyme activities: dose-response effect of flavonoids. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1992; 35, 141-152.
162. Chang WS, Lee Y.J, Lu F.J, Chiang H.C. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res.* 1993; 13,2165-2170.
163. Geahlen R.L, Koonchanok N.M, McLaughlin J.L. Inhibition of protein-tyrosine kinase activity by flavonoids and related compounds. *J. Nat. Prod.* 1989; 52, 982-986.
164. Lee, T.P, Matteliano M.L, Middleton E. Effect of quercetin on human polymorphonuclear leukocyte lysosomal enzyme release and phospholipid metabolism. *Life Sci.* 1982; 31, 2765-2774.
165. Baumann J, von Bruchhausen F, Wurm G. Flavonoids and related compounds as inhibitors of arachidonic acid peroxidation. *Prostaglandins* 1980; 20: 627-639.
166. Moore P.K, Griffiths R.J, Lofts F.J. The effect of some flavone drugs on the conversion of prostacyclin to 6-oxoprostaglandin E1. *Biochem. Pharmacol* 1983; 32: 2813-2817.
167. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem. Pharmacol.* 1983; 32, 1141-1148.

168. Oh O. Diosmin. *Alternative Medicine Review* 2004;9(3): 308-311.
169. Ramelet AA. Clinical benefits of Daflon 500 mg in the most severe stages of chronic venous insufficiency. *Angiology* 2001;52:S49-S56.
170. Smith PD. Neutrophil activation and mediators of inflammation in chronic venous insufficiency. *J Vasc Res* 1999; 36: 24-36.
171. Bergan JJ, Schmid-Schonbein GW, Takase S. Therapeutic approach to chronic venous insufficiency and its complications: place of Daflon 500 mg. *Angiology* 2001;52:S43-S47.
172. Lyseng-Williamson KA, Perry CM. Micronised purified flavonoid fraction: a review of its use in chronic venous insufficiency, venous ulcers and haemorrhoids. *Drugs* 2003; 63: 71-100.
173. Ramelet AA. Pharmacologic aspects of a phlebotropic drug in CVI-associated edema. *Angiology* 2000; 51: 19-23.
174. Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation* 2000;7:S29-S34.
175. Jantet G. Chronic venous insufficiency: worldwide results of the RELIEF study. Reflux assessment and quality of life improvement with micronized flavonoids. *Angiology* 2002; 53: 245-256.
176. Godeberge P. Daflon 500 mg in the treatment of hemorrhoidal disease: a demonstrated efficacy in comparison with placebo. *Angiology* 1994; 45: 574-578.
177. Pecking AP, Fevrier B, Wargon C, Pillion G. Efficacy of Daflon 500 mg in the treatment of lymphedema (secondary to conventional therapy of breast cancer). *Angiology* 1997; 48:93-98.
178. Pecking AP. Evaluation by lymphoscintigraphy of the effect of a micronized flavonoid fraction (Daflon 500 mg) in the treatment of upper limb lymphedema. *Int Angiology* 1995; 14: 39- 43.
179. Cova D, De Angelis L, Giavarini F, et al. Pharmacokinetics and metabolism of oral diosmin in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1992; 30: 29-33.
180. Le Devehat C, Khodabandehlou T, Vimeux M, Kempf C. Evaluation of haemorheological and microcirculatory disturbances in chronic venous insufficiency: activity of Daflon 500 mg. *Int J Microcirc Clin Exp* 1997; 17: 27-33.
181. Meyer OC. Safety and security of Daflon 500 mg in venous insufficiency and in hemorrhoidal disease. *Angiology* 1994; 45: 579-584.
182. Glinski W, Chodynicka B, Roszkiewicz J, et al. The beneficial augmentative effect of micronised purified flavonoid fraction (MPFF) on the healing of leg ulcers: an open, multicenter, controlled, randomized study. *Phlebology* 1999; 14: 151-157.
183. Casley-Smith JR. The effects of diosmin (a benzo-pyrone) upon some highprotein oedemas: lung contusion, and burn and lymphoedema of rat legs. *Agents Actions* 1985; 17:14-20.
184. PeriFlux System 5000 Kullanım Kılavuzu, Perimed AB, Stockholm, Sweden.
185. Johnsen SG. Testicular biopsy score count a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1970;1(1):2-25.

186. Çayan S, Akbay E, Bozlu M, Doruk E, Acar D, Ulusoy E. The effect of varicocele repair on testicular volume in children and adolescents with varicocele. *The Journal of Urol* 2002;168:731-34
187. Benoff S, Gilbert SR. Varicocele and male infertility: Part I Preface. *Hum Reprod Update* 2001,7(1):47-54
188. Kass EJ. Adolescent varicocele. *Pediatric Clinics of North America* 2001; 48:934-940.
189. Diamond DA. Adolescent varicocele: emerging understanding. *BJU Int* 2003;92 supp 1:48-51
190. Snyderle, F.E, Cameron D.F. Surgical induction of varicocele in the rabbit. *J.Urol* 1983;130:1005-1009
191. Hurt G.S, Howards S.S, Turner T.T. Repair of experimental varicocele in the rat: long-term effects of testicular blood flow and temperature and cauda epididymidal sperm concentration and motility. *J Androl* 1986; 7: 271-276.
192. Goldstein M, Eid J.F. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface-temperature in man with varicocele. *J Urol* 1989; 142: 173-175.
193. Mellinger B.C. Testicular artery blood flow velocity in man with varicocele. *J Urol* 1991;145:282A.
194. Ross J.A, Watson N.E, Jarow J.P. The effect of varicoceles upon testicular blood flow in man. *Urology* 1994;44: 535-539
195. Bouskela E, Cyrino F. Z. G. A, Lerond L. Effects of oral administration of different doses of purified micronized flavonoid fraction on microvascular reactivity after ischaemia/reperfusion in the hamster cheek pouch. *BJP* 1997;122:1611-1626
196. Potter R.J, Dietrich H.H, Tysl K, Ellis CG, Cronk-Wright. Ischemia-reperfusion induced microvascular dysfunction in skeletal muscle: application of intravital microscopy. *Int. J. Microcirc. Clin.* 1993; 13: 173-186
197. Köksal IT, Tefekli A, Usta M et al. The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. *BJU Int.* 2000 Sep; 86(4): 549-552
198. Sharma R K, Aganval A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996; 48(6):835.
199. Sherine M. R, Nagwa A. S. Evaluation of Clinical Activity and Safety of Daflon 500 mg in Type 2 Diabetic Female Patients. *Saudi Pharmaceutical Journal* 2009;17(3):145-126.
200. Tirkey N, Pilkhwal S, Kuhad A, Chopra K. Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC Pharmacology* 2005, 5: 2.
201. Socher S A, Yin Y, Dewolf W C, Morgentaler A. Temperature mediated germ cell loss in the testis is associated with altered expression of the cell-cycle regulator p53. *J Urol* 1997; 157: 1986.
202. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996; 28: 587.
203. Pascarella L, Takase S, Lerond L. Venous Hypertension, Inflammation and valve remodelling. *Eur J Vasc Endovasc Surg.*2004;28: 484-493.

204. Siu M. K.Y, Cheng C. Y. Interactions of Proteases, Protease Inhibitors, and the β 1 Integrin/Laminin γ 3 Protein Complex in the Regulation of Ectoplasmic Specialization Dynamics in the Rat Testis. *Biol Repr* 2004; 70, 945–964
205. Robinson L.L, Sznajder N.A, Riley S.C. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in human fetal testis and ovary. *Molecular Human Repr* 2001;7(7): 641-648.
206. Longin J, Guillaumot P, Chauvin M.A, Morera A.M, Battistoni B.L.M. MT1-MMP in rat testicular development and the control of Sertoli cell proMMP-2 activation. *Journal of Cell Science* 2001; 114,2125-2134.