

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**VARİKOSEL İLE İNDÜKLENEN
TESTİKÜLER HASARIN OLUŞUMUNDA
POLİ ADP-RİBOZ POLİMERAZ (PARP)
YOLAĞININ ROLÜ**

Merih TEKCAN

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2009

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

**VARİKOSEL İLE İNDÜKLENEN
TESTİKÜLER HASARIN OLUŞUMUNDA
POLİ ADP-RİBOZ POLİMERAZ (PARP)
YOLAĞININ ROLÜ**

Merih TEKCAN

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2007.02.0122.014)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2009

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 15.06/2009

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Mevlüt ASAR**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Necdet DEMİR**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Doç. Dr. Selçuk YÜCEL**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Üroloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

VARİKOSEL İLE İNDÜKLENEN TESTİKÜLER HASARIN OLUŞUMUNDA POLİ ADP-RİBOZ POLİMERAZ (PARP) YOLAĞININ ROLÜ

ÖZET

Varikozel erkek infertilitesinin en önemli sebebi olarak gösterilmektedir, ancak testiküler disfonksiyonu ve infertiliteyi indükleyen varikozelin patogenetik mekanizması henüz anlaşılammıştır. Erkek infertilitesinde oksidatif stresin rolünü değerlendiren son çalışmalar, varikozelli hastalardaki sperm disfonksiyonunun oksidatif stresle ilişkili olduğunu göstermektedir. Poli ADP-ribozilasyon, Poli ADP-riboz Polimerazlar (PARP) tarafından katalizlenen ve DNA zincir kırıklarına verilen hızlı bir hücrel cevaptır. PARP-1, PARP ailesinin en aktif ve en iyi tanımlanmış üyesidir. Oksidatif stres ya da inflamasyon gibi çeşitli patolojik durumlarda aşırı PARP aktivasyonu ortaya çıkmaktadır. PARP'ın aşırı aktivasyonu hücre ölümüyle (apoptoz ya da nekroz) sonuçlanır. Varikozel hakkında birçok çalışma yapılmışsa da, şimdiye kadar hiçbir medikal tedavi varikozelin tedavisinde yeterli başarıyı gösterememiştir. Oksidatif stresin arttığı durumlarda, PARP'ın aşırı aktive olduğu bilindiğinden; bu çalışmada "varikozelli hastalarda testiküler hasarın ve sperm disfonksiyonunun PARP yolağının aşırı aktivasyonu ile ilişkili olabileceği" hipotezi irdelenmiştir. Yedi haftalık yetişkin *Rattus norvegicus* (Wistar) ırkı erkek sıçanlar rastgele olarak 3 gruba ayrılmıştır. 1.Grup sıçanların (13 haftalık, n=10) sol testislerinde deneysel varikozel modeli ve 2.Grup sıçanlarda sham operasyonu (n=10) gerçekleştirilmiştir. 3.Grup sıçanlar ise kontrol grubunu oluşturmuştur (n=10). Deneysel varikozel modelinin indüklenmesinden sonra tüm gruplardaki sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Sol testis dokularında; 4-HNE, PARP-1 ve PAR proteinlerinin immünohistokimyasal ve western blot analizleri ile apoptozun belirlenmesi için TUNEL analizleri gerçekleştirilmiştir. Varikozel oluşturulan testislerin ağırlıkları belirgin olarak azalmış ve bu testislerde seminifer tübül hasarı belirgin olarak artmıştır. Western blot analizleri oksidatif stres artışını ortaya koymuştur. Immünohistokimyasal ve western blot analizleri sonucunda; PAR ve PARP-1'in kontrol ve sham gruplarında ekspre olduğu, ancak varikozel gruplarındaki ekspresyon düzeylerinin tüm germ hücrelerinde anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak, varikozelli testislerde apoptotik germ hücre sayısı belirgin olarak artmıştır.

Sonuç olarak, varikozel nedeniyle testiste artan oksidatif stres sonucunda PARP yolağının aktive olduğu ve germ hücre apoptozunu indüklediği ilk defa ortaya konmuştur. Genellikle varikozelli bireyin ürettiği sperm hücrelerini değerlendiren literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında, üretilen anormal gametlerin oluşumunda PARP yolağının testisteki rolünü değerlendiren bu çalışma, varikozel mekanizmasına moleküler düzeyde önemli bir katkı sağlamaktadır. Bütün bunlarla ilişkili olarak; deneysel varikozel modellerinde farmakolojik PARP inhibitörleri kullanarak, varikozel patogenezinin PARP yolağı ile ilişkisinin değerlendirileceği çalışmaların planlanmasına hızla devam etmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Sıçan, varikozel, oksidatif stres, PARP-1, PAR, apoptoz

THE ROLE OF POLY ADP-RIBOSE POLYMERASE (PARP) PATHWAY IN VARICOCELE INDUCED TESTICULAR DAMAGE

ABSTRACT

Varicocele has long been implicated as a major cause of male infertility. However, pathogenetic mechanisms by which varicocele induces testicular dysfunction and infertility are not fully understood. Recently, studies evaluating the role of oxidative stress in male infertility have shown that sperm dysfunction in varicocele patients are related to oxidative stress. Poly(ADP-ribosyl)ation is a cellular response to DNA strand breaks that is catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs). PARP-1 is the most active and best-characterized member of the PARP family. PARP overactivation occurs in various pathological conditions involving oxidative stress or inflammation. Extensive activation of PARP leads to cell dysfunction and can culminate in cell death, either apoptosis or necrosis. Despite the long history associated with varicoceles, no medical treatment could be successfully used until now. PARP overactivation during high levels of oxidative stress and their interaction suggested us the hypothesis that “testicular damage and sperm dysfunction in varicocele patients may be in part related with overactivation of PARP pathways”. Adult animals, which were 7-weeks-old, were randomly separated into three groups. First group rats were used as control group (n:10), second group rats underwent a sham operation (n:10) and third group rats were used for experimental groups and underwent partial ligation of renal vein (n:10). Rats in all groups were sacrificed after induction of experimental varicocele. Western blot and immunohistochemical analysis of PARP-1, PAR and 4-HNE (oxidative stress marker) in left testicular tissues were done. TUNEL analysis was performed for apoptotic cell evaluation. The tissue weights of varicocele induced testes decreased significantly, whereas, tubule degeneration was significant in these testes. Western blot analyses have confirmed increased oxidative stress in varicocele groups. Both western blot and immunohistochemical analysis have confirmed that PARP-1 and PAR expressions increased significantly in all germ cell types. Moreover, the ratio of apoptotic germ cells in varicocele groups were significantly higher when compared to control and sham groups.

In conclusion, for the first time in the literature it has been confirmed that increased oxidative stress in varicocele triggered the activation of PARP pathway which in turn induced germ cell apoptosis. By evaluating the role of PARP pathway in varicocele testes, this study contributes very much to molecular mechanisms of varicocele pathogenesis when compared to studies those generally evaluate the sperm cells of varicocele patients. Studies regarding the effects of pharmacological PARP inhibition to experimental varicocele are in progress in our laboratory.

Key words: Rat, varicocele, oxidative stress, PARP-1, PAR, apoptosis

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmamın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli katkılarda bulunan danıőman hocam Sayın Doç. Dr. iler ÇELİK ÖZENCI'ye,

Tezimin gerçekleşmesi için her türlü imkan ve desteği sağlayan Sayın hocam Prof. Dr. Mevlüt ASAR'a,

Üroloji Anabilim Dalı'ndan; Sayın Doç. Dr. İ. Türker KÖKSAL'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer KUTLU'ya deney modelinin oluşturulmasında yaptıkları katkıdan dolayı,

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm hocalarına ve çalıőanlarına,

Yardımları ile her zaman yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli elemanlarına,

Son olarak, beni yalnız bırakmayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili ailemin tüm üyelerine en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvi
GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Erkek Üreme Sistemi	4
2.1.1. Skrotum	4
2.1.2. Testis	5
2.1.3. Testisin Vasküler Anatomisi	6
2.1.4. Testiste Isı Düzenlenmesi	7
2.1.5. Spermatogenez	8
2.1.5.1. Seminifer Tübül Sınıflandırması	8
2.2. Varikosel	11
2.2.1. Tarihçe	12
2.2.2. İnsidans	12
2.2.3. Etiyoloji	12
2.2.4. Histolojik Değişiklikler	13
2.2.5. Patofizyoloji	14
2.2.5.1. Testiküler Kan Akımı	15
2.2.5.2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi	15
2.2.5.3. Hipertermi	15
2.2.5.4. Venöz Basınç	17
2.2.5.5. Renal-Adrenal Reflü	18
2.2.5.6. Hormonal Disfonksiyon	18
2.2.5.7. Otoimmünite	20
2.2.5.8. Akrozom Reaksiyonu	20
2.2.5.9. Apoptoz	21
2.2.5.10. Oksidatif Stres	22
2.3. Testiste Oksidatif Stres	23
2.3.1. Varikosel ve Oksidatif Stres	23
2.3.2. Oksidatif Stres Belirteci Olarak 4-HNE	24
2.3.4. Apoptoz ve 4-HNE İlişkisi	26
2.4. Poli ADP-Ribozilasyon	27
2.4.1. Tarihçe	27

2.4.2.	Poli ADP Ribozilasyon Mekanizması	28
2.4.3.	PARP Süper Ailesi	30
2.4.3.1.	PARP-1 Proteini	30
2.4.3.2.	PARP Ailesinin Diğer Üyeleri	32
2.4.3.3.	İnsan Genom Sekanslamasında Ortaya Çıkan Diğer PARP Molekülleri	33
2.4.3.4.	Poli ADP Riboz Glikohidrolaz (PARG)	34
2.4.4.	PARP Aktivasyon Mekanizması	34
2.4.5.	Poli ADP-Ribozilasyonun Biyolojik Fonksiyonları	35
2.4.5.1.	DNA Tamiri ve Genomik Stabilitenin Korunması	35
2.4.5.2.	Transkripsiyonun Düzenlenmesi	36
2.4.5.3.	Apoptozdaki Rolü	36
2.4.5.4.	Hücre İçi Aşırı NAD ⁺ Tüketimi Sonucunda Nekrotik Hücre Ölümü ve Patolojik Durumlardaki Rolü	36
2.4.5.5.	Sentromer Fonksiyonunun Düzenlenmesi	37
2.4.5.6.	Telomer Uzunluğunun Düzenlenmesi	37
2.4.5.7.	Protein Degredasyonunun Düzenlenmesi	37
2.4.5.8.	Sentrozomal Fonksiyon	37
2.4.5.9.	Endozomal Vezikül Alışverişinin Düzenlenmesi	37
2.4.6.	PARP-1 ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki	38
2.4.7.	PARP-1 ve Spermatogenez Arasındaki İlişki	39
GEREÇ ve YÖNTEM		42
3.1.	Deney Hayvanları	42
3.2.	Varikozel Deney Modelinin Oluşturulması	42
3.3.	Dokuların Elde Edilmesi ve Hazırlanması	43
3.4.	Rutin Işık Mikroskopik Gözlemler	43
3.5.	Johsen Skoru ile Tübül Hasarının Değerlendirilmesi	43
3.6.	İmmunohistokimyasal gözlemler	44
3.6.1.	İmmunohistokimyasal Protokol	44
3.7.	SDS - Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve İmmuno Blot	45
3.8.	TUNEL Metodu	46
3.9.	DAPI ve Nükleus Boyamaları	46
3.10.	İstatistiksel Analizler	47
BULGULAR		48
4.1.	Sol Testisin Vücut Ağırlığına Oranı	48
4.2.	Genel Görünüm	49
4.3.	Seminifer Tübül Evrelendirilmesi	54
4.4.	İmmunohistokimya	55
4.4.1.	PAR (Poli ADP-Riboz) Proteini Ekspresyonu	56
4.4.2.	PARP-1 (Poli ADP Riboz Polimeraz-1) Protein Ekspresyonu	60
4.5.	Western Blot Sonuçları	64
4.5.1.	Dört-HNE (4-Hidroksi-2-Nonenal)	64
4.5.2.	PAR (Poli ADP Riboz) Polimeri	65
4.5.3.	PARP-1 (Poli ADP Riboz Polimeraz-1)	66

4.6.	TUNEL Sonuçları	67
	TARTIŞMA	71
	SONUÇLAR	74
	KAYNAKLAR	75
	ÖZGEÇMİŞ	96

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

3-ABA	:	3-aminobenzamid
4-HNE	:	4-hidroksi-2-nonenal
AEC	:	Amino-etil-karbazol kromojeni
AIF	:	Apoptoz indükleyici faktör
Aİ	:	Apoptotik İndeks
ALE	:	İleri lipid peroksidasyon son ürünleri
ASA	:	Anti sperm antikor
BCA	:	Bicinchoninic Acid
BER	:	Baz kesip çıkarma
cPARP	:	cleaved “apoptotik” PARP
DAPI	:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DLBCL	:	Diffuse large B-cell lymphomas
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
eNOS	:	Endotelial nitrik oksit sentaz
FasL	:	Fas ligandı
FasR	:	Fas reseptörü
FSH	:	Folikül uyaran hormon
Glut4	:	Glukoz taşıyıcı-4
GnRh	:	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH	:	Glutatyon
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HE	:	Hematoksilen Eozin
IRAP	:	İnsulin-regule aminopeptidaz
JNK	:	Janus Kinaz
K	:	Kontrol grubu
KDa	:	Kilo dalton ağırlık
LH	:	Luteinize edici hormon
MAPK	:	Mitojen Aktive edici Protein Kinaz

MDA	:	Malondialdehit
MNU	:	N-metil N-nitrozüre
mRNA	:	Mesajcı ribo nükleik asit
MVP	:	Majör vault protein
NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NF-κB	:	Nükleer faktör-κB
NLS	:	Nükleer lokalizasyon sinyalleri
NO	:	Nitrik oksit
NuMa	:	Nükleer mitotik aparat proteini
PAR	:	Poli ADP Riboz
PARG	:	Poli ADP Riboz Glikohidrolaz
PARP -1	:	Poli ADP Riboz Polimeraz-1
PAS	:	Periyodik asid schiff
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltilisi
RCC	:	Reaktif karbon bileşenleri
rFSH	:	Rekombinant Folikül uyaran hormon
rLH	:	Rekombinant Luteinize edici hormon
RNA	:	Ribonükleik asit
RNP	:	Ribonükleoprotein
RNS	:	Reaktif nitrojen türleri
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
RRM	:	RNA tanıma motifi
S	:	Sham grubu (Yalancı-operasyon gören grup)
SCO	:	Sertoli Cell Only “Sadece Sertoli hücresi bulunan”
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SRY	:	Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi
SSBR	:	Tek zincir baz tamiri
TAC	:	Total Antioksidan Kapasite

TBS	:	Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
TBS-T	:	Tween-20'li Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
TDF	:	Testis belirleyici faktör
<i>Tdy</i>	:	Testis belirleyici Y lokusu
TEP-1	:	Telomeraz ilişkili protein
TGFβ-1	:	Transforming Growth Factor β -1
TIM 23	:	İç mitokondriyal membran translokaz 23
TNF-α	:	Tümör nekroz faktör-alfa
TRF-2	:	Telomerik protein-2
TUNEL	:	Terminal d-UTP Nick-End Labeling
V	:	13 haftalık varikozel grubu
WHO	:	Dünya sağlık örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.1.	Testise gelen arterler ve ven ağı “pampiniform pleksus”.	4
2.1.2.	Testiküler fizyolojide vasküler kontrol.	7
2.1.3.	Sıçanda seminifer tübül evreleri. Roma rakamları evreleri göstermektedir.	8
2.2.1.	Testiste varikozel görünümü.	11
2.3.1.	Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan bazı aldehitik moleküllerin kimyasal yapıları.	25
2.3.2.	HNE'nin biyolojik fonksiyonları.	26
2.4.1.	Poli ADP riboz sentezi.	28
2.4.2.	Poli ADP riboz yapısı.	29
2.4.3.	PARP protein ailesi üyelerinin yapısal organizasyonu.	31
2.4.4.	Oksidatif stresin Poli ADP ribozilasyona etkisi.	39
4.1.1.	Kontrol, sham ve varikozel gruplarında sol testis ağırlığının vücut ağırlığına oranları.	48
4.1.2.	Varikozel modelinin oluştuğunu gösteren fotoğraflar.	49
4.2.1.	Kontrol, sham ve varikozel gruplarında Johnsen Skoru değerlendirilmesi.	50
4.2.2.	Kontrol (a,b), sham (c,d) ve varikozel (e,f) gruplarına ait testis doku kesitlerinde HE boyası ile yapılan değerlendirmelere örnek olarak tübüllerin genel görünümleri.	51

4.2.3.	Varikozel gruplarına ait testis doku kesitlerinde HE boyaması ile değerlendirilen genel görünüm.	52
4.2.4.	Varikozel gruplarına ait testis doku kesitlerinde gözlenen “simplast” ve “hale etkisi” görülen yuvarlak spermatidlerin DAPI işaretlemesi (a-f).	53
4.3.1.	Kontrol gruplarına ait testis doku kesitlerinde PAS boyaması sonuçlarına dayanarak yapılan seminifer tübül evrelendirilmesi (a-1).	54
4.4.1.	Seminifer tübül evrelerine göre kontrol ve sham grubu testislerde PAR ve PARP-1 ekspresyonu.	55
4.4.2.	Seminifer tübül evrelerine göre varikozel grubu testislerde PAR ve PARP-1 ekspresyonu.	55
4.4.1.1.	Kontrol, sham ve varikozel gruplarında PAR immünohistokimyası.	56
4.4.1.2.	Seminifer tübül evrelendirilmesine göre varikozel gruplarında PAR immünohistokimyası (a-f).	57
4.4.1.3.	Varikozel gruplarında PAR proteinini ekspre eden hücre tipleri ve onların buldukları seminifer tübül evreleri (a-f).	58
4.4.2.1.	Kontrol, sham ve varikozel gruplarında PARP-1 immünohistokimyası.	60
4.4.2.2.	Seminifer tübül evrelendirilmesine göre varikozel gruplarında PARP-1 immünohistokimyası.	61
4.4.2.3.	Varikozel gruplarında PARP-1 proteinini ekspre eden hücre tipleri ve onların buldukları seminifer tübül evreleri (a-f).	62
4.5.1.1.	Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait 4-HNE ekspresyon şiddetlerini Beta-Aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri.	64
4.5.1.2.	Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait 4-HNE modifiye proteinler ve Beta-Aktin (46kDa) protein ekspresyonları.	65
4.5.2.1.	Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait PAR ekspresyon	

şiddetlerinin Beta-Aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri.	65
4.5.2.2. Kontrol, sham ve varikosele gruplarına ait PAR (58kDa) ve Beta-Aktin (46kDa) ekspresyonları.	66
4.5.3.1. Kontrol, sham ve varikosele gruplarına ait PARP-1(122 kDa) ekspresyon şiddetlerinin Beta-Aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri.	66
4.5.3.2. Kontrol, sham ve varikosele gruplarına ait apoptotik PARP-1 (29 kDa) ekspresyon şiddetlerinin Beta-Aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri.	67
4.5.3.3. Kontrol, sham ve varikosele gruplarına ait PARP-1 (122 ve 29 kDa) ve Beta-Aktin (46kDa) ekspresyonları.	67
4.6.1. Kontrol, sham ve varikosele gruplarında apoptotik indeks (AI) yüzdesi.	68
4.6.2. Kontrol, sham ve varikosele gruplarında TUNEL sonuçları.	69
4.6.3. Varikosele gruplarında TUNEL sonuçları.	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1.1.	Sıçana göre seminifer tübül evrelendirme kriterleri.	10
2.1.2.	İnsana göre seminifer tübül evrelendirme kriterleri.	11
3.5.1.	Johnsen Skoru hesaplama kriterleri.	43
4.1.1.	Kontrol, sham ve varikozel grubundaki sıçanların sol testis ve vücut ağırlıkları ile sol testis ağırlığının vücut ağırlığına oranları.	48
4.2.1.	Kontrol, sham ve varikozel grubundaki kesitlerde değerlendirilen tübül sayıları ve Johnsen Skorları ortalaması.	50
4.4.1.1.	Seminifer tübül evrelerine ve hücre tiplerine göre PAR immünohistokimyasal şiddetleri	59
4.4.2.1.	Seminifer tübül evrelerine ve hücre tiplerine göre PARP-1 immünohistokimyasal şiddetleri	63
4.5.1.	Kontrol, sham ve varikozel gruplarındaki 4-HNE, PAR ve PARP-1 protein ekspresyonlarının şiddeti.	64
4.6.1.	Kontrol, sham ve varikozel gruplarında apoptotik indeks (AI) yüzdesi.	68

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Varikosel, spermatik kordondaki pampiniform venöz pleksusun patolojik dilatasyonu olarak tanımlanmıştır ve erkek infertilitesinin en önemli sebebi olarak gösterilmektedir (1-3). Yetişkin ve ergenlik çağındaki genel populasyonun %15'inde klinik varikosel olduğu bildirilmektedir. Bu populasyon primer infertilitesi olan erkeklerin %35'ini, sekonder infertilitesi olan erkeklerin ise %80'ini kapsamaktadır (4, 5). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, normal semen analizine sahip varikoselli bireylerin ve varikosel öncesi fertiliteye sahip bireylerin bile testiküler fonksiyon ve fertilitate kaybı riskini taşıdığı gösterilmiştir (6, 7).

Günümüzde bu konuda çok sayıda yayınlanmış makale olmasına rağmen, testiküler disfonksiyon ve infertilitenin indükleyicisi olarak bilinen varikoselin patogenetik mekanizması henüz anlaşılammıştır. Bununla birlikte; adrenal ya da renal kökenli toksik metabolitlerin çıkışı, hipotalamik gonadal dengenin bozulması, venöz stazın neden olduğu testiküler hipoksi ve testiküler sıcaklığın yükselmesi gibi bazı mekanizmalar öne sürülmüştür (8-11). Erkek infertilitesinde oksidatif stresin rolünü değerlendiren son çalışmalar, varikoselli infertil erkeklerin yüksek seviyede sperm-kökenli reaktif oksijen türlerine (ROS) sahip olduğunu göstermiştir (12). Varikoselli hastalarda yüksek düzeyde seminal oksidatif stresin varlığı, bu bireylerin semenlerinde ROS düzeylerindeki artışın ve toplam antioksidan kapasitesindeki (TAC) azalmanın gösterildiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Böylece, sperm disfonksiyonu bulunan varikoselli hastaların spermatogenez bozukluklarının oksidatif stresle ilişkili olduğu kanısına varılmaktadır (12-17). Düşük seviyelerde ROS; kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyonu gibi normal sperm fonksiyonlarını düzenlerken, ROS'un aşırı üretimi oksidatif strese neden olabilir ve spermatozoadaki patofizyolojik değişiklikleri indükleyebilir (18, 19). Spermatozoadaki ROS ile ilişkili olarak; hücre membranının peroksidatif hasarı, sperm motilitesinin bozulması ve DNA'nın oksidatif harabiyeti gerçekleşmektedir (19-22).

Varikoselli testislerde oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucu gelişen oksidatif stresin, spermatogenez üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir (23). Varikoselli hastaların testislerinde lipid peroksidasyon ürünleri düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (24, 25). Lipid peroksidasyonunun özgül ve stabil bir son ürünü olan 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) hücre içine geçmekte, DNA ve proteinlerle etkileşerek hücre sinyalizasyonu ve apoptoz gibi özgül hücrel stres yanıtlarının başlamasına neden olmaktadır (26, 27). Varikoselin testiküler apoptoz artışı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (28-32). Germ hücreleri varikoselden en fazla etkilenen hücreler olup, varikoselin germ hücre apoptozunda artışa neden olduğu

bildirilmiştir (33). Bununla birlikte oksidatif stres sonrası testiste gelişen olaylar henüz aydınlatılamamıştır.

Poli ADP-ribozilasyon; NAD (nikotinamid adenin dinükleotid)-bağımlı bir enzim olan poli ADP-riboz polimerazlar (PARP) tarafından katalizlenen ve DNA zincir kırıkları ile aktive olan hızlı bir hücrel cevaptır (34). PARP proteinleri; DNA'ya bağlanan proteinlerin poli ADP-ribozilasyonunu katalizleyen ve ökaryotlarda bulunan bir enzim ailesidir (35-37). DNA'ya bağlanabilen proteinlere poli ADP-riboz (PAR) grupları ekleyerek bu proteinlerin fonksiyonlarını düzenler. PARP ailesinin birçok üyesi olsa da, hücrel poli ADP-ribozilasyonun %90'ı PARP-1 tarafından gerçekleştirilmektedir (38). PARP-1, nükleusta bol miktarda bulunan, DNA zincir kırıkları tarafından aktive olan ve fonksiyonel olarak DNA tamiriyle ilişkili olan bir enzimdir (39).

PARP-1 birçok dokuda farklı düzeylerde bulunmakla birlikte; testis, dalak ve timusta mRNA'sının yüksek düzeylerdeki varlığı bildirilmiştir (40, 41). Testiküler dokudaki PARP ekspresyonu ile ilişkili rodentlerde yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; PARP aktivitesi esasen spermatogonyum ve pakiten evredeki spermatositlerde mevcuttur (42-49). 2006 yılında yapılan bir çalışmada insan testis dokusunda PARP-1 enziminin ve PAR polimerinin spermatogonik hücrelerdeki dağılımı gösterilmiştir ve germ hücresi farklılaşmasındaki poli ADP-ribozilasyonun anahtar rolü kanıtlanmıştır (50). Spermatogonik hücrelerde mevcut olan PARP varlığı, muhtemelen bu hücrelerin DNA'sının genomik bütünlüğünü korumaya yöneliktir. 2005 yılında sıçanlarda yapılan bir çalışma, PARP-1 tarafından düzenlenen PAR oluşumunun kromatin kondenzasyonu sırasında spermatidlerde meydana geldiğini göstermiştir. Spermatidlerin özelliği, kromatinlerinde histon-protamin değişiminin yüksek oranda gerçekleştiği tip spermatogonik hücreler olmalarıdır. Bu durumda, geçici olarak PAR oluşumu, sperm maturasyonunun kromatin yeniden düzenlenmesi basamakları boyunca oluşan DNA zincir kırıklarını tamir ettiği sonucu ortaya konmuştur (51, 52).

Oksidatif stres veya inflamasyon gibi çeşitli patolojik durumlarda PARP aktivasyonunda artış meydana gelmektedir (52-55). PARP aktive olduğunda, spesifik proteinlere örneğin, DNA'ya bağlanan proteinler PAR grupları ekleyebilmek için hücre içinde NAD'ı tüketmektedir. PARP-1'in aşırı aktivasyonu, hücre içinde NAD ve ATP'nin fazla tüketimine neden olur ve mitokondriyal membran potansiyeli azalır. Bunların sonucunda hücre disfonksiyonu gerçekleşir ve hücre ölüme gider (56-58). PARP aktivasyonunun hangi mekanizmalar aracılığıyla hücre ölümüne sebep olduğu literatürde hala tartışma konusudur. Bu sebeple birkaç mekanizma önerilmiştir. Bunlar; hücrenin aşırı enerji tüketimi ile tetiklenen nekroz ve apoptoz indükleyen faktör (AIF) bağımlı apoptozdur (59).

Varikozel hakkında birçok çalışma yapılmışsa da, varikozel gelişimi ve varikozel tedavisinin şekli hakkında henüz net bir ortak karara varılamamıştır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, varikozelli infertil hastaların testis ve sperm disfonksiyonunun oksidatif stres ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Ayrıca diğer dokularda yapılan çalışmalardan bilinmektedir ki; yüksek düzeydeki oksidatif stres PARP'ın aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır. Bütün bu bilgilerden yola çıkarak,

varikozel hastalarındaki sperm disfonksiyonunun testiste PARP'ın aşırı aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan sinyal yollaklarıyla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Eğer hipotezimiz doğruysa, farmakolojik ajanlar (PARP inhibitörleri) kullanılarak bu yolağın inhibisyonu, semen parametrelerini geliştirerek varikozel tedavisi için ileride yeni bir terapötik yaklaşım sunabilir. Uygun medikal tedavi umut verici olabilir çünkü subklinik varikozeller için cerrahi (varikozektomi) önerilmemektedir (60). Bir diğeryandan, varikozektomiye medikal tedavinin eklenmesi, cerrahi tedavinin etkinliğini daha da artırabilir.

Bu çalışmanın amacı; deneysel olarak varikozel oluşturulmuş sıçanların testislerinde oksidatif stres artışına bağılı olarak PARP-1 ve PAR proteinlerinin dağılımlarının ve aktivasyon derecelerinin değerlendirilmesi ve apoptoz ile ilişkilendirilmesidir. Böylece, varikozelli erkeklerde infertiliteye neden olan sperm disfonksiyonunun patofizyolojik mekanizmaları arasında PARP yolağının rolü olup olmadığının aydınlatılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

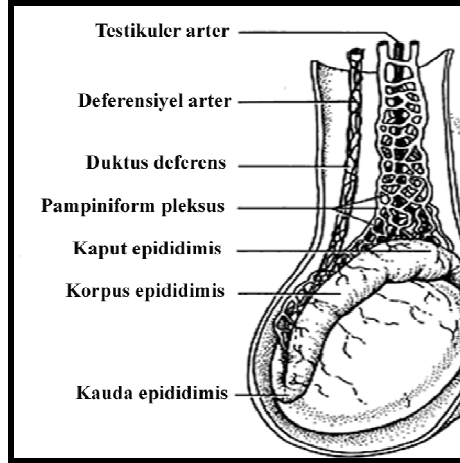
Erkek üreme sistemi testisler, genital boşaltım kanalları ve yardımcı üreme bezlerinden oluşmaktadır. Testisler spermatozalara dönüşen ve devamlı bölünün kök hücreleri içermektedir. Erkek üreme sistemi sıçanda da benzer işleyen bir mekanizmadır.

Sperm, depolanmak ve olgunlaşmasını tamamlamak için testislerden epididimise doğru hareket eder ve seksüel uyarı sırasında duktus deferens aracılığı ile epididimisten ayrılarak penil üretra aracılığı ile üreme organlarını terk eder.

Yardımcı üreme bezleri ise, bir çift seminal vezikül, bir çift bulboüretal bez ve bir adet prostat bezinden oluşmaktadır. Bu bezler sperm ile birlikte birçok salgı ürünününün karışımı olan ve semen adı verilen sıvıyı üretmektedirler.

2.1.1. Skrotum

Bir çift testis vücudun dışında skrotum içerisinde yerleşiktir. Skrotum testisin sıcaklığı içerisindeki vücut sıcaklığından yaklaşık 2.2°C daha düşüktür (61). Bu düşük ısı testisteki spermatogenez için hayati önem taşımaktadır. Skrotumun yüzeyinde gerçekleşen terleme ve buharlaşma testislerin daha düşük ısı bir ortamda kalmalarını sağlar.



Şekil 2.1.1. Testise gelen arterler ve ven ağı "pampiniform pleksus".

Testis ısısının vücut ısısına göre düşük kalması testisi besleyen damarların düzeni ile de sağlanır. Skrotumdan gelen testiküler arterler, testisten gelen pampiniform pleksusu oluşturan ve kompleks ven ağı ile çevrilidir. Pampiniform pleksustan dönen kanın ısısı, testiküler arter kanının ısısından daha düşüktür. Karşı

akım sıcaklık-değişim mekanizması ile arteriyel kan testise girmeden önce venöz kan aracılığıyla soğutulur ve böylece sıcaklığın düşük kalmasına yardımcı olur (Şekil 2.1.1).

2.1.2. Testis

Testislerin boyutları ortalama 4.5cm x 3cm x 2.7cm'dir. Tunika vaginalisin içerisindeki boşlukta mezorsiyum aracılığıyla asılı biçimde dururlar. Skrotumun içerisinde, sol testis genellikle daha aşağıda bulunur (61). Tunika albuginea adı verilen kalın bağ dokusu kılıfı, her bir testisi sarmaktadır. Tunika albugineanın bağ dokusu arka bölümden her bir testisin içine doğru uzanarak mediastinum testisi oluşturur. İnce bağ dokusundan oluşan septumlar, mediastinum testisten içeriye doğru uzanırlar ve her bir testisi, her biri 1-4 sarmal şeklindeki seminifer tübüleri içeren yaklaşık 250 adet testiküler lopçuklara ayırır. Her bir seminifer tübül çoğalan spermatogenik hücreleri ve çoğalmayan ve destek hücreleri olan Sertoli hücrelerini içeren çok katlı germinal epitel tabakasından oluşur. Seminifer tübülde, spermatogenik hücreler bölünerek sperm hücrelerine farklılaşırlar.

Seminifer tübüller germinal epitelyum hücrelerinin oturduğu bazal laminanın dışından; fibroblast, kas hücrelerine benzer hücreler, sinirler, kan damarları ve lenfatik damarlar ile sarıdır. Buna ek olarak, seminifer tübüller arasında interstisyel hücreler olarak adlandırılan Leydig hücre kümeleri vardır. Bu hücreler testosteron hormonu üretir ve salgırlar.

Testislerin arteriyel desteği, vazal ve kremasterik arterlerle birlikte bulunan testiküler arterlerle sağlanır. Bu arterlerin arasındaki anastomozlar testisin kanlanmasını sağlamaktadır (62). Arteria testicularis, arteria renalis'lerin altında olacak şekilde, aorta abdominalis'ten çıkar ve musculus psoas major'un ön yüzünde seyredir. Arteria testicularis anulus inguilaris profundus'tan geçerek funiculus spermaticus'a gelir ve mezorsiyum'dan testise girer.

Testislerin kollateral kanlanmaları çok zengindir. Arteria ductus deferentis, arteria iliaca interna'nın dalı olup, arteria uterina'nın eşdeğeridir. Arteria kremasterica, arteria epigastrica inferior'un bir dalıdır. Arteria pudendae externa, arteria femoralis'in dalıdır (61). Bu üç arter testisin kollateral kanlanmasını sağlar.

Testislerin venöz drenajı oldukça karmaşık bir olaydır. Skrotum içerisindeki primer venöz drenajdan, sol taraftaki renal ven'e ya da sağ taraftaki vena cava'ya drene olan testiküler ven ve inferior epigastrik ven'e drene olan kremastreik ven sorumludur. Sol internal spermatic ven, sol testisin anatomik olarak daha aşağıda durmasından ve damarların açısından dolayı sağ taraftakinden 8-10 cm daha uzundur. İnternal spermatic ven, sol renal ven'e dik olarak, sağ inferior vena cava'ya ise oblik açıyla girmektedir. Bu damarlar oldukça anostomozlaşmışlardır ve böylece pampiniform pleksusu oluştururlar (62). Funiculus spermaticus'da bulunan pleksus pampiniformis birleşerek her bir vena testicularis'i meydana getirir.

Pleksus pampiniformis "ters yönde ısı düzenleyici" bir sistem olarak çalışır ve böylece testislerin ısısı vücut ısısından birkaç derece düşük olarak tutulur (61). Pleksus pampiniformis varikoselden %80 oranında etkilenir. Tüm venöz

genişlemelerin %90'ı sol taraftadır, çünkü feçes ile dolu olan sigmoid kolon sol vena testicularis'e bası yaparak lokal venöz hipertansiyona neden olur. Varikösel trombozu sıklıkla ağrılı olup, ısı düzenlenmesini etkiler ve sperm sayısında azalmaya yol açabilir (61).

2.1.3. Testisin Vasküler Anatomisi

Testisler, vazal ve kremasterik arterlerin katkılarıyla esas olarak testiküler arter tarafından kanlanmaktadır. Böylece bu organın beslenmesi üç ayrı arteriyel sistem tarafından emniyet altına alınmıştır. Bunlar; internal spermatic testiküler arter, eksternal spermatic (kremasterik) arter ve deferensiyel (vazal) arterdir.

İnternal spermatic arter, ana testiküler arterdir ve testis kan akımının 2/3'ünü sağlar. Abdominal aortadan, renal arterin hemen altından anteriolateral yüzden çıkar, posterior olarak periton dış yüzünde ilerler, üreter ve eksternal iliak arterin alt bölümünü çaprazlayarak inguinal kanal iç halkasında spermatic kordona katılır ve internal spermatic fasiya içinde seyrederek. Testise girmeden önce skrotal seviyede oldukça fazla kıvrılma ve dallanma gösterir ve epididimal dalları verir (63).

Eksternal spermatic arter, testis kan akımının 1/6'sını sağlar ve esas olarak tunika vajinalisi besler. Arteria iliaca eksternanın dalı olan epigastrica inferiordan internal inguinal halka içinde ayrılır, testiküler mediastinumda internal spermatic ve deferensiyel arterlerle anastomoz yapar ve tunika vaginalis üzerinde ağ yaparak sonlanır.

Deferensiyel arter, testis kan akımının 1/6'sını sağlar. Arteria iliaca internanın uç dalı olan arteria vesicalis superior veya inferior'dan çıkar, ductus deferens ve epididimisin globus minor'ünü besler, testise yakın yerde internal spermatic arterle anastomoz yapar. İnternal spermatic arter bağlanırsa kremasterik arterin de katkısıyla testis kan akımını artırarak düzenleme sağlar. Bu düzenleme, testis atrofisini önlemede yeterli olsa bile spermatogenezi desteklemek için yeterli olmayabilir.

Varikosektomi operasyonunda testis arterini koruma konusunda tam bir görüş birliği olmamasına karşın, insan ve hayvan modellerinde arter ligasyonuna bağlı olarak gelişen testis iskemisinin germinal epitel ve spermatogenez üzerindeki bozucu etkilerini gösteren kanıtlar vardır (64-66).

Testiküler venöz drenaj dört ayrı sistemle olmaktadır. Bunlar; internal spermatic (testiküler) ven, eksternal spermatic (kremasterik) ven, deferensiyel (vazal) ven ve gubernekuler vendir.

İnternal spermatic (testiküler) ven; internal spermatic artere eşlik eder, solda renal vene dik olarak, sağda vena cava inferiora oblik olarak açılır. İnce duvarlı ve zayıf bir kas tabakasına sahip olduğu için varisleşme eğilimi gösterir. Sol internal spermatic ven yüksek konumu ve sol testisin daha aşağı pozisyonu nedeniyle sağdakinden 8-10 cm daha uzundur. Vena cava inferior'daki kanın daha fazla akışıyla olan çekiş etkisiyle sağ vendeki drenajı arttırdığı düşünülmektedir (67).

Deferensiyel ven; duktus deferense eşlik eder ve supra-inferior vezikal ven'ler aracılığıyla internal iliak ven'e açılır.

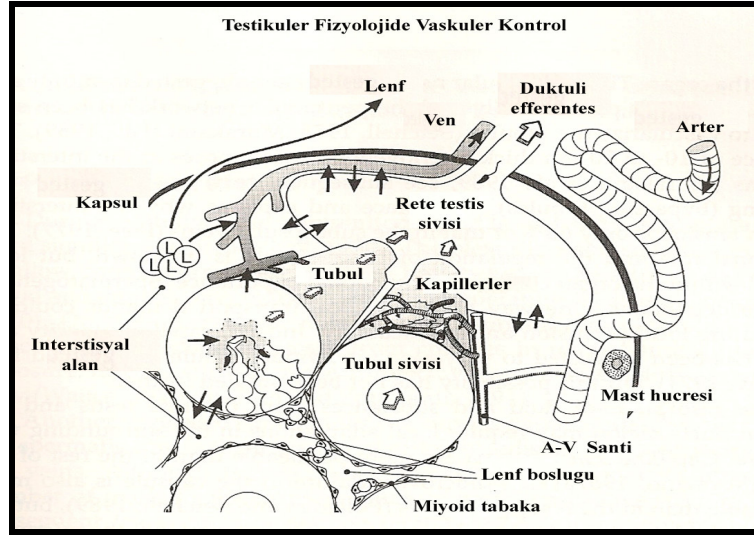
Eksternal spermatic (kremasterik) ven; spermatic kordun posteriorunda yer alır, eksternal inguinal halka bölgesinde yüzeyel ve derin inferior epigastrik venlere ve yüzeyel eksternal ile derin pudental venler yoluyla da eksternal iliak vene açılır.

Gubernakular ven; eksternal pudental ven ve safen ven yoluyla eksternal iliak ven'e bağlanır.

Testis içindeki küçük venler, testis yüzeyel venlerine ve rete testiste hiler venlere açılırlar. Daha sonra, testis ve epididimisten köken alan venler mediastinum testisten çıkarlar ve duktus deferensin önünde, testiküler arterin çevresinde 8-12 adet venden oluşan bir şebeke halinde serbest anastomoz yapan 3 ayrı ven grubu olan "Pampiniform Pleksusu" oluşturur.

Pampiniform pleksustaki vasküler yapı, karşılıklı akan arter ve venlerle, ısının ve küçük moleküllerin değişimini kolaylaştırır (68). Testosteron, konsantrasyon gradiyentine göre pasif difüzyonla venden artere doğru taşınır (69). Spermatic kordonda, ısının karşılıklı akımla değişimi, normal bireylerde rektal ısıdan 1-4⁰C daha düşük olan testise kan sağlayarak ısı düzenlenmesine katkıda bulunur (70).

2.1.4. Testiste Isı Düzenlenmesi



Şekil 2.1.2. Testiküler fizyolojide vasküler kontrol.

Testisler kanı abdominal aortadan ayrılan arteria testicularis ile doğrudan alır ve pampiniform pleksus ile verir. Bu iki damar ve duktus deferens bir arada ilerleyerek spermatic kordonu oluşturur. Testisin arter ve venlerinin bu şekilde bir arada ilerlemesi "Ters Akım Isı Değişim Sistemi (CHES)" olarak adlandırılır. Bu sistem sayesinde testislere giren kan testisten dönen ve daha soğuk olan kan ile soğutulmuş olur ve böylece testisin sıcaklığı düşük tutulur (Şekil 2.1.2) (71).

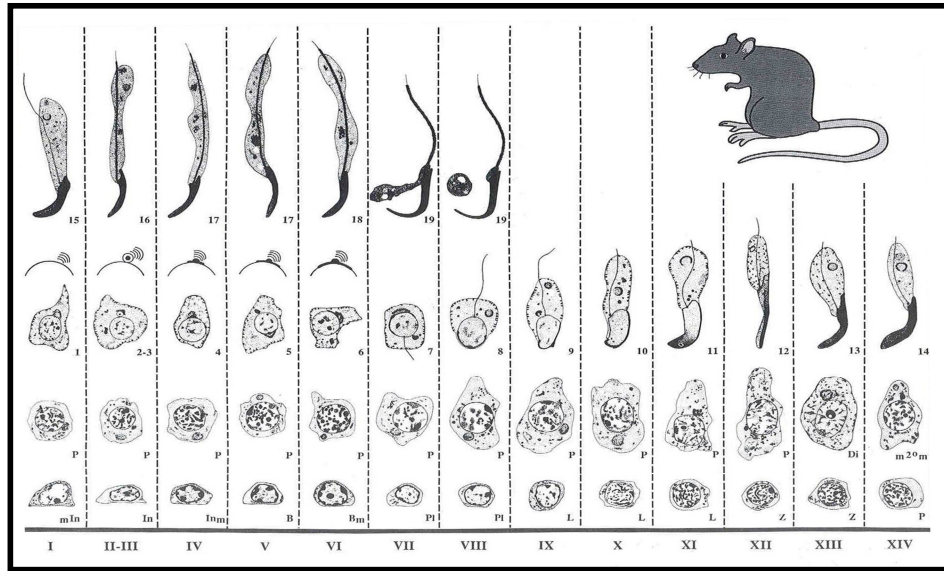
2.1.5. Spermatogenez

Spermatogenez, testis seminifer tübüllerindeki germ hücrelerinden mitotik ve mayotik bölünmelerle matür spermilerin üretildiği karmaşık bir süreci kapsar ve 3 aşamada incelenebilir. Proliferasyon fazında; germ hücreleri mitoz bölünme ile çoğalarak kendilerinin aynısı olan hücreler oluştururlar. Redüksiyon-bölünme fazında; mayoz bölünme ile germ hücreleri kromozom sayılarını 23'e indirirler. Farklılaşma fazında ise; sperm öncülü hücreler (spermatogonya, spermatosit, spermatid) sperm hücrelerine dönüşürler. Seminifer tübül içinde, spermatogenezin tüm aşamalarındaki sperm öncülü hücreler bulunur. Farklılaşma fazını tamamlayan hücreler seminifer tübül lümenine salınırlar. Bu nedenle testisin farklı bölümlerindeki farklı alanlarda, gelişimin değişik evrelerindeki sperm hücrelerinin üretimi devam eder.

Germ hücreleri sperm yapımından sorumluyken, Sertoli hücresi adı verilen hücreler germ hücrelerinin etrafında destek oluştururlar. Germ hücreleri farklı hücre tiplerine doğru bölünüp gelişmeye başladıkça, Sertoli hücresinin bazal kompartmanından adlüminal kompartmanına doğru ilerlemeye başlarlar (72).

2.1.5.1. Seminifer Tübül Sınıflandırması

Seminifer tübül sınıflandırılması türler arasında farklılıklar göstermektedir. Sıçanlar için geliştirilen ilk modern şema 1952 yılında Leblond ve Clermont tarafından yapılmıştır (73). Bu şemaya göre sıçan seminifer epiteli 14 evreye ve 19 basamağa ayrılmıştır (Şekil 2.1.3) (74).



Şekil 2.1.3. Sıçanda seminifer tübül evreleri. Roma rakamları evreleri göstermektedir.

Her bir evre, genç kuşak spermatidlerin baş morfolojisi ve akrosomal değişiklikleri baz alınarak oluşturulmuştur (Tablo 2.1) (74). Sıçan seminifer tübül

kesitleri incelenerek bir tübülde kaç adet spermatid jenerasyonu olduğuna karar verilir. Örneğin; hem yuvarlak hem de uzayan spermatidler varsa, o tübülün erken ya da orta siklusuna bakıyorsunuz demektir. Eğer sadece uzayan spermatidler varsa, tübül geç siklustadır. Tübülün erken siklusunu belirlemek için ayrıca akrozomal terminoloji de kullanılmaktadır. İnsan testisi seminifer tübül sınıflandırılmasında görülen hücreler sıandaki ile aynıdır ancak spermatogenik serinin dalgalanması farklı olduğundan tekli tübül enine kesitlerinde birden fazla evre bir arada görülebilmektedir. İnsanda spermatogenik dalga sıandakinden farklı olarak 6 evreden oluşmaktadır (Tablo 2.2) (75).

Tablo 2.1.1. Sığana göre seminifer tübül evrendirme kriterleri.

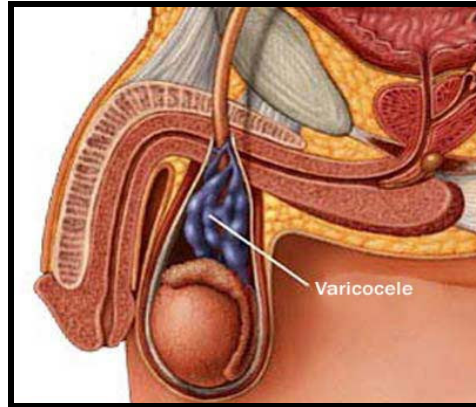
EVRE	KRİTER	GÖRÜLEN HÜCRE TİPLERİ
I	1. basamak spermatidler sekonder spermatisitlerden daha küçüktür, spermatidlerde akrozomal sistem yoktur.	Tip A ₄ spermatogonyanın mitozuyla oluşan intermedier spermatisitler, pakiten spermatisit, yuvarlak spermatid, uzayan spermatid.
II-III	Proakrozomal granüllerin ilk kez görünmesiyle başlar. Akrozom nükleus üzerine henüz yerleşmemiştir.	İntermedier spermatisitler, pakiten spermatisit, yuvarlak spermatid, uzayan spermatid.
IV	Akrozomal vezikülün nükleer yüzeye yayılmasıyla başlar ve yayılma açısı 40°C olunca sona ermektedir. Uzayan spermatidler Sertoli hücresi kriptalarına gömülmeye başlar.	Tip B spermatisitler, pakiten spermatisit, yuvarlak spermatid, uzayan spermatid.
V	Akrozomun yayılma açısı 40°C'den 95°C'ye ulaşır. Pakiten spermatisitler karışık bir heterokromatin yapı gösterirler. B spermatisitler pakiten spermatisitler şeklinde yuvarlak ovale dönüşürmeye başlar.	Tip B spermatisitler, pakiten spermatisit, yuvarlak spermatid, uzayan spermatid.
VI	Akrozomun yayılma açısı 95°C'den 120°C'ye ulaşır, ayrıca uzayan spermatidler Sertoli hücrelerinin kriptaları arasındadır. Pakiten spermatisitler büyüme hızını artırır.	Preleptoten spermatisitler, pakiten spermatisit, yuvarlak spermatid, uzayan spermatid.
VII	Uzayan spermatidler seminifer epitelin lümenine doğru hareket etmeye başlar, akrozomun nükleer yüzeyde yaptığı açısı 120°C'den daha fazladır, yuvarlak spermatidlerin nükleusu hücre yüzeyiyle henüz bir ilişki kurmamıştır. Ancak küçük flagellumun nükleusuyla ilişkisi görülmeye başlar. Marjinal Fossa adı verilen çıkıntılar belirir.	Preleptoten spermatisitler, pakiten spermatisit, yuvarlak spermatid, uzayan spermatid.
VIII	8. basamak spermatidlerin nükleusu plazma membranıyla temas halindedir, ancak şekil olarak hala yuvarlaklardır. Uzayan spermatidlerin başındaki sitoplazma volümü azalmıştır ve organellerle daha sıkı paketlenmiş hale gelmiştir.	Preleptoten spermatisitler, pakiten spermatisit, yuvarlak spermatid, spermium, sitoplazmik droplet.
IX	9. basamak spermatidlerin ovoid nükleusu lateralden yassılaşmaya başlar, ventral açısı henüz oluşmamıştır ancak ventral ve dorsal yüzeyler oluşmaya başlar.	Leptoten spermatisitler, pakiten spermatisit, uzayan spermatid.
X	10. basamak spermatidin ventral açısı gözükmemektedir, ancak dorsal açısı henüz görünmemektedir. Pakiten spermatisitlerin nükleusu ovoid hale gelmeye başlar.	Leptoten spermatisitler, pakiten spermatisit, yuvarlak spermatid.
XI	11. basamak spermatidin nükleusu lateral yassılaşmaktadır, ancak henüz kanca şeklini almamıştır. Pakiten spermatisitler düzensiz biçimlidir. Leptoten spermatisitlerde, nükleus çevresinde ince lifler halinde kromatin görünmektedir.	Leptoten spermatisitler, pakiten spermatisit, uzayan spermatid.
XII	12. basamak spermatidin dorsal yüzeyinde kanca şekli oluşmuştur. Uzama ve nükleus kondenzasyonu devam etmektedir. Pakiten spermatisitler artık ovoiddir. Zigoten spermatisitler daha büyük ve kalın kromatin kordonlarına sahiptir.	Zigoten spermatisitler, pakiten spermatisit, uzayan spermatid.
XIII	13. basamak spermatidlerde kromatin kondenzasyonu nükleusun kaudal ucuna ulaşmıştır. Diploten spermatisitlerde, spermatisitler max volümlerine ulaşırlar, kromozomlar ayrılmaya başlarlar, zigoten spermatisitlerde kromatin kordonlar daha kalın görünür ve nükleer matriksle kontrast oluşturur.	Zigoten spermatisitler, Diploten spermatisitler, uzayan spermatid.
XIV	14. basamak spermatidlerde ventral ve dorsal açıklar oluşmuştur. Sekonder spermatisitler oluşmaktadır.	Pakiten spermatisitler, sekonder spermatisitler, uzayan spermatid.

Tablo 2.1.2. İnsana göre seminifer tübül evrelendirme kriterleri.

Evre	Tanımlama
I.	Pakiten spermatozoidler ve spermatidler mevcuttur.
II.	Uzayan spermatidler seminifer epitelin lüminal kısmına taşınır.
III.	Sadece yuvarlak spermatidler vardır.
IV.	Spermatidler uzamanın ilk işaretlerini göstermektedir.
V.	Uzayan spermatidler belirgindir ve membran sınırına lokalize olmuşlardır.
VI.	Primer ve sekonder spermatozoidler I. ve II. matürasyon bölümlerine devam etmektedir.

Bu sınıflandırma, iki veya daha fazla tübül kesiti arasında karşılaştırma yapmaya olanak sağlamaktadır. Moleküllerin, seminifer tübülün hangi evresinde ne kadar ifade edildiğini belirlemede, genetik çalışmalarda, evreye-özümlenen genler belirlenmede, değişik kimyasalların veya patolojilerin evrelere göre hücrelerdeki histopatolojik düzeydeki etkilerinin değerlendirilmesinde oldukça avantajlıdır. Sınıflandırma, farklı türler ve patolojiler arasında spermatogenezin sürekliliğiyle ilgili ilişki hakkında önemli bilgileri elde etmemizi sağlar.

2.2. Varikosel



Şekil 2.2.1. Testiste varikosel görünümü (76).

Varikosel, skrotum içerisindeki pampiniform pleksusun dilatasyonu olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.2.1). Varikosel sözcüğü, ilk kez 1843’de Curling tarafından “pampiniform pleksus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu” tanımına karşılık olarak kullanılmaya başlanmıştır (77) ve uzun zamandır bilinmesine karşın, patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.2.1. Tarihçe

İlk olarak 1.yüzyılda Celcius tarafından De Medicina’da ”testisteki venler şişer ve testis üzerinde bükülür ve bu testisin beslenmesini bozduğu için diğerine göre daha küçük kalır” şeklinde tarif edilen varikosel günümüzde; testisi drene eden pampiniform pleksusu oluşturan spermatik venlerin boyuna uzamış, genişlemiş ve kıvrılmış bir hal alması ve venöz dolaşımında mutlak ters akım (reflü) olması şeklinde tanımlanır.

Osmanlı dönemi cerrahlarından Şerafeddin Sabuncuoğlu, Cerrahiyyet’ül Haniyye adlı eserinde “Devali (varikosel), testis damarlarının bükülüp üzüm salkımına benzer şekilde olması ve bu nedenle testisin aşağıya sarkmasıdır. Böyle bir hasta hareket ve spordan aciz kalır” demektedir (78). Rönesans döneminin en ünlü cerrahı, Ambroise Pare (1500-1590), bu vasküler anormalliğe durgun kan akımının neden olduğunu söylemiştir. 19. y.y.’ın sonlarında İngiliz cerrah Barfield ise infertilite ve varikosel arasındaki ilişkiyi ilk kez göstermiştir. 1900’lerin başlarında, diğer cerrahların sunduğu raporlarla, varikoselin infertiliteyle olan ilişkisi tanımlanmaya devam etmiştir. 1952 yılında ise; Tulloch’un azospermik bir hastada bilateral varikoselektomi sonrası sperm sayısında artış ve gebelik bildirmesi bu konuda dönüm noktası olmuştur ve varikoselektomi erkek faktörlü infertilite nedeniyle en sık yapılan operasyon haline gelmiştir.

2.2.2. İnsidans

Varikosel, erişkin erkek popülasyonun %15-22’sini etkileyen fiziksel bir anomalidir (79, 80). İnfertilite araştırması nedeniyle kliniklere başvuran erkeklerin ortalama %30-40’ında varikosel saptanmaktadır (81, 82). Anormal semen analizine sahip infertil erkeklerin ise %25’inde varikosel bulunduğu bildirilmektedir (83). Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) kapsamlı bir projesinde, anormal semen parametrelerine sahip erkeklerin %25.4, normal semen parametrelerine sahip erkeklerin ise %11.7’sinde varikoselin bulunduğu bildirilmiştir (4). Sekonder infertilite nedeniyle kliniğe başvuran olgularda, varikosel görülme sıklığı artarak %69-81 oranına ulaşmaktadır (84-86). Varikosel genellikle sol tarafta izlenir ancak daha dikkatli bir fizik muayene yapıldığında, bilateral varikosel saptama sıklığı oldukça yüksektir. Bununla birlikte, varikosele sahip olguların %80’inde infertilite bulunmamaktadır (87). Her ne kadar varikoselin 10 yaşın altındaki arası çocuklarda görülmediği ve 10-14 yaş arasındaki çocuklarda sıklığının arttığını ortaya koyan çalışmalara göre varikoselin yalnızca pubertede geliştiği ileri sürülse de (88), Akbay ve arkadaşlarının 2-19 yaş arası 4052 çocukta yaptıkları kapsamlı ve dünya literatürüne önemli katkıda bulunan prevalans çalışmasından elde edilen bulgular, hastalığın daha erken yaşlarda da başlayabileceğini göstermektedir (89).

2.2.3. Etiyoloji

Varikoselin etiyolojisi oldukça tartışmalı olmasına karşın; anatomik değişkenlikler, doğumsal ve/veya edinsel kapakçık bozukluğuna ikincil olarak gelişen venöz reflü ve venöz obstrüksiyon gibi değişik teoriler ileri sürülmektedir. Varikosel nedenleri arasında kabul görmüş 3 esas teori bulunmaktadır (90):

1. Teori: Sağ ve sol testiküler venler arasındaki anatomik farklılıklar: Sağ testiküler venin vena cava inferiora oblik, buna karşılık sol testiküler venin sol renal vene doğrudan açılması sonucunda solda hidrostatik basınç artışı gerçekleşmesi ve dolayısıyla pampiniform pleksusa iletilen basıncın venlerde genişleme ve kıvrılmaya yol açması şeklinde açıklanır.

2. Teori: Venöz kanın reflüsü ile sonuçlanan kompetan venöz kapakçıkların olmayışı; varikoselli erkeklerde yapılan anatomik diseksiyon çalışmaları, sol renal ven ve internal spermatic ven birleşim düzeyinde kapakçık bulunmadığını göstermiştir (91). Ek olarak, retrograd venografik çalışmalarla da kapakçıkların bulunmadığı veya yetersiz olduğu saptanmıştır (92-94). Bir başka çalışmada, varikoseli olan 659 erkeğin venografik paternleri incelendiğinde %73'ünde venöz kapakçıkların yokluğu gösterilmiştir. Ancak, yeterli kapakçık sistemine sahip hastalarda da %26.2 oranında varikozel görülebilmektedir (95). Bazı araştırmacılara göre, kapakçıkların yokluğu varikozel gelişimine katkıda bulunmaktadır, ancak, direkt altta yatan neden değildir (67, 95). Diğer anatomik çalışmalar ise, kapakçıkları belirlemede tamamıyla başarısız olmuşlardır (96, 97).

3. Teori: Sol renal venin, aorta ve superior mezenterik arter arasında sıkışmasına bağlı olarak testiküler venin kısmi obstrüksiyonu (nutcracker fenomeni): Testis venöz drenajının baskılanmasını olarak açıklanır. Sonuç olarak, kollateral drenaj gelişimi, venöz basınç artışı ve staz oluşmaktadır. Venografik çalışmalarda varikozel patogenezinin katkıda bulunan 2 tip "nutcracker fenomeni" bulunur:

- Proksimal (Klasik): Aortanın anterioru ve superior mezenterik arterin posteriorunda uzanan sol renal ven. İki arter arasındaki açının sıkışması ile sonuçlanır (insidans: % 0.7).
- Distal: Sol ortak iliyak arterin sıkışmasına ikincil olarak sol ortak iliyak venin sıkışması (insidans: % 0.5) (95).

Ayrıca, varikozel gelişiminde embriyolojik faktörlerin de rol oynadığı (ontojenik temel) ileri sürülmektedir. Buna göre, gelişim sırasında sol taraftaki vasküler yapılar daha plastik özelliğe sahiptir (95). Sağ ve solun drenajında farklılığa yol açan bu durum, sol tarafın daha zayıf drenajına ve dolayısıyla embriyogenez sırasında kollateral damarların açık kalmasını sağlayarak yüksek oranda venöz anomaliye yol açmaktadır. Bu ontojenik potansiyel, daha önce görülemeyen anastomozların varikoselektomiden hemen sonra yeniden açılmasına yol açarak varikozel tekrarına yol açmaktadır. Ontojeni konusunda bir başka bulgu ise primer sağ varikoselli olgulardır. Situs inversus olgularında sadece sağda görülen varikozel, bu embriyolojik temel ile açıklanabilir (98-100). Sağ varikoselin, internal spermatic venin vena cava inferior yerine sağ renal vene drene olması nedeniyle geliştiği, venografik çalışmaların dayanarak ileri sürülmüştür (101, 102).

2.2.4. Histolojik Değişiklikler

Varikoselle ilişkili vasküler değişikliklerde ven, venül ve kapillerlerin medya tabakasında kollajen miktarının artışı ve intima tabakasında fibrozis mevcuttur (103). Varikoselin derecesi, spermatic ven duvar kalınlığıyla ve damar duvarında bulunan düz kas miktarıyla ilişkilidir. 3.derece varikosellerde longitudinal düz kas

fibrillerinin hipertrofisi gözlenir. Varikoselli venler, normal sağ internal spermatik ven kontrolleriyle karşılaştırıldığında, fibrozis artışı ve damar çapı artışına bağlı akım gibi çeşitli biyomekanik özelliklerde değişiklikler gösterirler. Vücudun herhangi bir yerinden elde edilmiş varikoz venlerle yapılan çeşitli çalışmalarda, mekanik özellikler ve kollajen içeriği açısından karşılaştırılabilir farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Elektron mikroskopik ve immünohistokimyasal çalışmalar, varikoselli erkeklerde laminin ve tip IV kollajenin yokluğunda peritübüler lamina proprianın sklerozunu ortaya çıkarmıştır.

Varikoselde testiste meydana gelen histolojik değişiklikler oldukça çeşitlidir ve varikoseli olmayan ancak spermatogenez bozukluğu bulunan hastalarla benzerlik gösterir. Sıklıkla karşılaşılan histolojik bulgular; Leydig hücre hiperplazisi, tübül başına düşen Sertoli hücresi sayısının azalması, spermatogenezin duraklaması ve germinal epitelin bozulmasıdır (87). Ayrıca, seminifer tübüllerin bazal membranlarının kalınlaşması zamana bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir.

Kan-testis bariyerini göstermek için yapılan ultrastrüktürel çalışmalarda; normal görünen Sertoli-Sertoli bağlantı kompleksleriyle bariyerin bir bütün halinde kaldığı ve bazal kompartmanın korunduğu ortaya çıkmıştır. Deney hayvanlarıyla yapılan fonksiyonel çalışmalar da bu bulguyu doğrulamaktadır (62).

2.2.5. Patofizyoloji

Varikoselin patofizyolojisini ortaya koyabilmek için bazı sorular sorulmalıdır: Hangi neden varikosel gelişimine yol açmaktadır? Varikosel hangi mekanizmalarla testis fonksiyonunda bozulmaya yol açmaktadır? Varikoselin fertilité üzerine gösterilebilir etkisi nedir? Tek tarafta varikosel varlığında her iki testisin fonksiyonu hangi yollarla bozulmaktadır? Varikosel neden bazı erkeklerde testiküler fonksiyonu bozarken bazı erkekler ise etkilenmemektedir? Varikosektomi sonrasında neden bazı hastalar tedaviden yarar görmemektedir? Pek çoğu henüz açıklanamayan bu sorulara, hastalığın patofizyolojisi konusundaki sınırlı bilgiler ile yanıt verilebilmektedir.

Varikoselin hem hayvanlarda (104, 105) hem de insanlarda (106) ilerleyici ve zamanla artan testis hasarına yol açtığı bilinmektedir. Varikoselin fertilité üzerine etkilerini irdeleyen WHO projesinde, varikoselin semen anomalileri (sayı ve motilitede bozulma), testiküler hacimde azalma ve Leydig hücre fonksiyonunda azalmayla ilişkili olduğu açıkça vurgulanmaktadır (4). Ayrıca bu çalışmada, varikoselin derecesi ve sperm sayısında azalma oranı arasında doğrudan bir ilişki olduğu bildirilmektedir.

Varikosel patofizyolojisi konusundaki olası hipotezler arasında; hipertermi, testiküler kan akımı ve venöz basınç değişiklikleri, renal/adrenal ürünlerin reflüsü, nutrisyon değişimi veya interstisyel sıvı formasyonunda değişiklik ile sonuçlanan testiküler vasküler değişiklikler, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu defekti, apoptoz ve oksidatif stres bulunmaktadır (106). Mevcut verilere göre, testiküler ısı artışı ve venöz reflü en çok kabul gören faktörlerdir.

2.2.5.1. Testiküler Kan Akımı

Varikoselin bir patoloji olması, patofizyolojisinin aydınlatılmasında damara yönelik pek çok çalışmanın yapılmasına yol açmıştır. Deneysel hayvan çalışmalarında, varikösel ve testiküler kan akımı değişiklikleri konusunda birbirleriyle çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Tek taraflı varikösel varlığında iki taraflı testiküler kan akımı artışı gösteren Turner ve arkadaşlarının çalışmalarına karşı olarak (107), erişkin ratlarda aynı bulguları saptayan ve variköselektomiye izleyen kısa ve uzun dönemlerde kan akımının normale döndüğünü bildiren çalışmalar da vardır (108, 109). Tek taraflı patolojinin neden iki taraflı etki yaptığı henüz tam olarak bilinmemesine karşın, nöral veya hormonal faktörlerin rol oynadığı ileri sürülmektedir. Ancak, Hurt ve arkadaşları, sol varikösel varlığında sol testisin çıkarılmasına rağmen sağdaki kan akımının halen yüksek olmasının, hormonal sinyallerle açıklanamayacağını bildirmektedirler (109). Buna karşılık, sol spermatik vendeki nöral/nöral olmayan 'geri-bildirim' mekanizmaları veya baro/gerilme reseptörlerinin rolü üzerinde durulmuş, ancak konu açıklığa kavuşturulamamıştır.

Yukarıdaki bulguların tam aksine, varikoselin testiküler kan akımında azalmaya yol açtığını bildiren çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. Li ve arkadaşları, sol renal venin kısmi ligasyonu ile oluşturdukları deneysel varikösel modelinde kan akımının azaldığını göstermişlerdir (110). Primatlarda yapılan bir çalışmada da benzer bulgulara rastlanmış ve iki yılın sonunda kan akımının normale döndüğü ileri sürülmüştür (104). Bu farklı sonuçların, oluşturulan modellerin süresi veya ölçüm yöntemlerindeki farklılıklara bağlı olabileceği düşünülmektedir.

2.2.5.2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi

Testiküler interstisyel sıvı; testiküler hücreler ve dolaşım arasındaki endokrin etkileşimi ve hücreler arasındaki parakrin mekanizmaları düzenler. Bu sıvının oluşumu, testiküler kapillerlerin kan akımı ve geçirgenliği tarafından belirlenir. Varikösele bağlı olarak internal spermatik vende ortaya çıkan hidrostatik basınç artışı, testiküler kapiller ve vasküler geçirgenlikte değişikliğe, dolayısıyla testiküler interstisyel sıvı oluşumunda değişikliğe yol açar. Yapılan çalışmalarda, deneysel varikösel oluşumundan 30 gün sonra interstisyel sıvı oluşumunda artış olduğu gösterilmiştir (111). Seminifer tübülleri ve interstisyel dokudaki hücreleri saran bu sıvı, testis ve testis vaskülaritesi ile bağlantılıdır. Testiküler interstisyel sıvı oluşumunu kontrol eden faktörler ve bu faktörlerdeki değişiklikler, testis işlevinde önemli rol oynamaktadır. Bu faktörlerden birisi de, testis kapillerlerinin vasküler geçirgenliğinin artışı olabilir (112). Bu görüşü destekleyen bir bulgu, varikösel oluşturulan ratlarda kontrol grubuna göre anlamlı oranda fazla polimorfonükleer hücre birikiminin olmasıdır. Ayrıca bu birikim, sol tarafta sağa göre daha fazla gerçekleşmiştir (113). Kan damarlarında polimorfonükleer hücre birikiminin, venöz hidrostatik basınç artışı ile gelişen vasküler geçirgenliğe ikincil olarak gelişen ödeme bağlı olduğu düşünülmektedir.

2.2.5.3. Hipertermi

Hipertermi, varikösele ikincil olarak gelişen testiküler işlev değişikliği için en yaygın kabul gören mekanizmadır. Skrotal ısıyı 2 termoregülatör sistem düzenlemektedir:

a- Skrotumun kendisi: Bu bölgedeki ince ciltte subkutan yağ dokusu bulunmaz ve dartos kası tarafından kontrol edilen yüzey alanı değişken olarak kalır.

b- 'Ters akım' ısı sistemi: İlk kez 1959'da tanımlanmıştır (114). Spermatik kordon içindeki pampiniform pleksus, arteriyel ve venöz kan arasında 'ters akım' ısı değişim sistemini sağlamaktadır. Arteriyel kan testise girerken soğutulmakta ve testisin düşük ısını sağlanmaktadır. Bu ısı değişim sistemi, yalnızca venöz kan ısının testise giren arteriyel kandan daha düşük olduğunda çalışabilmektedir (115). Yani, testise girecek olan spermatik arter kanının ısı, testisten çıkan ve pleksus pampiniformisi oluşturan venöz kan tarafından soğutulmaktadır. Varikoselin bu mekanizmayı bozduğuna inanılmaktadır.

Varikozel ve intratestiküler ısı artışı arasındaki ilişki ilk kez 1971'de gösterilmiş ve tek taraflı lezyonun iki taraflı etki oluşturduğu bildirilmiştir (116). Bir başka çalışmada ise, prob kullanılarak, anestezi altındaki varikozelli infertil erkeklerin skrotum yüzey ısıları değerlendirilmiş ve kontrol grubuna göre skrotal ısının varikozeli olanlarda daha yüksek olduğu (ortalama 33°C'ye karşın 35-36°C) öne sürülmüştür (117). Yine bu çalışmanın verilerine göre, skrotal ısı pozisyonla değişmekte, ayakta durur pozisyonda varikozel ve kontrol gruplarının her ikisinde de iki taraflı olarak skrotal ısı azalmaktadır.

Taşınabilir küçük dijital veri kaydedici ile skrotal ısının 24 saat sürekli kaydedilebildiği diğer bir çalışmada, varikozeli olan infertil erkeklerin skrotal ısının normal fertil erkeklerden hafif yüksek olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, bu bulguların aksine, varikozeli olan ve olmayan infertil erkeklerde skrotal ısı arasında fark olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (118, 119).

Bir başka çalışmada, varikozele bağlı sol tarafta skrotal ısı artışı olan adolesanlarda, ısı artışı ile sol testis volümünün ters korelasyon gösterdiği bulunmuş ve başarılı varikozektomi sonrasında ısı azaldığı ve testis volümünün arttığı ileri sürülmüştür (120).

Varikozel onarımı öncesinde bilateral intraskrotal ısı artışının, tek taraflı veya iki taraflı varikozektomi sonrasında kontrol grubu düzeylerine indiği ileri sürülmesine karşın (117, 121), aksi görüşler de bulunmaktadır (122).

Hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan varikozel modellerinde de, skrotal ısı araştırılmıştır. Tek taraflı oluşturulan iatrojenik varikozelin (renal venin kısmi ligasyonu veya testiküler vende kapakçık yapısının cerrahi olarak bozulmasıyla) ısı artışına yol açtığı gösterilmiştir. Yine, sıçanlarda ve tavşanlarda varikozel ile intraskrotal ısı artışı arasında bir ilişki ortaya konmuş ve varikozel onarımı ile ısı normal hale dönmüştür (108, 123). Ayrıca, artmış intraskrotal ısının testiküler histolojide de anormalliklere neden olduğu ve ejakülattaki sperm kalitesini düşürdüğü bildirilmiştir (86, 123, 124).

Artmış intratestiküler ısının hangi mekanizma ile spermatogenezini bozduğu tam olarak bilinmemektedir. Seminifer tübül ve/veya Leydig hücre düzeyinde nükleer DNA ve RNA bağlayıcı proteinlerde doğrudan ısı hasarı sonucunda

spermatogenezin etkilendiği düşünölmektedir (8, 125). Ancak, kısa dönemde Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunun bozulmadığı düşünölmektedir (126). Olası bir diğer mekanizma, DNA polimeraz aktivitesindeki azalmadır. Kontrol grubuna göre, tek taraflı varikoseli olan infertil hastaların her iki testislerinde DNA polimerazların (α , β , γ) aktivitesinde % 50 azalma olduğu ileri sürölmektedir (8).

Varikosel ve skrotal hipertermi arasındaki direkt ilişki tartışmalı gibi gözükse de, gerek hayvan modelleri gerekse insanlarda varikosel varlığında, intratestiküler ısının arttığı çalışmalarda açıkça gösterilmiştir. Bu gözlemi destekleyen en önemli bulgu ise, varikosel onarımı sonrasında intratestiküler ısının normale dönmesidir.

2.2.5.4. Venöz Basınç

Varikosel ve venöz basınç değişiklikleri arasındaki ilişki de yıllardır tartışılan patofizyolojik mekanizmalardan birisidir. Varikosele ikincil olarak gelişen venöz basınç artışı testis kan akımını etkileyebilmektedir (127, 128). Hamster testisinin subkapsüler yüzeyinde bulunan mikrodamarlardaki intravasküler basınçların direkt ölçümü, testiküler kapiller basıncın çok düşük olduğunu ve vasküler ağın arteriyel bölümü tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur. Vasküler direncin bu dağılımı, hamster modelindeki venöz basınç artışına kapiller basıncın oldukça duyarlı olabileceğine işaret etmektedir (127). Venöz akımın kollaterallerinin ligasyonu ve pampiniform pleksus distalindeki ana venöz akımın kısmi oklüzyonuna bağlı olarak, venöz basınçta % 90'ın üzerindeki artış postkapiller venüllere iletilmektedir. Kronik prekapiller vazokonstriksiyon testisin beslenme kaynağına olumsuz bir etkide bulunabilir ve dolayısıyla spermatogenezini bozabilir. Ayrıca artmış venöz basınç, intratestiküler onkotik ve hidrostatik basınçlarda değişikliğe neden olabilir; önemli hormonlar için parakrin ve taşıma ortamını değiştirebilir; mikrovasküler sıvı değişimini bozabilir. Örneğin, varikosel oluşturulmuş ratlarda kontrol grubuna göre adenin nükleotid konsantrasyonunun azalması ve NAD-bağımlı-sitokrom-c redüktaz aktivitesinin düşmesi gibi bu varsayımları güçlendiren bulgular literatürde bulunmaktadır (128, 129). Bu çalışmalar, varikosel oluşturulmuş testiste, enerji metabolizması ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda defekt olduğunu göstermektedir.

İnsanlarda, skrotumun anterolateral yüzünden pampiniform pleksusa manometre bağlanmış iğne ile girilerek, spermatik kordon venlerindeki normal istirahat venöz basınçları ölçölmüştür (130). Buna göre, varikoseli olanlarda olmayanlara göre pampiniformis pleksus venöz basıncı istirahatte ortalama 19.7 mmHg, valsalva ile ortalama 22 mmHg daha yüksek çıkmaktadır. Ancak, bu çalışmada varikoselli 32 olgunun 18'inde semen parametreleri normal bulunmuştur. Aynı araştırmacılar, varikoseli olan 60 olguya varikoselektomi uyguladıklarında, olguların %88'inde cerrahi sonrasında venöz basınç değerlerinde azalma olduğunu ortaya koymuşlardır (130). Bu seride, 42 hastanın %70'inde hem venöz basınçta azalma hem de semen parametrelerinde iyileşme gözlenirken, bu grup için gebelik oranı %32 düzeyinde gerçekteşmiştir. Ayrıca, venöz basınçta varikosel onarımı ile azalma sağlanan olgularda, sağlanmayanlara göre sperm motilitesinde düzelme daha fazla bulunmuştur.

2.2.5.5. Renal-Adrenal Reflü

Varikoseli olan erkeklerin yaklaşık %50'sinde sol spermatik venede retrograd akımın olduğu bildirilmektedir (92). Ayrıca, venografik çalışmalarla venöz reflüdeki artış belgelenmiştir (94). Bu durum, varikoselli hastalarda böbrekten ve adrenal bezden katekolaminler, prostoglandin E ve F gibi metabolitlerin yüksek konsantrasyonda reflüsüne yol açmaktadır. Başlangıçta görülen kronik testiküler vazokonstriksiyon, zamanla testiküler fonksiyonu etkileyebilmektedir. Ancak, hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar yukarıdaki varsayımı henüz doğrulayamamıştır.

Deneysel varikosel modeli oluşturulan hayvanlarda sol renal vene verilen işaretlenmiş mikrosferler, ne sol ne de sağ testiste gösterilememiştir (131). Bir başka çalışmada, Wistar tipi ratlarda varikosel oluşturulduktan 12 hafta sonra yapılan sol adrenalektominin; azalmış testis ağırlığı, artmış testiküler ısı, fertilitede azalma, azalmış epididimal spermatozoal içerik ve motilite üzerine etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür (123).

Varikosel cerrahisi sırasında, testiküler geri akımın olduğu venlerden alınan kandaki katekolamin düzeyi periferik venlerden alınanlardan 3 kat fazla iken, kontrol grubunda 1.5 kat fazla bulunmuştur (132). Venlerdeki bu artmış katekolamin, "ters akım ısı değişim sistemi" yoluyla pleksus pampiniformis düzeyinde testiküler arterlere geçerek, arterlerdeki noradrenalin düzeyini artırmakta ve buna bağlı olarak arteriyollerde oluşan vazokonstriksiyon, testiküler hipoksiye katkıda bulunmaktadır. Varikoseli olan infertil hastalarda katekolaminler dışındaki metabolitlerin (kortizol, dihidroepiandrostenoidon gibi) spermatik venlerdeki konsantrasyonu, periferik venlerden farklılık göstermemektedir (133).

2.2.5.6. Hormonal Disfonksiyon

Varikoseli olan infertil olgularda, serum testosteron konsantrasyonunda azalma olduğu düşüncesi, varikoselin Leydig hücre fonksiyonunu bozduğu ve buna bağlı olarak testosteron üretiminde azalmaya yol açtığı varsayımına yol açmıştır. Rat modelinde spermatogenezin sürdürülebilmesi için en az 20 ng/ml intratestiküler testosteron konsantrasyonu gerektiği (134) ancak varikosel modelinde serum testosteron konsantrasyonunda etkilenme olmaksızın intratestiküler testosteron düzeyinde belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir (135). Bir başka rat modelinde, sol varikosel sonrasında intratestiküler testosteron konsantrasyonunun bilateral (her iki testiste) azaldığı belirlenmiştir (136). Benzer başka bir çalışmada ise, testosteronda ipsilateral (varikosel olan taraftaki testiste) artış gözlenmiştir (137). Ayrıca, tek taraflı varikoselin, intratestiküler testosteron konsantrasyonunda bilateral ve eşit düzeyde düşmeye yol açtığı yine bir rat modelinde belirlenmiş ve testosteron biyosentezinden sorumlu olan 17,20-dezmozolaz ve 17 α -hidroksilaz enzimlerinin düzeyinde azalma olduğu da gözlenmiştir (135).

Bu bulgular, varikosel oluşturulmuş hayvanlarda testosteron düzeyindeki azalmanın sentezindeki bozukluktan kaynaklandığını düşündürmektedir. Ayrıca, tavşanlardaki varikosel modelinde intratestiküler testosteronda azalma, insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu uyarımına zayıf serum testosteron yanıtı ile kısmen açıklanabilir (138). Kazama ve arkadaşlarının, varikosel oluşturulan rat testisinde, hCG'nin Leydig hücresine bağlanmasında azalma olduğunu belirledikleri

çalışmada da aynı görüş desteklenmektedir (139). Dünya Sağlık Örgütü'nün varikoselin hormonal parametreler üzerine etkisini değerlendirdiği çok merkezli bir çalışmada, varikoseli olan 30 yaş üstü erkeklerde altındakilere göre serum serbest testosteron düzeyi anlamlı derecede düşük bulunmuştur (4). Bu durum, varikoselin Leydig hücre fonksiyonu üzerine zaman bağımlı olarak olumsuz etki gösterdiğini düşündürmektedir. Çayan ve arkadaşlarının, mikrocerrahi varikoselektominin hormonal parametrelere etkisini değerlendirdikleri çalışmaları da bu bulguları destekler niteliktedir. Bu çalışmada, varikosel onarımının Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunu arttırdığı ve serum serbest testosteron düzeyindeki anlamlı artışın sperm sayı ve motilitesinde iyileşme ile paralellik gösterdiği bildirilmektedir (140).

Bir başka çalışmada, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, varikoseli olanlarda serum serbest testosteron düzeyinin daha düşük, östradiol ve steroid bağlayıcı globulin düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (139). hCG'ye testosteron yanıtının değerlendirildiği çalışmanın verilerine göre varikosel, hCG'ye testosteronunun erken yanıtını (1-4 saat) azaltabilmektedir (140). Bu durum büyük olasılıkla 17,20 liyaz düzeyindeki blok nedeniyle testosteron sentezindeki bozulmaya bağlıdır. Yukarıda bahsedilen bulgular, varikoseli olan bazı hastaların testislerinde, bir defekt sonucu cinsiyet steroid konsantrasyonundaki değişikliklere bağlı olabilir. Ancak bu bulguların, varikoselli hastalardaki endokrinopatiye bağlı mı, yoksa azalmış spermatogenezin etkisiyle mi olduğu tam olarak açık değildir. Ayrıca, bazı "salgılatıcı" faktörlere bağlı olarak gelişen aşırı yanıt nedeniyle, varikoseli olan hastalarda endokrin profilde değişiklik olduğu ve varikoselektomi ile bunların düzelebileceğini ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (141, 142). Ek olarak, Leydig hücre sayısı başına azalmış testosteron üretimini dengelemek amacıyla, Leydig hücrelerinde hiperplazi olduğu da ileri sürülmektedir (143, 144).

Tüm bu bulgulara karşın, varikoseli olan hastalardaki folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinizan hormon (LH), testosteron ve östradiol gibi hormon düzeylerinin normal sınırlarda kaldığını bildiren çalışma sayısı da azımsanmayacak ölçüdedir (145-148).

Varikosel onarımının hormonal parametrelerin geri dönüşümüne etkisi konusunda da literatürde farklı bulgular bildirilmektedir. Bazı çalışmalarda, varikosel onarımı öncesi ve sonrasında testosteron konsantrasyonunun değişmediği ileri sürülmekle birlikte (149, 150), diğer çalışmalarda özellikle preoperatif düşük testosteron düzeyine sahip hastalar olmak üzere bazı hastalarda varikosel onarımının serum testosteron düzeyini arttırdığı bildirilmektedir (140, 144, 151).

Bilindiği üzere, Leydig hücre işlevini değerlendirmek için gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) uyarımına gonadotropin yanıtı, hCG uyarımından daha duyarlı bir testtir. Varikoseli olan olgularda, 4 saatlik GnRH infüzyonuna LH ve FSH yanıtının artmış olduğu gösterilmiştir (147). Bu yanıtın büyüklüğü, ciddi oligospermik varikoselli olgularda, sperm sayısı $11 \times 10^6/\text{ml}$ 'den fazla olan olgulara göre daha büyük olmaktadır. Ayrıca, GnRH uyarımına aşırı yanıt elde edilen olgular, oligospermi derecesine bakılmaksızın, varikosel onarımı sonrasında semen parametrelerinde iyileşme göstermektedirler. Buna ek olarak, varikosel onarımı sonrasında GnRH uyarımına LH yanıtının normalleşmesi, postoperatif fertilitate ve

yüksek gebelik oranlarıyla korelasyon göstermektedir (152). Leydig hücrelerinin histolojik görünümünün değerlendirildiği varikoselli olguların testis biyopsilerinde, Leydig hücre yapılarının etkilendiği ve bu hastaların varikoselektomiden yarar görmedikleri bildirilmektedir (153).

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.

2.2.5.7. Otoimmünite

Kan-testis bariyerinin bozulmasının antisperm antikor (ASA) üretimini tetiklediği düşünülmektedir. Olası etiyolojiler arasında; testis torsiyonu, duktal obstrüksiyon, epididimit, prostatit ve testis travması yanı sıra varikosel de bulunmaktadır (154). Fertilité durumu göz önüne alınmaksızın varikoseli olan sağlıklı erkeklerin testis biyopsisinde, Sertoli-Sertoli hücre bağlantılarının sağlam olduğu gösterilmiştir (155).

Varikoselin hangi mekanizmayla kan-testis bariyerini bozmadan ASA'larını uyardığı bilinmemektedir (156). Hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan varikosel modelinde, sham ve opere edilmeyen ratlara göre varikosel oluşturulan ratlarda daha yüksek düzeyde ASA birikimi olduğu gösterilmiştir (157).

ASA değerlendirmesi genel olarak 2 yöntemle yapılmaktadır. İmmunobead tekniğinde direkt spermatozoaya karşı oluşan antikorlar bakılırken, ELISA ile seminal plazmaya karşı oluşan antikorlar ölçülmektedir. Dolayısıyla, spermatozoa ve seminal plazmadaki ASA'lar ayrı ayrı değerlendirildiğinde, varikoseli olan ve olmayan infertil hastalarda ASA düzeylerinde farklılık çıkmazken, bu fraksiyonlardaki tüm ASA'lar kombine edildiğinde varikoseli olan infertil hastaların %91'inde antikor saptanırken, varikoseli olmayan infertil hastaların %41'inde antikor bulunmaktadır (158). Bu farklılığın nedeni bilinmemektedir.

Yukarıdaki bulgulara rağmen, infertil popülasyonda ASA görülme olasılığı fertil popülasyondan daha yüksek iken, varikoseli olan hastalar ile olmayanlar arasında benzer oranlarda ASA olduğu düşünülmektedir.

2.2.5.8. Akrozom Reaksiyonu

Varikoselde, sperm sayı ve morfolojisinden daha çok sperm fonksiyonunda bir defekt olduğunu ve bunun da daha çok zona pellusidaya bağlanma sırasında gelişen akrozom reaksiyonu defektini olduğunu düşünen araştırmacılar bulunmaktadır (159, 160). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, varikosel varlığında mannoz ligand reseptörleri fertil donörlerle eşdeğer ekspresyon göstermektedir. Ancak, mannoz tedavisine karşılık spermatozoa akrozom reaksiyonunu gerçekleştirememekte ve zona pellusidaya penetre olamamaktadır (161). Aynı çalışmada, varikosel onarımının akrozom reaksiyonunda iyileşme sağlayamadığı da ileri sürülmektedir.

Varikoselli hastalardan elde edilen spermatozoanın, miyozin-benzeri epitoplara tamamlaması bu hastalarda sinyal iletimini düzenleyen mekanizmalarda

veya kalsiyum iyonunun içeri girişinde bir defekt olduğunu düşündürmektedir (162). Eser metaller gibi bazı ko-faktörler, varikoselli hastalardaki infertil duruma katkıda bulunabilir. Bu durumun, eser metal düzenlenmesinde defekte yol açan bir genin varlığına bağlı olduğu da kabul edilmektedir (161, 163). Ayrıca, varikoseli olan hastalarda akrozom reaksiyonunu olumsuz etkileyen önemli sperm plazma proteinlerinin ekspresyonunda, nitelik ve nicelik olarak gözlenen moleküler farklılıklar, fertilité üzerine değişken etki gösterebilir.

2.2.5.9. Apoptoz

Apoptoz, varikoselin de dahil olduğu infertilite ile ilişkili durumlar sperm sayısını olumsuz yönde etkileyebilir. Spermatogonya, spermatosit ve spermatid olmak üzere her 3 tip germ hücresi de apoptoz tarafından olumsuz şekilde etkilenebilmektedir (164). Ratlarda yapılan çalışmalarda, normal spermatogenez sırasında tüm preleptoten spermatositlerin %75'inin apoptoz tarafından ortadan kaldırılabilceği ileri sürülmektedir (165). Yaşlı erkeklerdeki germ hücre kaybında apoptozun etken olduğu bildirilse de (166), diğer insan çalışmalarda hipospermatogenez ve spermatid düzeyindeki maturasyon duraklaması olan erkeklerde artmış apoptotik germ hücreleri gösterilebilmekte ancak Sertoli Cell Only (SCO) olan hastalarda bu durum gözlenmemektedir (167, 168). Ayrıca, normal hücrelerde bulunmayan endotelial nitrik oksit sentazın (eNOS), apoptotik germ hücrelerinde varlığı bildirilmektedir (169). Bu gözlem, varikoseldeki germ hücre apoptozunda nitrik oksit (NO) ve eNOS'ın rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Son zamanlarda, varikoseli olan hastalarda oligosperminin ortaya çıkışında apoptozun önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Sıçanlarda oluşturulan varikosel modelinde Terminal d-UTP Nick-End Labeling (TUNEL) kullanılarak artmış germ hücre apoptozu gösterilmiştir (170). Bu çalışmada, seminifer tübül başına düşen apoptotik hücre oranı 0.27 iken, kontrol grubunda 0.14 hücre belirlenmiştir. Benzer durum insanlarda da ortaya konulmuştur. Toplam germ hücre başına her büyütme sahasındaki ortalama apoptotik hücre yüzdesinin değerlendirildiği çalışmada, varikosel için %14.7, kontrol grubu için %2 oranı verilmektedir (171). Varikoseli olan hastaların ejaküle spermelerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, sperm hücreleri %10'a kadar apoptotik iken kontrol grubunda bu oran %0.1 bulunmuştur (172).

Varikosel ve apoptoz arasındaki ilişki, 3 olay nedeniyle birliktelik göstermektedir: ısı stresi, androjen yoksunluğu ve toksik uyarın (7). Varikoseldeki ısı artışı ile apoptoz arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Lue ve arkadaşlarının çalışmasında varikoselin neden olduğu ısı artışının, hücreye ve evreye özgül olarak apoptoza neden olduğu ileri sürülmektedir (173). Varikoselli hastalarda apoptotik yolun bir diğer nedeni, androjen yoksunluğu olabilir. Bu bağlamda rat modelinde, hipofizektomiden 4 gün sonra immatür ratlarda apoptoz indüklenirken, matür ratlarda ancak GnRH antagonistleriyle apoptoz indüklenmektedir (169, 174). Antagonist tedavi başlatıldıktan sonraki 5. günde preleptoten ve pakiten spermatositler ile evre VII-VIII spermatidlerde apoptoz görülmektedir. Bu ratlara, rekombinant LH (rLH) ve rekombinant FSH (rFSH) verildiğinde, rLH grubunda apoptozda %67, rFSH grubunda %79'luk azalma ortaya çıkmakta ve intratestiküler testosteron düzeyi normal seviyeye ulaşmaktadır. Apoptozla ilgili son durum ise

toksik ajanlardır. 2-metoksi etanol, etilen glikol eter ve bunların yan ürünü 2-metoksiasetik asit gibi toksik maddelerin hayvan deneylerinde apoptoza yol açarak spermatoisit ölümüne neden olduğu bilinmektedir (166, 175, 176). Ayrıca, yukarıda da belirtildiği gibi, varikoselde toksik adrenal metabolitlerin internal spermatik vene reflüsü söz konusudur.

2.2.5.10. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türleri (ROS) arasında; süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, nitröz oksit, hipokloröz asit ve hidrojen peroksit bulunmaktadır. Aerobik koşullar altında inkübe edildiğinde, insan spermatozoası ROS üretme kapasitesine sahiptir (177). Spermatozoanın ROS üretimi; sinyal ileti mekanizmaları, sperm hiperaktivasyonu ve kapasitasyonu, akrozom reaksiyonunu kolaylaştırma ve sperm-oosit birleşmesi için önemli bir aracı olarak görev yapan fizyolojik bir işlemdir (178, 179).

Sağlıklı bireylerde seminal plazma, aşırı ROS üretiminin etkisini nötralize eden doğal çöpçü veya antioksidanlar içerir. Ancak, patolojik koşullardaki ROS üretimi bu antioksidan kapasiteyi aşan artmış oksidatif strese neden olur (178, 180-182). ROS, sperm başı ve orta parçasındaki çoklu-doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu sonucunda sperm morfolojisini bozabilir, hatalı sperm fonksiyonuna, sperm motilitesinde azalmaya ve yetersiz sperm-oosit birleşmesine yol açabilir (183, 184). Ayrıca, sperm DNA hasarına da neden olmaktadır.

Varikoseli olan hastalarda ROS'un azalmış fertilitiyle ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. Varikoseli olan fertil veya infertil erkeklerin semen örnekleri değerlendirildiğinde, varikoseli olanlarda olmayanlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda ROS bulunduğu bildirilmiştir (185). İnfertil varikoselli olguların %80'inde artmış ROS konsantrasyonu belirlenmesine karşın, bu durum varikoseli olan fertil hastaların %77'sinde, varikoseli olmayan fertil bireylerin %20'sinde bulunmaktadır. Ayrıca, normal bireylerin toplam antioksidan kapasitesi de varikoseli olanlardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (14). Başka bir çalışmada da benzer şekilde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında varikoseli olan hastalarda ROS konsantrasyonunun daha yüksek, toplam antioksidan kapasitenin daha düşük olduğu gösterilmiştir (186).

Varikoselli erkeklerdeki spermatozoanın oksidatif hasara artmış duyarlılığının, bazı antioksidanların hücre içi konsantrasyonlarındaki yetersizliğe bağlı olabileceği ileri sürülmektedir (187). Ek olarak, oksidatif strese karşı artmış olan duyarlılık, sperm plazma membranında bulunan yağ asitlerinin bileşimindeki farklılıklarla kısmen açıklanabilir. Varikoseli olan hastaların testis biyopsileri değerlendirildiğinde, varikoseli olmayanlara göre ROS ile tetiklenen lipid peroksidasyonunun indirekt bir belirteci olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonları anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu durum, varikosel patofizyolojisinin potansiyel mekanizmasında ROS'un katkısını desteklemektedir (188).

2.3. Testiste Oksidatif Stres

Oksidatif stresin kaynağını oluşturan oksijen, hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılan en önemli moleküldür. Serbest oksijen radikalleri ise enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup, yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (189). Serbest radikaller hücrelerimizde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar vermektedir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenir. Böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunmuş olur. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirlerse, hücrede serbest radikallerin miktarı artar. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye (oksidatif hasara) "oksidatif stres" denir (190).

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 (190, 191).

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 mitokondriyel 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 (192-195). Testis bu tehlikeyi önlemek için; hem enzimatik hem de non-enzimatik öğelerden oluşan antioksidan sistemleri devreye sokmaktadır (196, 197).

Bu antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir. Çünkü peroksidatif hasar; testiküler torsiyon, diyabet ve ksenobiyotik maruziyeti gibi bir çok durumda bozuk testiküler fonksiyonun tek önemli sebebiymiş gibi kabul edilmektedir (198, 199).

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 oksidatif stres meydana gelmektedir.

2.3.1. Varikosel ve Oksidatif Stres

Son yıllarda, erkek üreme sistemi rahatsızlıklarında, ROS olarak tanımlanan oksidanların oksidatif stres oluşturması bir çok 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.

Erkek üreme sistemi rahatsızlıkları içinde kayda değer bir yeri olan ve infertiliteyle olan ilişkisi açısından dikkat çeken varikosel patofizyolojisinde, oksidatif stresle ilgili araştırmalar son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif stresin insan ve hayvanlarda varikosel patogenezinde rolü olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (188). Varikosel patolojisinde testiküler mikroçevre ve hemodinamiklerdeki değişiklikler, oksidatif stresle sonuçlanan ROS üretimini artırır ve lokal antioksidan kapasitesini azaltmaktadır (200).

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 (201).

Varikosel patolojisinde indüklenen oksidatif stres birçok nedenden dolayı meydana gelmektedir. Bu nedenlerin çoğu henüz tanımlanmamış olsa da, varikosel, spermatik vende basınç artışıyla ve pampiniform pleksusda dilatasyonla kendini gösteren bir kliniğe sahiptir. Varikoselde oksidatif stresi düşündüren nedenlerin başında da bu anormal vasküler yapının sonuçları gelmektedir. Pampiniform pleksusun dilatasyonu testisin beslenmesini sağlayan kan akımını olumsuz yönde etkileyerek ters venöz akım oluşturmakta ve sonucunda testiküler hipoksiye neden olmaktadır. Oluşan hipoksi ve renal-adrenal reflü, hipertermi gibi daha önce bahsedilen diğer etkenler birlikte hareket ederek spermatogeneze hasar vermektedir.

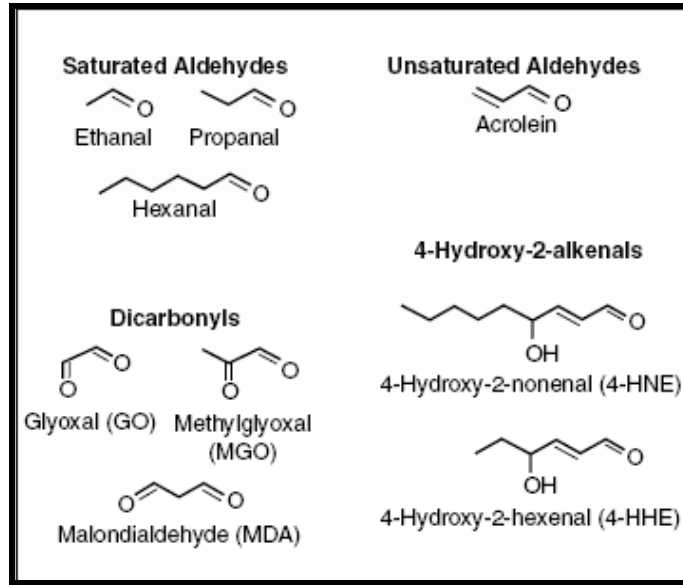
Normal şartlarda aerobik organizmalar çeşitli serbest oksijen radikalleri üretmektedirler. Ancak spermatogenezi destekleyen testis içi mekanizmaların zarar görmesiyle bu serbest radikallerin miktarı artmakta ve hücre membran yapısına ağır hasarlar vermektedir. Bu hasarın başında hücre membranı lipid 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(189, 190).

2.3.2. Oksidatif Stres Belirteci Olarak 4-HNE

Oksidanlar ve oksidatif stres tarafından indüklenen lipid peroksidasyonu sırasında endojen olarak oluşan bazı moleküller bulunmaktadır. Bu moleküller yapısında bulundurduğu karbon atomundan dolayı reaktif karbon bileşenleri (RCC) adını almaktadır. Reaktif karbon bileşenleri, dokusal proteinler üzerinde çapraz bağlar oluşturan ve aynı zamanda bazı kronik hastalıklar ve yaşlanmayla birlikte

akümüle olan “ileri lipid peroksidasyon son ürünleri”nin (ALE) öncüleridir. RCC’ler “karbonil stres”i indüklemektedir. Karbonil stres, doku hasarı ve bozulmuş protein fonksiyonlarını progresif olarak yönlendiren proteinlerle çapraz bağlar ve eklentiler oluşturarak, hücre disfonksiyonu, inflamatuvar yanıt ve apoptoz gibi patolojik durumlarda rol almaktadırlar (202).

Reaktif karbon bileşenleri; ketonlar, alkanlar ve aldehitler gibi ürünleri de içeren lipid peroksidasyon ürünlerinin büyük çoğunluğunu oluşturmaktadır. Hidroksialkenaller, akrolein, MDA, gliokzal ve metilgliokzal gibi doymuş ve doymamış aldehitlerden türetilen bazı aldehitler ve dikarboniller değişik biyolojik özellikler sergileyen reaktif karbonil bileşenleridir (Şekil 2.1.4) (203). Reaktif karbonil bileşenleri biyokimyasal olarak çoklu-doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşmaktadır ve n-6 çoklu-doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ile 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) gibi oldukça reaktif hidroksi alkenaller oluşmaktadır (204).

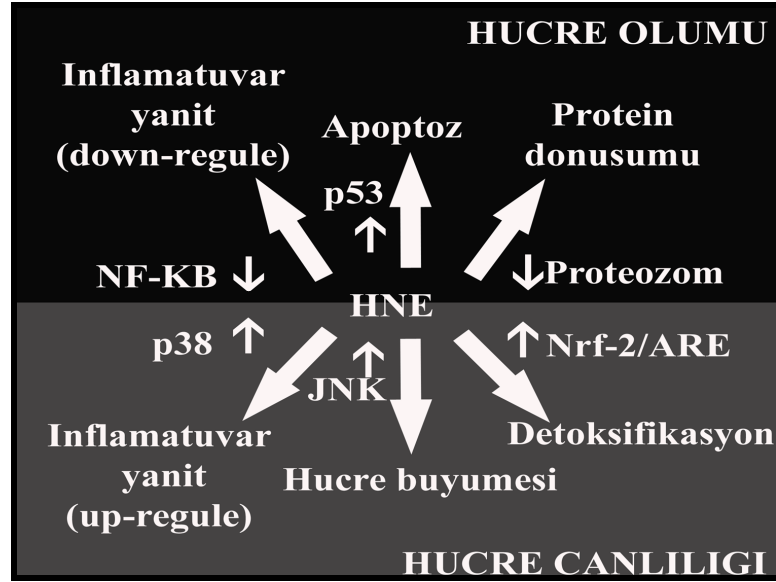


Şekil 2.3.1. Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan bazı aldehitik moleküllerin kimyasal yapıları.

Lipid peroksidasyonunun spesifik ve stabil bir son ürünü olan 4-HNE hücre içine kolayca diffüz olabilen, gerektiğinde hücreden kaçabilen ve serbest radikal olayının gerçekleştiği bölgeden daha uzaktaki hedeflere saldırabilen bir aldehittir (27). 4-HNE, hedefindeki proteinlerin histidin, sistein ve lizin rezidüleri ile etkileşerek hemiasetal yapıdaki stabil Michael eklentilerini oluşturmaktadır (205). 1,2- ve 1,4- Michael eklentisi şeklinde açıklanan reaksiyonlar sistein, glutatyon ve amin gibi nükleofiller arasındaki reaksiyonları içermektedir. 4-HNE, protein rezidüleri ile reaksiyona girdikten sonra eklentiler oluştururlar, bu oluşumlar da hücrede karbonil stres yaratarak hücresel ve dokusal proteinlerin disfonksiyonlarını indükler ve hücresel yanıtları değiştirir. Bu moleküllere “ileri lipid peroksidasyonu son ürünleri” adı verilmektedir (202).

2.3.4. Apoptoz ve 4-HNE İlişkisi

Son yıllarda, 4-HNE apoptotik hücre ölümünün potansiyel indükleyicisi olarak kabul edilmektedir (26). Buna ek olarak, 4-HNE, Nükleer Faktör- κ B (NF- κ B) bağımlı gen ekspresyonu ve proteozom bağımlı protein yıkımı gibi hücrel koruma mekanizmalarını inhibe ederek hücrel disfonksiyonu indüklemektedir (Şekil 2.1.5).



Şekil 2.3.2. HNE'nin biyolojik fonksiyonları.

4-HNE'nin düşük konsantrasyonlardaki toksisitesi bile apoptozu indüklemeye yeterlidir. Ekstrasellüler kalsiyum alımı, Janus Kinase (JNK) aktivasyonu, Glutasyon (GSH) depleasyonu ve Fas-bağımsız kaspaz yolağının aktivasyonu gibi hücre içi olaylar 4-HNE tarafından başlatılan önemli apoptotik yolları kapsamaktadır (26).

4-HNE'nin hücre içindeki artan konsantrasyonu, mitokondriyal geçiş porlarının kalsiyum ilişkili indüksiyonunu tetiklemektedir. Nekroz ya da apoptozla sonuçlanan mitokondriyal kalsiyum alımını ve sitosolik kalsiyum homeostazını değiştirmektedir. JNK'nin aktivasyonu, 4-HNE'nin anti-proliferatif ve apoptotik etkisiyle birlikte araştırılmış ve görülmüştür ki; JNK yolağı, 4-HNE ve Transforming Growth Factor β -1 (TGF β -1)'in birlikte gerçekleştirdiği apoptotik etkisinde önemli rol oynamaktadır. 4-HNE, GSH metabolizmasını olumsuz yönde etkilemekte ve ağır mitokondriyal oksidatif stresi indükleyerek mitokondriyal fonksiyonları bozmaktadır. 4-HNE'nin; FasR, FasL, Bax ve Kaspaz-1,-2,-3 ve -8 gibi birçok düzenleyicinin pro-apoptotik mRNA ve protein ekspresyonlarını artırarak apoptoz mekanizmasında rolü olduğu bildirilmiştir (25).

Başlangıçta lipid peroksidasyonunun toksik son ürünlerinden biri olarak düşünülen 4-HNE'nin etkisi, aslında fizyolojik koşullarda hücre içi mekanizmalarla telafi edilebilmektedir. Ancak, aşırı oksidatif ve karbonil hasarın gerçekleştiği durumlarda etki telafi edilemez hale gelmekte ve hücre kendini apoptoz, nekroz ya da otofaji gibi çeşitli ölüm yollarına sevk etmektedir (202).

2.4. Poli ADP-Ribozilasyon

1960'ların ortalarında polinükleotit biyokimyacıları için oldukça dar bir ilgi alanı olarak keşfedilen poli ADP (adenozin difosfat) ribozilasyonun (PARlasyon) çalışma alanı bilim dünyası ve araştırmacılar için uzunca bir süre sabit bir alan olarak kalmıştır. 1980'lerin sonlarına doğru yeni araştırmacılar, taze fikirler ve son tekniklerle bu mekanizma hakkında ortaya çıkan olağanüstü etkiler kanıtlanmaya başlamıştır ve bu alandaki araştırmalar oldukça nefes kesici hale gelmiştir.

Özel bir “posttranslasyonel modifikasyon” sistemi olarak ortaya çıkan PARlasyon; DNA tamiri ile ilişkilendirilmiş ve biyolojinin neredeyse tüm alt disiplinlerine dahil olmuştur. Ayrıca, birçok patofizyolojik durumdaki rolü nedeniyle, tıp araştırmacıları ve ilaç firmaları tarafından özel bir ilgi odağı haline gelmiştir (206).

2.4.1. Tarihçe

40 yıl önce, Strasburg'ta, Pierre Chambon, J.D. Weill ve Paul Mandel isimli araştırmacılar, sıçan karaciğer nükleer özütlerinde, poliadenilik asit üzerine nikotinamid mononükleotit eklenmesi sentezini keşfetmişlerdir. Aynı grup 1963'te poli ADP-riboz metabolizması üzerine DNA-bağımlı poliadenilik asit sentez eden yeni bir enzimin nikotinamid mononükleotit aktivasyonu” adlı bir yayın çıkarmışlardır (207). Sıçan karaciğer nükleusunda bu yeni enzim tarafından sentezlenen bilinmeyen bileşimin yapısı, daha sonra poli ADP riboz yapısını yayımlayan 3 laboratuvar tarafından çözülmüştür (208, 209).

Ökaryotlardaki poli ADP riboz polimeraz (PARP) aktivitesine ilgi, Sidney Shall ve ekibi tarafından bir salyangoz (*Physarum polycephalum*) türünde polimerize edici aktivitenin karakterize edilmesiyle başlamıştır (210). Riboz-riboz bağlarını ayıran enzim olan poli ADP riboz glikohidrolaz (PARG), 1971'de Masanao Miwa ve Takashi Sugimura tarafından keşfedilmiştir, ancak poli ADP-riboz'un dallanmış yapısını tanımlamak çok daha fazla zaman almıştır (208).

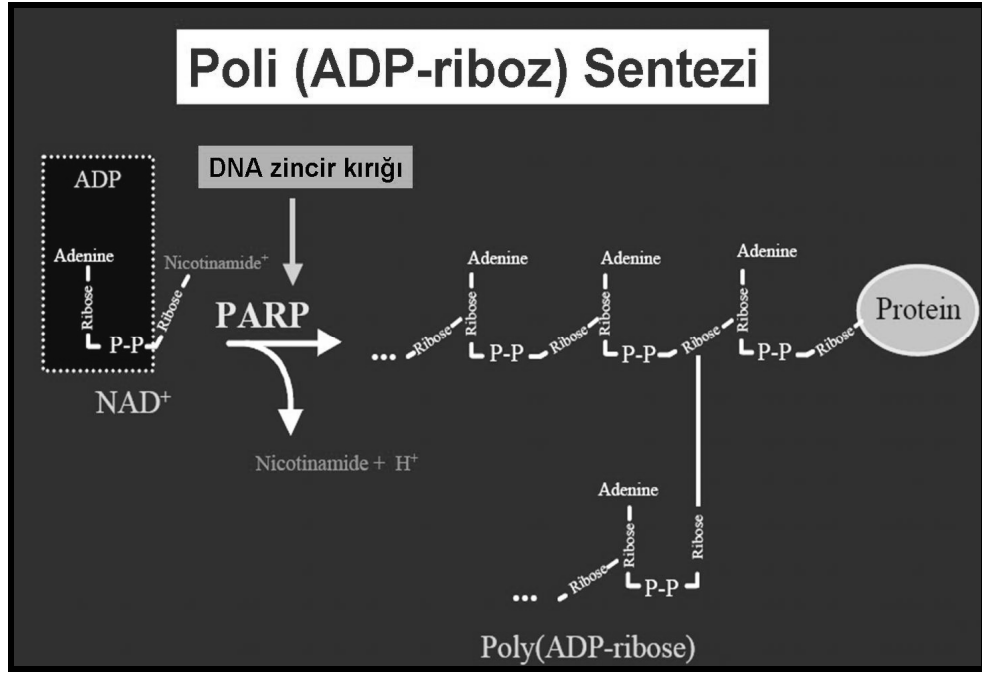
Poli ADP ribozilasyon'un DNA tamirinde rol aldığının ilk kanıtı 80'li yılların başında, PARP'ın en etkili inhibitörü olan 3-aminobenzamid (3-ABA) ile muamele edilen hücrelerin DNA hasarı ajanlarına karşı hassas hale geldiği gösterilerek ortaya çıkmıştır (211, 212).

Klasik kromatografi metodları bazı araştırmacıların PARP'ı homojen olarak saflaştırmasına izin vermiştir. Saflaştırılmış PARP'ın bulunması önemli biyokimyasal çalışmalar yapılmasına olanak sağlamıştır (213, 214).

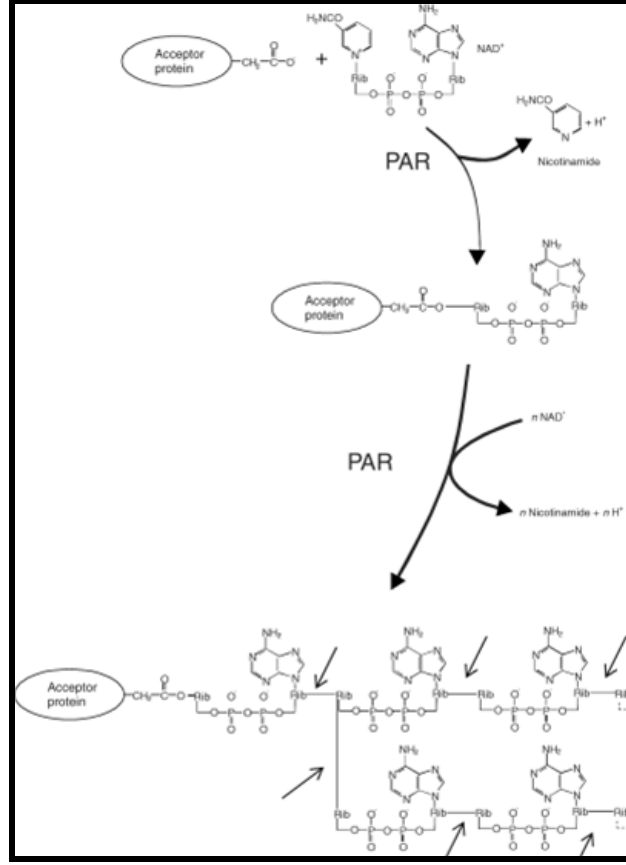
Poli ADP riboz polimerazların enzim olarak keşfinden, DNA tamiri ve hücre ölümündeki rolüne kadar geçen sürede, bu enzimin çeşitli mekanizmalardaki rolü aydınlatılmıştır. Moleküler ve genetik yaklaşımların oldukça önemsendiği günümüzde, PARP'ların gen düzeyindeki etkileri araştırılmakta ve ortaya çıkan sonuçların klinik bulgularla desteklenerek, birçok kronik rahatsızlığın tedavisine ışık tutacağı düşünölmektedir.

2.4.2. Poli ADP Ribozilasyon Mekanizması

Poli ADP ribozilasyon, poli ADP riboz polimerazlar (PARP) olarak bilinen bir enzim ailesi tarafından katalizlenen ve ökaryotik hücrelerde bulunan proteinlerin en etkili post-translasyonel modifikasyondur. İnsan genomunda PARP ailesi üyelerini oluşturan 18 farklı gen tanımlanmıştır (215). Poli ADP Ribozilasyon metabolizması, DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması, transkripsiyonal regülasyon, sentromer fonksiyonu ve mitotik iğ oluşumu, sentrozomal fonksiyon, telomer dinamikleri, apoptoz ve nekroz gibi biyolojik olaylarda ve süreçte rol oynamaktadır (215). Poli ADP ribozilasyon, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) bağımlı bir enzim olan PARP'lar tarafından katalizlenen ve DNA zincir kırıkları ile aktive olan hızlı bir hücresel cevaptır (216). PARP enzim ailesi, substrat olarak kullandığı nikotinamid dinükleotitten (NAD^+) “nikotinamid” kısmını koparıp, kalan ADP riboz moleküllerini birleştirerek poli ADP riboz (PAR) polimerlerini sentezlemektedir (Şekil 2.4.1). Oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarının büyük çoğunluğunda koenzim olarak görev yaptığı bilinen NAD^+/NADH biyomolekülleri çok yönlü kullanılmakta ve çeşitli ADP-ribozil transfer reaksiyonlarında substrat olarak görev yapmaktadır.



Şekil 2.4.1. Poli ADP riboz sentezi.



Şekil 2.4.2. Poli ADP riboz yapısı.

Poli ADP ribozilasyon mekanizması, iyonize radyasyon, alkile ajanlar ve oksidanlar tarafından indüklenen DNA hasarına en hızlı hücrel yanıtı vermektedir. DNA tek ve çift zincir kırıklarının varlığında poli ADP ribozilasyon çok nadir gerçekleşen bir olaydır, ancak DNA hasarı 100 kat artarsa bu mekanizmanın aktivitesi de artmaktadır. Bu koşullar altında poli ADP riboz'un yaklaşık %90'ı PARP-1 tarafından sentezlenmektedir. PARP-1 normalde hücrelerde ekspres edilmektedir, ancak DNA zincir kırıklarıyla aktive olarak ekspresyonu artmaktadır (217).

DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bu hücrel yanıtta, PARP'lar NAD^{+} 'in nikotinamid ve riboz arasındaki glikozidik bağlarını parçalayarak, "hedef proteinlerin" glutamik asit, aspartik asit ve lizin rezidülerine ADP-riboz ünitelerinin kovalent olarak eklenmesini (modifikasyonu) gerçekleştirmektedir (Şekil 2.4.2) (217).

Böylece, oluşan DNA hasarı tamir edilmektedir. Bu mekanizma fizyolojik durumda normal bir şekilde çalışırken, aşırı DNA hasarının meydana geldiği durumlarda, PARP'ın da aşırı aktivasyonu normalden fazla NAD^{+} tüketilmektedir. Dolayısıyla, hücrenin enerji metabolizmasında çöküşe neden olan bu

durum aynı zamanda hücreyi apoptoz ve nekroz gibi çeşitli ölüm yollarına sürüklemektedir.

2.4.3. PARP Süper Ailesi

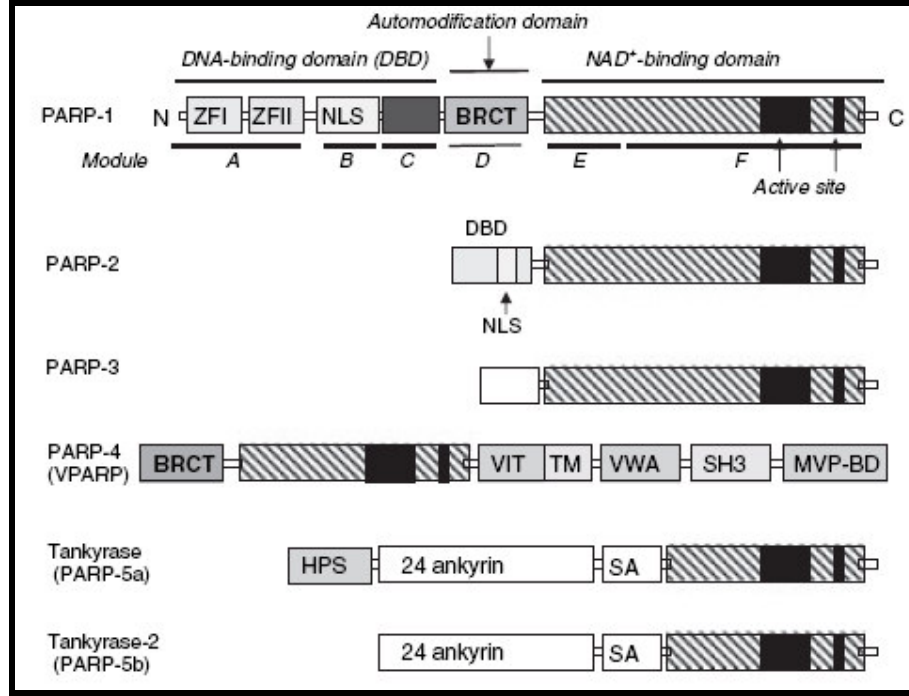
Poli ADP ribozilasyon mekanizması, farklı genlerle ifade edilen ve 18 üyesi bulunan geniş bir enzim ailesi ile sürdürülmektedir (218).

İnsan PARP ailesi proteinlerinin karakterizasyonu, insan PARP-1 katalitik domeyni (GenBank XP_037275 residues 796-1014) kullanılarak, geniş çapta sürdürülen, protein veri tabanının (NCBI) araştırılmasına dayanmaktadır (219). Poli ADP riboz polimeraz aktivitesi taşıyan 18 farklı PARP homoloğu bulunmuştur (34). PARP ailesinin bütün üyelerinin yapı ve fonksiyonlarını anlamak için yapılan çalışmalar olsa da, en çok PARP-1 enzimi üzerinde çalışılmaktadır. PARP-2, PARP-3, PARP-4 (vPARP), PARP-5a (tankiraz-1) ve PARP-5b (tankiraz-2) gibi diğer PARP enzimleriyle ilgili çalışmalara kıyasla en çok çalışılan protein olan PARP-1 enziminin birçok dokudaki varlığı kanıtlanarak, poli ADP ribozilasyon mekanizmasının %90'ını yürüttüğü bilinmektedir (217).

2.4.3.1. PARP-1 Proteini

PARP ailesinin prototip enzimi PARP-1'dir. 40 yıl önce Chambon, Weill ve Mandel tarafından keşfedilen PARP-1, önceleri sadece biyokimyacılar tarafından en ilgi çekici ve tartışmalı araştırma alanı iken, daha sonra radyobiyologlar, toksikologlar, genetikçiler, moleküler biyologlar, farmakologlar, hücre biyologları ve diğer biyolojik disiplinlerdeki uzmanlar tarafından da dikkate alınmaya başlamıştır (207).

PARP-1 yüksek oranda korunmuş nükleer bir proteindir. Yapısında A'dan F'ye modül olarak ayrılabilen karakteristik 3 domeyn taşımaktadır (Şekil 2.4.3). Bu bölgeler; N terminal ucunda yer alan 42 kDa'luk "DNA bağlayıcı domeyni", merkezde bulunan 16 kDa'luk "Otomodifikasyon domeyni" ve C terminal ucunda yer alan 55 kDa'luk "Katalitik domeyni"dir (217).



Şekil 2.4.3. PARP protein ailesi üyelerinin yapısal organizasyonu. BRCT, BRCA1 C-Terminal; DBD, DNA-bağlanma domeyni; HPS, His-Pro-Ser'den zengin domeyn; MVP-BD, majör Vault bağlanma domeyni; VIT, vault protein interalfa-tripsin domeyni; VWA, von Willebrand faktör tip A domeyni; ZF, çinko parmak; TM, transmembran domeyni; SAM, steril a-modülü; SH3, src homolojibölgesi (217).

PARP-1'in DNA bağlayıcı domeyni, yapısında bulunan 2 çinko parmak yapısı sayesinde tekli yada çiftli DNA zincir kırıklarına yüksek afinite göstererek bağlanmaktadır (216). İlk çinko parmak yapısı, PARP-1'in DNA zincir kırıkları tarafından aktivasyonu için gereklidir, ancak ikincisi PARP-1'in tekli zincir kırıkları tarafından aktivasyonu için gerekli iken, çiftli zincir kırıklarında gerekli değildir. DNA kırıklarının olmadığı durumlarda PARP-1, bazal düzeyde, düşük enzim aktivitesi göstermektedir.

PARP-1'in otomodifikasyon domeyni "glutamik asit rezidüleri"nce zengindir. Bu rezidüler poli ADP ribozilasyonun gerçekleştiği esas yerlerdir. Ayrıca bu domeyn, DNA hasar tamiri ve hücre siklusu kontrol noktasi proteinlerinin birçoğunda bulunan BRCA1 (Breast cancer 1) C-terminal motifini de içermektedir.

55 kDa'luk C-terminal katalitik domeyn, NAD⁺ bağlanma, ADP-ribozil transferi ve dallanma reaksiyonları için gerekli rezidüleri içermektedir. C-terminal katalitik fragmentinin kristal yapısı, mono ADP ribozil transferazlar olarak görev yapan bakteriyel toksinlerle şaşırtıcı bir homoloji göstermektedir(217).

PARP-1 normalde ekspre olduğunda, iyonize radyasyon, alkile ajanlar ve oksidanlar tarafından indüklenen DNA hasarına karşı en uygun ve etkili hücresel yanıt olan poli ADP ribozilasyonu gerçekleştirir. PARP-1'in etkileşimde

bulduğu bazı ortakları arasında, PARP-2 ve PARP-3 gibi PARP ailesinin diğer üyeleri de bulunabilmektedir (34).

2.4.3.2. PARP Ailesinin Diğer Üyeleri

PARP-1 geni susturulmuş farelerden elde edilen embriyo fibroblastlarında PARP aktivasyonunun gösterilmesi, PARP-1 enzimi dışında başka PARP'ların da olduğunun bir kanıtı olarak ortaya çıkmıştır (220). Ayrıca, farklı hücre hatlarıyla yapılan araştırmalar sonucunda 4 yeni PARP daha tanımlanmıştır. Bunlar; PARP-2, PARP-3, PARP-4 (vPARP) ve PARP-5 (Tankiraz)'dir. Şaşırtıcı olarak, bu proteinler arasındaki homoloji PARP-1'in C-terminal bölgesinin yarısıyla sınırlıdır ve bu bölgeye aynı zamanda "PARP homoloji domeyni" de denmektedir. PARP homoloji domeyni, PARP-1'in proteolizi ile sınırlanmış katalitik domeyn olarak tanımlanmıştır. Yüksek oranda korunmuş olan bu domeyn, 40 kDa'luk katalitik aktivite için etkili bir fragmenttir ve bu bölgenin (PARP-1, aa 654-1014) kristal yapısı da çözümlenmiştir. PARP ailesinin ilk beş üyesinin katalitik domeynleri karşılaştırıldığında, bu proteinlerin yapısal üniteleri içinde toplanan amino asit benzerlikleri dikkati çekmektedir. Bu PARP enzimlerinin içinde, en küçük PARP domeynini Tankiraz'lar içermektedir, ayrıca bu protein tersiyer yapısını da yüksek oranda korumaktadır (206, 217).

PARP-2'nin keşfi, PARP-1 eksik farelerden elde edilen embriyonik fibroblastlardaki rezidüel DNA-bağımlı PARP aktivitesinin varlığıyla ortaya çıkmıştır. PARP-2'nin katalitik domeyni PARP-1 ile %69 benzerlik göstermektedir. Sıçanlarda yapılan çalışmalarla PARP-2'nin kristal yapısına bakıldığında, PARP-1'inki ile benzer olduğu ortaya konmuştur, ancak, akseptör bölgelerinin çevresinde substrat farklılığına dayanan değişiklikler mevcuttur. PARP-2'nin DNA bağlanma domeyni PARP-1'den farklıdır ve PARP-2, DNA kırıklarının değil, DNA boşluklarını hedef almaktadır. Bu domeyn, 75 aa içermekte ve proteini nükleusta lokalize etmektedir.

PARP-2, PARP-1 ile etkileşim halindedir. SSBR (single strand base repair) ve BER (base excision repair) gibi DNA kırık tamiri ilişkili yollarda rolleri vardır. PARP-1 ve PARP-2, kinetokor yapısı ve mitotik iğ kontrol noktalarından sorumlu proteinlerle de etkileşmektedirler. Ayrıca, sadece PARP-2'ye özgü hedef proteinlerde keşfedilmeye başlamıştır. Telomerik protein-2 (TRF-2) bunlardan biridir ve telomer bütünlüğünün kontrolüyle bağlantılı olduğu düşünülmektedir (221).

DNA hasarına karşı oluşturulan hücrel yanıtta PARP-2'nin rolü, PARP-2 geni susturulmuş fare modellerinin oluşturulması sayesinde araştırılmıştır. Bu modele, alkile edici ajan olarak N-metil N-nitrozüre (MNU) verilmiş ve PARP-2 bulunmayan hücrelerde DNA zincir kırıklarının ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu sonuç PARP-1 bulunmayan farelerde gözlenen sonuçla aynıdır. Böylece PARP-2, ADP riboz polimerleri sentezlemek için az kapasiteye sahip olmasına rağmen, SSBR yollarında aktif bir oyuncudur (216).

PARP-3, hücre siklusu boyunca kardeş sentriollerde yerleşen sentrozomun öz (core) bileşeni olarak tanımlanmıştır (222). Bütün PARP'lar içinde, sadece 54 rezidüsü bulunan, en küçük N-terminal domeyni içeren ve sentrozomal

lokalizasyondan sorumlu tek protein PARP-3'tür. PARP-3, PARP-1 ile %61 benzerlik gösteren E ve F domeynlerini paylaşmaktadır. PARP-3 aktivitesi oldukça çok zor belirlenmektedir ve PARP inhibitörü 3-ABA ile kesinlikle inhibe edilememektedir.

PARP-4 (vPARP), bu enzim PARP süper ailesinin 192,6 kDa'luk en büyük üyesidir ve "vault" partiküllerle ilişkili olduğu keşfedilmiştir (223). PARP-4, majör vault protein (MVP) ve telomeraz ilişkili protein (TEP-1) olarak bilinen ve evrimsel olarak yüksek oranda korunmuş olan iki proteinle ve transle edilmemiş vRNA (vault RNA) ile ilişkili, sitoplazmik bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksidir. Bu alışılmamış partiküllerin fonksiyonu bilinmemektedir ancak, hücresel taşımada rolleri olabileceği düşünülmektedir. PARP-4 aynı zamanda nükleer porlarda lokalizedir ve mitoz sırasında mitotik iğ ile ilişkilidir. Domeyn yapısı da diğerlerinden biraz farklıdır, E ve F domeynleri proteinin N-terminal kısmında bulunmaktadır. PARP-4, MVP'nin poli ADP ribozilasyonunu katalizleyebilen saflaştırılmış "vault" partikülleridir. Protein N-terminal ucunda BRCT-motifi içeren domeyni ve multiprotein komplekslerde genel bir yapı olarak görülen von Willebrand faktörün tip A domeynini içermektedir (224).

Tankiraz-1 (TRF1-etkileşimli, ankyrin-ilişkili ADP-riboz polimeraz), (PARP-5a), insan telomerik proteini TRF-1'in ortağı olarak tanımlanmıştır (225). PARP enzimatik aktivitesine sahip olan ve PARP-1 ile homoloji gösteren en küçük domeyni içermektedir. Katalitik bölge mesafesi, 353 aa'lık PARP-1 ile karşılaştırıldığında sadece 240 aa'lıktır. N-terminal domeyninde His, Pro ve Ser motifi (HPS) bulunmaktadır. Tankiraz-1'in aşırı ekspresyonu, TRF1'in ADP ribozilasyonunu ve telomerlerden salınımını tetiklemektedir. Yapılan araştırmalarda siRNA ile kapatılan Tankiraz-1 ekspresyonu, kardeş telomerler ayrılmadığından dolayı hücreleri erken anafazda bloklamaktadır.

Diğer bir Tankiraz (PARP-5b veya Tankiraz-2) daha önceden keşfedilen ayrı bir gen ile kodlanmaktadır. Bu proteinin sekansı, Tankiraz-1 ile %85 benzerlik göstermektedir ancak HPS motifi bulunmamaktadır (226). Tankiraz-1 ve -2; telomer homeostazı ve artan vezikül alışverişini düzenlemektedir. Bu nedenle, Tankiraz-1 ve -2 telomerler, nükleer porlar, Golgi vezikülleri ve mitoz sırasındaki perisentrioler materyal gibi, hücre içinde çoklu lokalizasyonlar göstermektedir. Tankiraz-2 aşırı ekspre olduğunda, mitokondriyal potansiyelin kaybından dolayı kaspaz-bağımsız hücre ölümünü indüklemektedir. Bu işlem, PARP inhibitörü 3-ABA ile inhibe edilebilmektedir (34, 216).

2.4.3.3. İnsan Genom Sekanslamasında Ortaya Çıkan Diğer PARP Molekülleri

PARP ailesinin diğer üyelerinin biyolojik rolleri araştırırken, domeyn yapıları incelenmiştir. Bu proteinlerin katalitik domeynleri; daha önce tanımlanan PARP'lardan oldukça farklıdır ve bu üyeler; çinko parmak yapısı, Ankyrin, BRCT ve Makro domeyn gibi çeşitli adaptör domeynlerle katalitik domeynlerini birleştirmektedir. PARP-7,-8 ve-13 yapısında bir adet çinko parmak bulundurunken, PARP-12'de üç adet çinko parmak bulunmaktadır. PARP-10 ve -15, çeşitli RNA bağlanma proteinlerinde bulunan RRM (RNA Recognition Motif) ile RNA'lara bağlanabilen özgün bir motif taşımaktadır. Bu motif aynı zamanda tek-zincirli DNA

bağlanma proteinlerinde de bulunmaktadır. PARP-9, DLBCL (diffuse large B-cell lymphomas) bulunan hastalarda keşfedilmiştir. PARP-9 BAL geni tarafından kodlanan nükleer bir proteindir. BAL geni, yüksek risk taşıyan fetal DLBCL'lerde yüksek oranda ekspre olan ve B-hücresi göçünde rol oynayan bir genidir. BAL geninin aşırı ekspresyonu, B-hücresi lenfoma transfektanlarının migrasyon oranını arttırmaktadır. Tüm bu yapılan çalışmalardan elde edilen bu bulgular, diğer proteinlerle etkileşimde olan yeni domeynlerin fonksiyonlarını göstermektedir (34).

PARP ailesinin en ilginç yanı, bazı üyelerinin birbirleriyle olan etkileşim kapasitesidir. Örneğin; PARP-1, PARP-2 ve PARP-3 ile, Tankiraz-1 ise Tankiraz-2 ile etkileşim içindedir (40, 225). Bu tarz kombinasyonlar, bu komplekslerin farklı substratlarla farklı hücre bölümlerinden sorumlu olduğunu göstermektedir. Bu yüzden, birlikte etkileşimleri nedeniyle oluşan biyolojik yanıtlardaki farklılık, PARP'lar için yeni bir organizasyon durumu ortaya çıkarmıştır (216).

2.4.3.4. Poli ADP Riboz Glikohidrolaz (PARG)

ADP riboz polimerlerinin sentezini katalizleyen farklı enzimleri kodlayan bazı genler bilinse de, ADP riboz polimerlerinin serbest ADP riboz'a hidrolizini katalizleyen enzimi kodlayan tek bir gen vardır: PARG geni. 1997'de sığır komplementer DNA'sının (cDNA) şifrelediği proteinin PARG aktivitesi gösterdiği belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (217). İnsan PARG geni 18 ekzon içermektedir ve iç mitokondriyal membran translokaz 23 (TIM 23)'ü kodlayan gen ile 470 baz çiftlik iki yönlü promotörü paylaşmaktadır (227). PARG, hem glikozidik hem de ekzoglikozidik aktiviteye sahip olan bir enzimdir ve ADP riboz polimerlerinin serbest ADP riboz'a hidrolizini katalize ettiği bilinen tek proteindir. PARG, apoptoz sırasında önemi olan kullanılan kaspaz-3 yarıklanma bölgesini de içermektedir. Sonuç olarak; ADP riboz molekülleri PARP ve PARG'nin birlikte etkisi ile canlı hücrelerdeki dinamik döngüsüne devam etmektedir (216, 217).

2.4.4. PARP Aktivasyon Mekanizması

Günümüzde en önemli sorulardan biri PARP enzimlerinin nasıl aktive olduğudur. İstirahatte olan hücrelerde PARP'ların ekspre olmaması genellikle bu proteinlerin bu tip hücrelerde inaktif olduğunu ortaya koymaktadır. DNA hasarına karşı, PARP-1'in aktive olduğu net olarak karakterize edilmesine rağmen, diğer PARP'ların aktivasyonu için gerekli mekanizma hala bilinmemektedir. PARG'nin hücresel glikohidrolaz aktivitesinden dolayı, PARP aktivasyonunun ve ardından oluşan poli ADP ribozilasyonun çok kısa bir zaman aralığında gerçekleştiği düşünülmektedir. DNA hasarı ile uyarılan poli ADP ribozilasyon mekanizması ve ardından gerçekleşen PARG yarıklanması yaklaşık 10 dakika sürmektedir.

PARG tek bir gen tarafından sentezlenmektedir ve çoklu gen ürünlerinin olup olmadığı veya farklı PARP'lara ortaklık eden PARG izoformlarının olup olmadığı bilinmemektedir. PARG, farklı PARP'lar tarafından poli ADP ribozil proteinleri eklenen proteinlerin hidrolizini katalizleyebilmektedir. Örneğin; poli ADP ribozillenmiş Tankiraz ve TRF1, in vitro ortamda PARG tarafından hidrolize edilmiştir (34, 206, 217).

2.4.5. Poli ADP-Ribozilasyonun Biyolojik Fonksiyonları

Poli ADP ribozilasyonun biyolojik fonksiyonları dokuz ana başlık altında özetlenebilir:

1. DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması,
2. Transkripsiyonun düzenlenmesi,
3. Apoptozdaki rolü,
4. Hücre içi aşırı NAD⁺ tüketimi sonucunda nekrotik hücre ölümü ve patolojik durumlardaki rolü,
5. Sentromer fonksiyonlarının düzenlenmesi,
6. Telomer uzunluğunun düzenlenmesi,
7. Protein degradasyonunun düzenlenmesi,
8. Sentrozomal fonksiyon,
9. Endozomal vezikül alışverişinin düzenlenmesi (217).

2.4.5.1. DNA Tamiri ve Genomik Stabilitenin Korunması

Prolifere olan hücrelerde alkilasyon, oksidasyon ve iyonize radyasyon tarafından meydana gelen DNA hasarı ile indüklenen poli ADP ribozilasyon, hücreleri sitotoksik etkiden kurtararak yaşamalarını sağlar. PARP-1 ve onunla ilişkili proteinlerden PARP-2, DNA hasarına yanıt veren PARP ailesi üyelerindedir ve DNA tamiri ve genomik bütünlüğün korunmasında önemli rol oynayarak canlılık faktörlerinin korunmasını sağlamaktadır. PARP-1 ve -2'nin özellikle BER yolağında önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Son yıllarda, birçok grup tarafından mekanizmanın nasıl işlediği konusunda ilgi çekici senaryolar geliştirilmiştir. Bunlar;

- a) DNA hasar bölgesindeki kromatinin lokalize olarak gevşemesi, histonların hem doğrudan modifikasyonu hem de non-kovalent etkileşimini yönlendirmektedir,
- b) Hasarı sinyalle ileten fonksiyonu bulunmaktadır,
- c) Hasarlı bölgeye, poli ADP riboz ile non-kovalent etkileşim sonucunda özgün DNA tamir mekanizmalarının toplanmasıdır (228).

Yapılan son çalışmalar bazı yeni ve ilgi çekici görüşler de ortaya çıkarmıştır. PARP-1, DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması ve prematür yaşlanmadan sorumlu protein olan Werner Sendromu proteininin etkileşim ortağı olarak bilinmektedir. Son zamanlarda, PARP-1'in Werner Sendromu proteininin hem ekzonükleaz hem de helikaz aktivitesini düzenlediği gösterilmiş ve PARP-1 etkisindeki olası mekanizma ortaya konmuştur (229).

Öne sürülen bir diğer senaryo ise, poli ADP riboz'un pirofosforolitik yarıklanmasından elde edilen ATP'nin, BER sürecinde DNA ligasyon basamakları için kullanılmasıdır. Bu nedenle canlı hücrelerde meydana gelen BER'in kısa-parçalı ve uzun-parçalı yollar arasında verdiği kararın, ATP'nin varlığına bağlı olduğu ortaya çıkmaktadır. Enerji açlığının olduğu durumlarda uzun-parçalı yolağın tercih edilmesinin sebebi, bu yolağın poli ADP riboz'dan ATP oluşumunun artmasını sağlamasıdır (230). Dolayısıyla, DNA hasarı indüklü poli ADP ribozilasyon, BER'in klasik rolünün ötesinde bir durum sergilemektedir. PARP-1 ayrıca, p53'ten bağımsız olarak çift zincir kırıklarının tamirini de düzenlemektedir.

Ekzojen kaynaklı herhangi bir DNA hasarının olmadığı durumda, poli ADP ribozilasyonun farklı bir rolü olduğu ortaya çıkmıştır. Testiste, spermiyogenez sırasında spermatid farklılaşması, kromatin yoğunluğu ve bileşimindeki çarpıcı değişiklikler buna örnektir. Spermatid nükleusunun kondenzasyonu, önemli nükleer proteinlerden histon-geçiş proteini-protamin değişimi ile karakterizedir. Endojen ve ekzojen DNA kırıklarına verdiği yanıtla anılan poli ADP ribozilasyonun, spermiyogenezde kromatin kondenzasyonunun en çok gerçekleştiği XI-XIV arasındaki seminifer tübül basamaklarındaki spermatidlerde meydana geldiği keşfedilmiştir. Sperm hücresinin matürasyon basamaklarındaki kromatin yeniden modellenmesi sırasında ortaya çıkan endojen DNA zincir kırıklarının tamirini ADP riboz polimerleri kolaylaştırmaktadır (37, 217).

2.4.5.2. Transkripsiyonun Düzenlenmesi

Poli ADP ribozilasyonun, kromatin yeniden modellenmesi ile gen ekspresyonunu düzenlenmesini etkilediği uzun zamandır bilinmektedir. Ayrıca, PARP-1'in transkripsiyon faktörleri ile birçok fiziksel ve fonksiyonel etkileşimde bulunduğu da belirtilmiştir (231). Örneğin; PARP-1, immün ve inflamatuvar yanıtta önemli bir kofaktör olduğu bilinen Nükleer Faktör- κ B (NF- κ B) bağımlı gen ekspresyonunda önemli rol oynamaktadır (232).

2.4.5.3. Apoptozdaki Rolü

PARP-1'in nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) içeren domeyninden, kaspaz-3 ve -7 tarafından yarıklanması sonucunda 24 ve 89 kDa'luk iki adet fragment oluşturmaktadır ve bu nedenle yarıklanmış PARP (cPARP) apoptozun biyokimyasal bir belirteci olarak sıklıkla kullanılmaktadır. DNA zincir kırıkları varlığında kaspaz ilişkili PARP-1 yarıklanmasının, PARP-1'in katalitik aktivitesinin kaybına neden olduğu düşünülmektedir. Apoptozun erken evrelerinde gözlenen aşırı PAR oluşumu, PARP ailesi proteinlerinin bu süreçte görevli olduğunu göstermektedir. Ayrıca PARP-1 aktivasyonu, apoptoz indükleyici faktörün (AIF) mitokondriden nükleusa translokasyonundan sorumludur ve AIF, PARP-1 bağımlı hücre ölümünde gereklidir. Bilindiği gibi, AIF tarafından indüklenen apoptotik yolak kaspaz bağımsızdır. Dolayısıyla PARP-1 aktivasyonu; hem kaspaz bağımlı hem de AIF-indüklü apoptotik yollarda rol oynayabilir (233).

2.4.5.4. Hücre İçi Aşırı NAD⁺ Tüketimi Sonucunda Nekrotik Hücre Ölümü ve Patolojik Durumlardaki Rolü

Yirmi yıl önce, PARP-1'in aşırı aktivasyonuna bağlı olarak ortaya çıkan hücre ölüm mekanizması ve PARP-1'in substratı olan NAD⁺'ın şiddetli ve geri dönüşümsüz tüketimi ilk kez gösterilmiştir (56). Bu paradigma daha sonra, deneysel olarak memeli sistemlerde ve bitkilerde de doğrulanmıştır (234). Bu mekanizmanın, iskemi reperfüzyon hasarı ve inflamatuvar süreçlerle ilişkili patofizyolojik durumların büyük çoğunluğunda önemli bir rol oynadığı son yıllarda gösterilmiştir. PARP-1'in aşırı aktivasyonu ile aşırı tüketilen NAD⁺ dolayısıyla tetiklenen mitokondriyal disfonksiyon ve ardından meydana gelen hücre ölümü, PARP'in aşırı aktivitesinde ortaya çıkan önemli bir olaydır. Bu mekanizmaya dayanarak günümüzde bazı hastalıkların tedavisinde, PARP inhibitörlerinin sunacağı terapötik yaklaşımlar geliştirilmektedir (217).

2.4.5.5. Sentromer Fonksiyonunun Düzenlenmesi

Esas ve geçiş sentromer proteinlerinin her ikisi de PARP-1 ve PARP-2 ile etkileşmekte ve poli ADP ribozilasyonu devam ettirmektedir (216). Dolayısıyla, poli ADP ribozilasyonun temel kinetokor proteinler için düzenleyici olarak görev yaptığı düşünülmektedir. PARP-2 lokalizasyonu sentromerde göze çarparken, PARP-1 geniş sentromerik ve perisentromerik dağılım göstermektedir (235). Yapılan çalışmalarda, radyasyon indüklü DNA hasarı sırasında memeli sentromerinin yapısını ve kontrol noktası proteinlerinin fonksiyonlarını düzenleyen moleküller olarak PARP-1 ve PARP-2'nin ayrı ayrı rolleri ortaya konmuştur. Ayrıca, mikrotübüller ve mikrotübül ilişkili proteinleri içeren önemli iğ bileşenlerine ek olarak, iğın yeni bir bileşeni olarak poli ADP riboz tanımlanmıştır (216). PAR'ın varlığı, bipolar iğ oluşumu ve fonksiyonu için gereklidir (217).

2.4.5.6. Telomer Uzunluğunun Düzenlenmesi

Poli ADP ribozilasyon telomer uzunluğunun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan araştırmalarda, PARP ailesinden Tankiraz'ların aşırı nükleer ekspresyonu ile telomerlerin uzamasını indüklediği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, Tankiraz-1'in, poli ADP ribozilasyon mekanizması ile TRF1'i modüle ederek, telomerazın telomerik komplekse ulaşmasını düzenlediği ileri sürülmektedir (236).

2.4.5.7. Protein Degredasyonunun Düzenlenmesi

Proteozom, hücre içi proteolizin önemli bir kısmından sorumlu olan ve bütün ökaryotik hücrelerde bulunan büyük, multikatalitik bir proteazdır. Bu yapı, strese karşı oluşturulan yanıtlarda olduğu gibi, çeşitli kısa-ömürlü proteinlerin fizyolojik olarak geri dönüşümünü sağlamaktadır. Otomodifiye PARP-1, oksidatif olarak hasarlı histonların seçici olarak degradasyonunu kolaylaştıran proteozomu aktive etmektedir (237).

2.4.5.8. Sentrozomal Fonksiyon

Mitotik bölünmeler sırasında sentrozom fonksiyonunun doğru bir şekilde gerçekleşmesi, kardeş hücrelere kromozomların tam ve doğru şekilde aktarılmasında oldukça önemlidir. Hem PARP-1 hem de PARP-3'ün sentrozomlarda stabil bir yapı oluşturdukları belirlenmiştir (222). Sentrozomlarda lokalize olan ve sentrozom duplikasyonunu kontrol ettiği bilinen p53'ün PARP proteinleri tarafından poli ADP ribozillendiği gösterilmiştir (238). Böylece hem PARP-1 hem de PARP-3'ün, poli ADP ribozilasyon mekanizması ile p53 aktivitesini regüle ederek sentrozom duplikasyonunda önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (239). Özellikle PARP-3, hücre döngüsü boyunca kardeş sentriollerde lokalizedir. PARP ailesinin bir diğer üyesi olan Tankiraz da sentrozoma yerleşmiştir. Tankiraz, mitoz sırasında nükleer mitotik aparat proteini (NuMa) ile birlikte lokalize olur ve bu yapı sentrozomda stabil bir kompleks oluşturur (240).

2.4.5.9. Endozomal Vezikül Alışverişinin Düzenlenmesi

Tankirazların telomer dinamikleri üzerinde önemli etkileri olsa da, bu proteinlerin çoğu hücre nükleusunun dışında bulunmaktadır. Tankiraz'ın 182

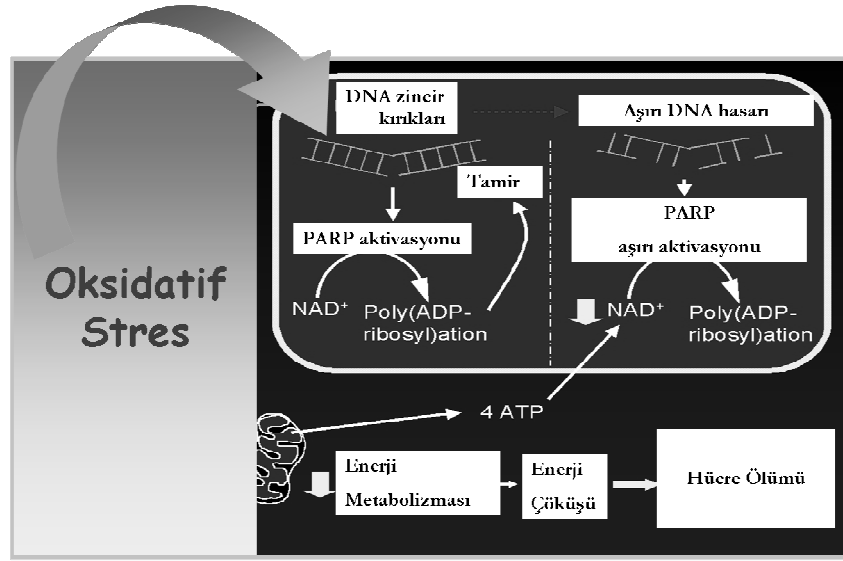
kDa'lık Tankiraz bağlayıcı protein ile etkileşim içinde olduğu açıklanmıştır. Aynı zamanda nükleusta heterokromatin benzeri boyanma özelliği gösterdiği ve sitoplazmada da kortikal aktin ile birlikte lokalize olduğu ortaya çıkmıştır. Miyosit ve adipositlerdeki endositotik veziküller, Glut4 ve IRAP gibi glukoz taşıyıcıları içermektedir. Golgi ve plazma membranındaki Glut4 vezikülleri arasında gerçekleşen geri dönüşümlü Glut4 translokasyonu, insülinin glukoz kullanımını düzenlemesine yardım etmektedir. Tankiraz burada önemli bir insülin-sinyal hedefi olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, Tankiraz Golgi'deki Glut4 depo veziküllerine yerleşmiş IRAP ile etkileşmekte, aynı zamanda da Mitojen Aktive edici Protein Kinaz (MAPK) tarafından fosforile edilmektedir. Tankiraz kendisi ve IRAP'ı poli ADP ribozillemektedir ve aktivite MAPK-ilişkili fosforilasyon ile arttırılmaktadır. Sonuç olarak, Tankiraz ve MAPK yolağı tarafından Glut4 veziküllerinin uzun-dönem regülasyonu sağlanmaktadır (241, 242).

2.4.6. PARP-1 ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki

Oksidatif stres, reaktif oksijen (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengesizlik ile karakterizedir. ROS ve/veya RNS'nin aşırı üretimi, doku hasarı, hücre membranlarının lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA'daki değişiklikler (zincir kırıkları ve baz modifikasyonları) ile sonuçlanmakta ve ayrıca, iskemi/reperfüzyon hasarı, sistemik inflamasyon, septik şok, diyabet, inme ve artrit gibi birçok akut ve kronik rahatsızlığın patogenezeine katkıda bulunan önemli yolakları aktive etmektedir.

Poli ADP ribozilasyonun biyolojik rolleri oldukça karmaşıktır ve birçok fonksiyon içermektedir. PARP-1'in DNA tamiri ve genomik bütünlüğün korunmasındaki rolü gösterilmiş olup, replikasyon ve farklılaşma gibi olaylarda rol oynayan çeşitli proteinlerin ekspresyonlarını transkripsiyonel düzeyde düzenlediği de bilinmektedir. Daha da fazlası, PARP-1 aktivasyonunun, dokudan uzaklaştırılması gereken ağır hasar görmüş hücrelerin elenmesine yönelik yolaklarda da rol aldığı belirtilmiştir. PARP-1 ilişkili hücre ölümü; hücre ölüm tiplerinin en son istenen durumu olan nekrozda da meydana gelmektedir.

PARP'ın farklı koşullar altındaki rolü, DNA hasarına maruz bırakılan hücreler ile en iyi şekilde açıklanmaktadır. Hafif genotoksik zarar PARP aktivasyonunu indükleyerek, DNA tamirini ve hücrenin canlı kalmasını kolaylaştırmaktadır. Orta derecede hücre hasarında, tamir edilemez derecede DNA hasarı bulunan hücreler apoptoz yolağı aktive edilerek elimine edilmektedir. Şiddetli DNA hasarının olduğu durumda ise, PARP aşırı aktive olmakta ve hücre içi enerji metabolizmasını çökerterek hücreyi nekroza sürüklemektedir. Genellikle ağır oksidatif ve nitrosatif stresle tetiklenen büyük DNA kırıkları PARP'ın aşırı aktivasyonuna neden olurken, ardından PARP'ın substratı olan NAD⁺'in ve dolayısıyla ATP'nin de tükenişi gerçekleşmektedir. Bu enerji çöküşü hücre disfonksiyonuna neden olmakta ve nekrozla sona ermektedir (Şekil 2.4.4). PARP'ın apoptoz ve nekroz arasında moleküler anahtar olarak rol oynadığı yapılan çeşitli deneylerle kanıtlanmıştır (217).



Şekil 2.4.4. Oksidatif stresin Poli ADP ribozilasyona etkisi.

2.4.7. PARP-1 ve Spermatogenez Arasındaki İlişki

İnsanda testis belirleyici faktörün (TDF), diğer memelilerde ise testis belirleyici Y lokusunun (*Tdy*) en önemli anahtar düzenleyicisi olan *SRY/Sry* (*Sex-determining region Y*), embriyolojik gelişim sürecinde testis oluşumu ve farklılaşmasından sorumludur (243). *SRY/Sry*, aynı zamanda diğer cinsiyet belirleyici proteinlerle ya da kofaktörlerle etkileşimde bulunan transkripsiyonel düzenleyici komplekslerini oluşturmaktadır. Ayrıca, biyolojik fonksiyonları da düzenleyen bu kompleksler otozomal ve/veya X kromozomu üzerindeki genler tarafından kodlanırlar (244, 245). Günümüzde *SRY/Sry*'nin TDF'yi hangi moleküler mekanizmalarla düzenlediği bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, birçok transkripsiyonel fonksiyonu düzenleme yetisi bulunan *SRY/Sry*'nin regüle ettiği proteinleri keşfetmek yönündedir.

In vivo ve *in vitro* koşullarda, PARP-1'in *SRY/Sry* ile ilişkili bir protein olduğu gösterilmiştir (246). PARP-1'in ve *SRY*'nin, cinsiyet belirlenmesi sırasında fetal gonadlarda gelişen Sertoli hücrelerinin nükleusunda birlikte lokalize olduğu ortaya konmuştur. Gonadogenez sırasında, PARP-1, *SRY*'nin hedef genlerini düzenler. PARP-1 knock-out farelerle yapılan çalışmaların sonucunda, PARP-1 proteininin *SRY*'nin alt yollarında görevli genlerinin ekspresyonlarını değiştirdiği ve dolayısıyla PARP-1'in cinsiyet belirlenmesinde *Sry* düzenleyici fonksiyonları olduğu ortaya çıkmıştır.

Son zamanlarda, testiste PARP ailesi proteinleri üzerine yapılan çalışmaların sayısı oldukça artmaktadır. Özellikle PARP-1 ve PARP-2'nin insan ve sıçan testisindeki varlığı, hangi hücre tiplerinde ekspre olduğu ve patolojik durumlardaki ekspresyon şiddeti en çok tartışılan konular arasındadır (247).

PARP-1 mRNA'sının bütün dokularda farklı seviyelerde bulunduğu ancak, testis, dalak ve timusta yüksek seviyede var olduğu belirlenmiştir Testis dokusunda PARP ekspresyonu ile ilgili çalışmalar ilk olarak sıçanlarda yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, PARP'ın spermatogonya ve pakiten spermatozoid nükleusunda yoğun olarak lokalize olduğu gösterilmiştir. İnsan testis örnekleriyle yapılan çalışmalarda ise, PARP-1 ve PAR aktivitesi esasen testiküler germ hücrelerinde lokalize iken, somatik testiküler hücrelerde PARP aktivitesi mevcut değildir (40).

Poli ADP ribozilasyonun genel olarak, kromatin yeniden modellenmesinde ve herhangi bir nedenle oluşan DNA hasarına karşı gerekli yanıtı vererek DNA bütünlüğünün sağlanmasında önemli rolü olduğu bilinmektedir. Böylesine önemli bir durumdan sorumlu proteinler olan PARP'ların germinal hücrelerdeki varlığı oldukça dikkat çekicidir. Germinal hücrelerin mayoz bölünmelerdeki olaylar tarafından şekillendiği bilinmektedir: (1)DNA replikasyonu spermatogonyada ve mayozdan önce primer spermatozoidlerde meydana gelir, (2)spermatogonya, spermatozoidler ve erken spermatozoidlerin DNA transkripsiyonu aktiftir, ancak geç spermatozoidler ve spermatozoidin tamamı inaktiftir, (3)DNA kırıklarının oluşması ve tamiri (rekombinasyonel tamir) arasında geçen sürenin düzenlenmesi primer spermatozoidlerde meydana gelir, (4)geç spermatozoidler nükleer kondenzasyonunun son aşamasından önce kendi DNA hasarlarını tamir edebilirler. Bu aşamalarda meydana gelen hasarların fark edilmesi ve tamirinde PARP'ların, özellikle PARP-1 ve PARP-2'nin, önemli rolleri olduğu ortaya çıkmıştır. PARP-1 ve PARP-2'nin sıçan primer spermatozoidlerinde yüksek oranda ekspre olduğu bilinmektedir (49). Ayrıca spermatogenezin özgün evrelerinde PARP'ların rolü olduğuna dair kanıtlar vardır.

Spermatogenezde, birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında DNA çift zincir kırıkları meydana gelmektedir. Oluşan bu kırıklar, genetik farklılığı ve kromozom ayrışmasını doğru gerçekleştirmek üzere tamir edilmektedir. Diğer bir yandan, farklılaşan spermatozoidlerde kromatinin sıkı paketlenmesi sırasında (kondenzasyon) DNA kırıkları ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla, PARP-1'in ve PAR polimerinin; kalıcı ve devamlı ekspresyonu ve erkek germ hücrelerindeki subsellüler lokalizasyonu, insan germ hücre farklılaşmasında poli-ADP-ribozilasyon için anahtar rolü oynamaktadır. PARP-1 ve PARP-2 enzimleri post-mayotik hücrelerde ekspresyonlarını kaybeder (40, 49), dolayısıyla parp-1 geni spermde kapalıdır (248).

Bu bulgular, genomik bütünlüğün gardiyarı olarak görev yapan bu proteinleri germinal hücre farklılaşmasının mayotik bölünme gibi önemli basamaklarına yerleştirdiğini göstermektedir. Mayoz bölünme sürecinde, DNA tamir enzimlerinin memeli spermatogenezinde belirgin bir önemi vardır (249), ayrıca, epigenetik histon modifikasyonları da mayotik ve post-mayotik evrelerde önemli rol oynamaktadır (250). Poli ADP ribozilasyonun, hem DNA tamir mekanizmalarında hem de epigenetik bilgiye katkı sağladığı dikkat çekmektedir (217). Ancak PARP-1 ve PARP-2 gibi; PARP ailesi üyeleri mayotik hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde farklı roller üstlenebilmektedir.

Poli ADP ribozilasyonun kromatin yeniden modellenmesi basamaklarında rolü olduğu, sıçan spermatogenezinde yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (51). Bu

çalışmaya göre, farklılaşan spermatidlerin kromatinlerinin yeniden modellenmesi esnasında yüksek sıklıkta DNA zincir kırıkları oluştuğu ve bu kırıkların spermiyogenez basamaklarında, özellikle histon-protamin değişiminin gerçekleştiği uzayan spermatid aşamasında olduğu belirlenmiştir (251). Bu çalışmada, spermatogenez sırasında yüksek sıklıkta DNA zincir kırıkları oluştuğu ve buna karşılık yüksek oranda PAR polimeri üretildiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, poli-ADP-ribozilasyonun mayoz bölünme esnasında kromatin yeniden modellenmesine ek olarak; spermatidin nükleer kondenzasyonunu da kapsadığını göstermiştir. Bu süreçlerde, infertilitede önemli rolü olduğu öne sürülen sperm kromatin bütünlüğünün sağlanmasında PARP proteinlerinin önemi ortaya konmuştur. Yüksek seviyede PARP-1, tüm spermatogonya tiplerinde sürekli olarak ekspre edilmektedir. Bu bulgular, spermatogonyada DNA bütünlüğünün korunması için gardiyan gibi davranan PARP-1'in varlığını kanıtlamaktadır.

2008 yılında Agarwal ve ekibi tarafından yapılan bir çalışmada, PARP'ın ejaküle insan spermindeki apoptotik formunun varlığı ve apoptozla ilişkisi açıklanmıştır. Bu araştırmaların sonucunda, PARP'ın apoptotik formu olan cPARP'ın (cleaved PARP) ejaküle spermatozoada flow-sitometri yöntemiyle belirlenebilecek yeni bir apoptotik belirteç olduğu ve kaspaz-3 aktivasyonu ile ilişkili olabileceği ortaya konmuştur. Kimyasal ya da oksidatif stres indüklü hasardan sonra hem immatür hem de matür sperm hücreleri cPARP ekspresyonu göstermektedir. Poli ADP riboz polimeraz inhibisyonu ile ejaküle insan spermindeki erken ya da geç apoptozun insidansının düzenlenebileceği düşünülmektedir (252).

Aynı yıl Sakkas ve arkadaşları tarafından yapılmış başka bir çalışmada ise; varikoselli hastaların testiküler germ hücrelerinde DNA tamiri ve apoptoz belirteçlerinin ekspresyonu ve dağılımı incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda, varikozel hastalarının testislerinde yüksek DNA tamiri ve apoptoz aktivitesinin olduğu ve bu aktivitenin metabolik stresi tetikleyerek spermatogeneze zararlı olabileceği ve sonucunda da apoptozu arttırabileceği gösterilmiştir. Dolayısıyla, Poli ADP ribozilasyon mekanizması araştırıldıkça, bu mekanizmada yer alan cPARP'ın gelecekte birçok patolojinin belirteci olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir (253).

GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada, Akdeniz Üniversitesi “Deney Hayvanları Ünitesi”nden temin edilen toplam 30 adet *Rattus norvegicus* (Wistar) ırkı erkek sıçanlar kullanılmıştır. Tüm sıçanlar standart laboratuvar koşullarında, standart diyet ve musluk suyu ile beslenmiştir. Yedi haftalık ve ağırlıkları 250-350 gr olan yetişkin sıçanlar rastgele olarak 3 gruba ayrılmıştır. 1.Grup sıçanlarda (13 haftalık, varikozel grubu, n=10) deneysel varikozel oluşturulmuştur. 2.Grup sıçanlarda sham operasyonu (n=10) gerçekleştirilmiştir. 3.Grup sıçanlar ise kontrol grubunu oluşturmuştur (n=10). Deneysel varikozel modelinin indüklenmesinden sonra tüm sıçanlar, 13. hafta (n=30) sonunda sakrifiye edilmişlerdir.

3.2. Varikozel Deney Modelinin Oluşturulması

Deneysel varikozel modeli, Terry TURNER tarafından tanımlanan model uygulanarak oluşturulmuştur (254). Xylasin (Rompun®, Bayer AG, 15mg/kg, i.m.) ve ketamin (Ketalar®, Parke Davis, 75 mg/kg, i.m.) anestezi için kullanılmıştır. Üst sol abdominal bölgeye orta hattan laparotomi insizyonu ile ulaşılmıştır. İç organlar sağa çekilerek sol böbrek, adrenal ve renal venler ile sol spermatik venin sol renal vene girişi görünür hale getirilmiştir. Dikkatli bir diseksiyon ile spermatik ve adrenal venlerin sol renal vene girdiği medial yüz yağ ve bağ dokularından temizlenmiştir. Renal ven ligasyonunun yapılacağı bölüme 4.0 ipek sütür yerleştirilmiştir. 0.85 mm çaplı metal tel üzerinde daraltılarak ve böylece ven daraltıldıktan sonra tel çekilerek, damarın dış çapı 1 mm’ye düşürülmüştür. On mg/ml Gentamisin sülfat ile abdominal boşluğun hijyeni sağlandıktan sonra, abdominal duvar ve ön abdominal kaslar 4.0 kromik katküt ile ayrı ayrı dikilmiştir. Yukarıda belirtildiği şekilde sol testiste varikozel oluşturulduktan 13 hafta sonra, anestezi altında varikozel varlığı tanımlanan sıçanlardan sol ve sağ testisler alınmıştır. Varikozeli tanımlamak için sol spermatik ven çapı metal mikrometre ile ölçülmüştür. Sol spermatik ven varikozel çapı 1mm’den az olan sıçanlar, varikozel olgusu olarak kabul edilmeyerek deney grubuna dahil edilmemiştir. Sham operasyonu uygulanan sıçanlarda, yukarıda belirtilen işlemler uygulanarak sol renal ven diseke edilmiş, fakat daraltılmamıştır. Kontrol grubundaki deney hayvanlarına hiçbir cerrahi müdahalede bulunulmamıştır. Tüm cerrahi işlemler 3.5x objektif büyütmesi altında yapılmıştır.

Deney protokolü, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından Helsinki protokolüne uygun olarak 07-06/05 numara ile onaylanmıştır.

3.3. Dokuların Elde Edilmesi ve Hazırlanması

Sol testis dokusu örnekleri kontrol, sham operasyonu gören ve varikosel grubu sıçanlarından elde edilmiş ve doku ağırlıkları belirlenmiştir. Tüm gruptaki sıçanların testis dokuları ışık mikroskopik incelemeler, immunohistokimyasal gözlemler ve Western blot analizleri için hazırlanmıştır.

3.4. Rutin Işık Mikroskopik Gözlemler

Her üç gruba ait sol testis doku örnekleri, Bouin fiksatifinde fikse edildikten sonra rutin parafin teknikleri uygulanarak ve 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Hematoksilen-Eozin (HE), ve Periyodik Asid Schiff (PAS) boyaları yapılarak (255) varikosel modelinin oluşup oluşmadığı ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. HE boyası, seminifer tübüllerin ve testis dokusunun genel görünümü hakkında bilgi verdiği için uygulanırken, PAS boyası ise, Leydig hücrelerini ve spermatidlerin gelişen akrozomal aşamalarını açık bir şekilde ortaya koyduğu için boyanmıştır.

3.5. Johnsen Skoru ile Tübül Hasarının Değerlendirilmesi

Seminifer tübüllerin matürasyonu, “Johnsen Skoru” kriterleri kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 3.5.1).

Tablo 3.5.1. Johnsen Skoru hesaplama kriterleri.

Johnsen Skoru	Kriter
10	Tam matür spermatogenez gözlenir (tübül lümeni içersinde yoğun nükleer kromatini bulunan, matür ve kanca şeklini almış spermatozoa), piknotik cisimler mevcuttur.
09	10 JS ile benzer kriterler gözlenir ancak germinal epitelyum birkaç yerinden yarılmış olabilir ve dağınık lümen yapısı gözlenmektedir.
08	Yoğun nükleer boyanma ve kanca baş yapısı gözlenen 10'dan fazla immatür spermatozoa vardır ve tübül içine perifer olarak yerleşmiştir, piknotik cisimler yoktur.
07	10'dan daha az spermatozoa gözlenir, hücrelerin çoğunluğu matür spermatidlerdir ve daha az yoğun nükleer boyanma göstererek perifere yerleşmiştir, piknotik cisimler yoktur.
06	Soluk kromatinleri ve oval başları ile orta-faz spermatidler gözlenir, ışınsal bir düzenlenme söz konusudur, piknotik cisim yoktur.
05	Tübülün genelinde rastgele düzenlenmiş immatür spermatidler gözlenir, her birinin soluk kromatinli yuvarlak nükleusu vardır, piknotik cisimler yoktur.
04	Sadece birkaç spermatosit (5'den az) görülür, spermatid ya da spermatozoa yoktur.
03	Sadece germ hücreleri, spermatogonya mevcuttur.
02	Germ hücresi yoktur, sadece Sertoli hücresi bulunur.
01	Tübül kesitinde hiç hücre yoktur.

İlk kez 1970 yılında Johnsen tarafından insan seminifer tübüllerinin matürasyonunu değerlendiren bu skorlama sistemi, testisteki histolojik bulgulara

odaklanmaktadır ve özellikle seminifer tübülde bulunan germ hücrelerinin matüritesini temel almaktadır (256). Sıçanlar için Johnsen Skorlaması ise Lewis-Jones ve Kerrigan tarafından geliştirilmiştir (257). Bu kriterler baz alınarak , HE boyası ile boyanmış kontrol, sham ve varikosel gruplarındaki testis kesitlerinde seminifer tübül hasarı değerlendirilmiştir. Her denek için Johnsen Skoru ayrı ayrı hesaplanmıştır.

3.6. İmmunohistokimyasal gözlemler

Parafin bloklardan 5µm kalınlığında alınan kesitler üzerinde, PAR ve PARP-1 antikorlarının testis dokusundaki dağılımlarını incelemek amacıyla, rutin immunohistokimyasal protokoller uygulanmış ve sonuçlar ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

3.6.1. İmmunohistokimyasal Protokol

Beş µm kalınlığındaki parafin kesitler, pozitif yüklü lamlar (Superfrost) üzerine alınarak bir gece 45 °C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirildikten sonra, her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Daha sonra, distile suda çalkalanarak, fosfat tuzu tamponunda (PBS; pH: 7.2-7.4) üç kere beşer dakika yıkanmıştır. Antijenik maskenin giderilmesi amacıyla kesitler 200ml sitrat tamponu (pH:6.0) içerisinde mikrodalga fırında 15 dakika muamele edildikten sonra 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile su ve PBS'ten geçirilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edilmiştir. Distile suda çalkalanıp PBS'te yıkanan kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu (Lab Vision) ile 7 dakika muamele edilmiştir Serumun fazlası alındıktan sonra, fare monoklonal anti-PAR [Alexis, Kat No ALX-804-220] ile 1:1000 dilüsyon oranında, + 4°C'de, gece boyu ve tavşan poliklonal anti-PARP-1 [Abcam, Kat No Ab6079] ile 1:300 dilüsyon oranında, oda ısısında, 2 saat kesitler inkübe edilmişlerdir. Kontrol kesitlerine primer antikorların protein konsantrasyonu ile aynı oranda protein içeren Fare IgG (Vector) izotip kontrolü veya normal tavşan serumu uygulanmıştır. Kesitler, inkübasyon sonunda PBS ile üç defa beşer dakika yıkanmıştır.

Daha sonra sırasıyla, 45 dakika oda ısısında biyotinli fare veya tavşan sekonder antikor (Vector) ile ve 30 dakika streptavidin-peroksidaz kompleksi (LSAB Kit, Dako) ile inkübasyon yapılmıştır. Her iki uygulama sonrasında da, PBS ile 3 defa beşer dakika yıkama yapılmıştır. Sinyali geliştirmek için dokular üç dakika Amino-etil-karbazol (AEC) kromojeni (LabVision) ile muamele edildikten sonra musluk suyunda yıkanmıştır. Mayer'in Hematoksilen'inde (Dako) 30 saniye zıt boyama yapıldıktan sonra gliserol (Merck) kapatma solüsyonu ile kapatılmıştır.

Kontrol, sham ve varikosel gruplarına ait dokulardaki PAR ve PARP-1 immunboyanması pozitif olan hücre oranlarının değerlendirilmesi seminifer tübül evrelendirilmesine dayanarak yapılmıştır. İmmunohistokimyasal tekniklerle boyanan bütün kesitler Axioplan mikroskopunda (Zeiss) değerlendirilmiştir. Boyanmalar,

kesitteki özel boyanmanın yoğunluğu temel alınarak semikantitatif olarak skorlanırken, alandaki tüm hücreler aşağıda verilen yoğunluk kategorilerinden birisine dahil edildi: 0 (boyanma yok), 1 (zayıf fakat kontrole göre görülebilir), 2 (boyanma belirgin), 3 (boyanma yoğun).

3.7. SDS - Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve İmmuno Blot

Kontrol, sham ve varikosel oluşturulmuş sıçanlara ait testis doku örnekleri, 0.2 gr dokuya 600µl “lysis buffer” ve 10µl proteaz inhibitör kokteyli (Boehringer) olacak şekilde inkübe edilerek homojenize edilmiştir. Numuneler, 15000 g’de, +4°C’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları -20°C’de saklanmak üzere hazırlanmıştır. Numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için BCA (Bicinchoninic Acid) Assay Kit (Sigma Aldrich, Kat No B9643) kullanılmıştır. Her numunede var olan protein miktarı, standartlarla karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Jele yüklenen numunelerin her birinin eşit protein miktarı taşınması sağlanacak şekilde hesaplanmıştır.

Elektrofrezden önce numuneler 5 dakika 100 °C’de suda kaynatılmıştır. Örneklerin hedef proteinlerinin moleküler ağırlıklarına uygun olarak, 4-HNE için % 7.5’luk, PAR ve PARP için ise % 10’luk poliakrilamid jeller hazırlanmıştır. BCA testine göre yapılmış protein konsantrasyonu hesaplamaları baz alınarak her bir antikor için yüklenecek protein konsantrasyonu belirlenmiştir. 4-HNE antikoruna için 20µg, PAR antikoruna için 50µg ve PARP-1 antikoruna için 100µg protein yüklenmiştir. Her kuyucuğa 20 mikrolitre numune, protein miktarları eşit olacak şekilde yüklenerek Mini protean sistem III (Biorad) tankının içine yerleştirilmiştir. Mini protean sistem III tankına “yürütme solüsyonu” eklenerek tank güç kaynağına bağlanmıştır. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 80 Volt, 30 Miliamperde 90-100 dakika elektrofrez edilmiştir.

Bu sırada, PVDF membran (Biorad), üstte ve altta 3’er adet filtre kağıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlanmıştır. Jelde yürütülen proteinler, hazırlanan sandviçte PVDF membranın üzerine alınarak tekrar mini protean III sistemindeki tank blot içerisine alınmıştır. Mini protean III tankına “transfer solüsyonu” eklenerek +4 °C’de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlanmıştır. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda ısında pH’sı 7.2-7.4 olan 0.14 mol/l tris tuz solüsyonu (TBS) ile hazırlanan ve ek olarak % 0.1 Tween-20 (Sigma) ilave edilen (TBS-T), %5 lik yağsız kuru süt tozu (Biorad) ile bloklanmıştır. Membranlar, 4-HNE [Cosmo Bio Co., Kat No MHN-100P-EX], PAR [Alexis, Kat No ALX-804-220] ve PARP-1 [Abcam, Kat No Ab6079] için sırasıyla, 1:100, 1:400 ve 1:300 oranında bloklama solüsyonu ile dilue edilmiş antikorlarla gece boyu, +4°C’de, karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 5’er dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenecek, yıkama yapılmıştır. Membranlar, 1:5000 oranında bloklama solüsyonu ile dilue edilmiş, peroksidazla işaretlenmiş anti-fare IgG ve peroksidazla işaretlenmiş anti-tavşan IgG (Vector) sekonder antikorlarla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 30 dakika boyunca 5 er dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenecek yıkama yapılmıştır. Membranlar SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi (Pierce) ile 5 dakika inkübe edildikten sonra karanlık oda içerisinde hiperfilme (Amersham Pharmacia

Biotech) aktarılmıştır. Film görüntüleme amacıyla developer ve fiksatiften geçirilmiş ve distile su ile yıkanarak kurutulmuştur.

İnternal kontrol olarak, fare monoklonal Beta-aktin antikoru [Abcam, Kat No Ab6276] kullanılmıştır. Western blot sonuçlarının kantitatif değerlendirmelerini yapmak amacıyla DigiDoc 1000 programı kullanılmıştır.

3.8. TUNEL Metodu

Testis dokusundaki apoptoz, DNA iplikçiklerindeki kırılmaların TUNEL yöntemi ile enzimatik olarak işaretlenmesiyle belirlenmiştir. TUNEL metodu ile işaretleme, Cell Death Detection Kit (Hücre Ölümü Belirleme Kiti) ile ve de üreticinin önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

Pozitif yüklü lamlara testis dokusundan 5µm kalınlığında parafin kesitler alınarak kurutulmuş ve kesitler etüvde gece boyu 45°C’de ve takiben 60°C’de 1 saat bırakılmıştır. Deparafinizasyon ve rehidratasyondan sonra; lamalar PBS’te iki kere 5 dakika yıkanmıştır. Permeabilizasyon solüsyonu (0.1% Triton X-100 in 0.1% sodyum sitrat) ile kesitler +4⁰’de 8 dakika inkübe edilmiş ve PBS ile iki kere 5 dakika yıkanmıştır. Enzimsiz ajan eklenen (sadece işaretleme solüsyonu ve tunel dilüsyon tamponu) negatif kontrol haricinde her kesit için; 50µl enzim solüsyonu ve 450µl TUNEL işaretleme solüsyonu ve 1000 µl tunel dilüsyon tamponu kullanılarak hazırlanan işaretleme reaksiyonu ile 37°C’de 1 saat nemli ortamda inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. Bu süre sonunda lamalar PBS ile yıkandıktan sonra, dönüştürücü ajan (Converter-AP) ile 37°C’de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yıkamadan sonra işaretli DNA iplikçiği kırıkları içeren hücrelerin lokalizasyonu için renk geliştirme işlemi, kesitleri Fast Red substrat solüsyonu ile yaklaşık 8-10 dakika inkübe ederek gerçekleştirilmiştir. Ardından Mayer’s Hematoksileni ile zıt boyama yapılmıştır.

TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan apoptotik hücrelerin testis dokusundaki sayısının belirlenmesi için her bir seminifer tübülde, TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan apoptotik hücreler sayılmıştır. Değerlendirme yapılırken kesit düzeyi yuvarlak olan ve lümeni net olarak görünen seminifer tübüller dikkate alınmıştır. TUNEL pozitif sinyal taşıyan hücrelerin bulunduğu seminifer tübüllerin, testisteki toplam tübül sayısı oranı belirlenip 100 ile çarpılmış ve Apoptotik İndeks (Aİ) elde edilmiştir (258).

3.9. DAPI ve Nükleus Boyamaları

Varikozel gruplarında, nükleer kondenzasyonunu tamamlamamış, multi-nükleer hücre yapısındaki “simplast” adı verilen oluşumların gözlenmesinin ardından, bu kaynaşmış hücre grubu içerisindeki nükleusları doğrulamak için, hücrenin genetik materyali olan DNA’ya güçlü bir şekilde bağlanabilen DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) floresan işaretleyicisi kullanılmıştır.

5µm kalınlığındaki parafin kesitler, pozitif yüklü lamalar üzerine alınarak bir gece 45⁰C’lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere 10’ar dakika ksilollerden geçirilip, her birinde 5’er dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70’lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Daha sonra, distile suda

alkalanıp, fosfat tuzu tamponunda 5 dakika yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra işlemler karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Yıkamanın hemen ardından, DAPI solüsyonu ile 1 dk oda ısısında çalkalamadan inkübe edilmiştir. Yıkamanın ardından kesitler antifade kapama solüsyonu (Vector) ile kapatılarak floresan atamanlı Olympus BX-61 faz kontrast mikroskop ile incelenmiştir.

3.10. İstatistiksel Analizler

Elde edilen tüm sonuçlar, SigmaStat (Version 3.5, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) programı kullanılarak, One Way Anova Test'ini takiben Post Hoc Tukey ve Dunn's testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi $p < 0.05$ olarak alınmıştır. 13 haftalık varikozel gruplarının sonuçları, kontrol ve sham grubu sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

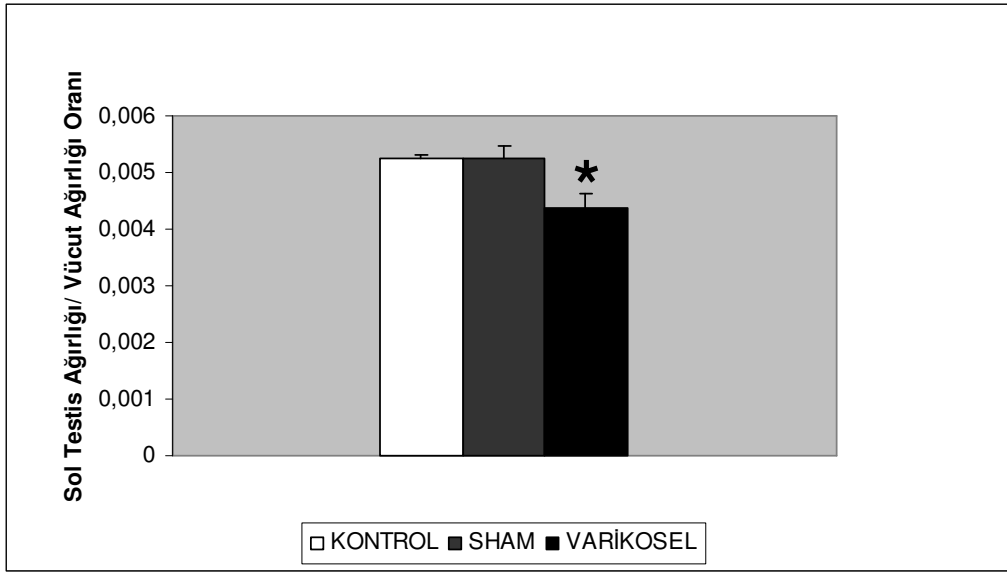
4.1. Sol Testisin Vücut Ağırlığına Oram

13 haftalık varikozel modeli süresi sonunda; kontrol, sham ve varikozel grubundaki deney hayvanlarının vücut ağırlıkları ve sol testis örnekleri alınarak tartılmıştır. Sol testis ağırlığında meydana gelen değişikliği gözlemek için, her bir denegın vücut ağırlığı ile sol testis ağırlığı oranlanmıştır (Tablo 4.1.1).

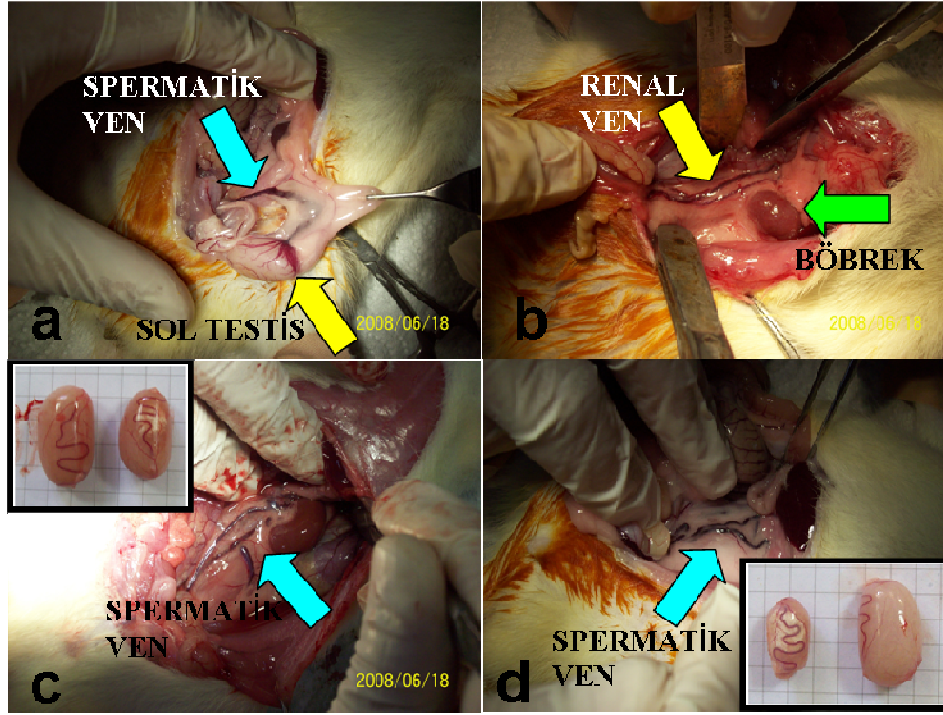
Kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında, varikozel grubunda sol testis ağırlığı ile vücut ağırlığı oranının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.1.1).

Tablo 4.1.1. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki sıçanların sol testis ve vücut ağırlıkları ile sol testis ağırlığının vücut ağırlığına oranları. Ortalama \pm SEM (ortalamanın standart hatası) (* $p < 0.05$).

Gruplar	Sol Testis Ağırlığı (g)	Vücut Ağırlığı (g)	Sol Testis Ağırlığı/ Vücut Ağırlığı
Kontrol (n=10)	2.018 \pm 0.03	386.2 \pm 7.6	0.0052 \pm 0.0001
Sham (n=10)	1.952 \pm 0.03	375.7 \pm 13.3	0.0053 \pm 0.0002
Varikozel (n=10)	1.467 \pm 0.01	335.8 \pm 9.8	0.0044 \pm 0.0003*



Şekil 4.1.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarında sol testis ağırlığının vücut ağırlığına oranları. Varikozel grubunda bu oranın anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (* $p < 0.05$).



Şekil 4.1.2. Varikosel modelinin oluştuğunu gösteren fotoğraflar. Sol renal venin parsiyel ligasyonu sonrasında 1mm ve üzerinde ven çapı bulunan deneklerde varikosel modelinin oluştuğu kabul edilmiştir (a, b, c, d). Varikosel grubunda sol testis ağırlığının azaldığı makroskopik olarak da gözlenmiştir (c ve d içerisindeki küçük fotoğraflar). Sol renal ven (sarı oklar), böbrek (yeşil ok).

4.2. Genel Görünüm

Hematoksilen-Eozin boyası uygulanan kontrol, sham ve varikosel gruplarının testis dokusu örnekleri ışık mikroskopik olarak incelenmiştir (Şekil 4.2.2).

Kontrol ve sham gruplarına ait testis kesitleri incelendiğinde; tüm seminifer tübül evrelerindeki spermatogenik hücre tiplerinin normal şekilde düzenlendiği ve tübülün germinal epitelinin de tam ve bozulmamış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kesit geneline bakıldığında hasarlı tübüllere kontrol ve sham gruplarında rastlanmamıştır.

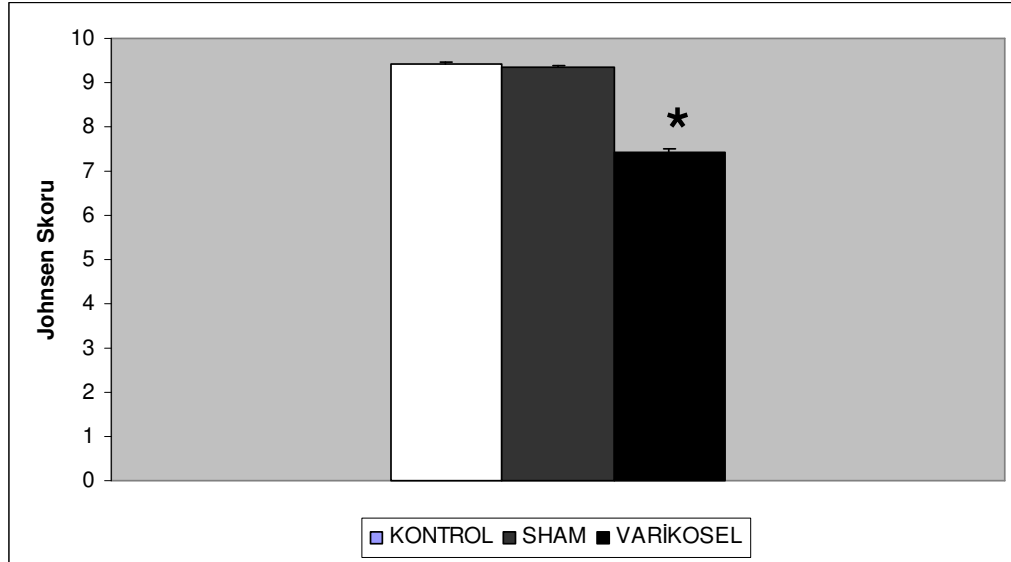
Varikosel gruplarına ait testis dokusu örneklerinde ise, seminifer tübüllerde anormal düzenlenmiş spermatogenik hücre tipleri gözlenmiştir. Bazı tübüllerin germinal epitel hücreleri birbirinden ayrılmıştır. Ayrıca kesit geneline bakıldığında, Sertoli Cell Only (sadece Sertoli Hücresi bulunan) tübüller, spermatozoid aşamasında duraklamış tübüller ve yuvarlak spermatozoid aşamasında duraklamış olan hasarlı tübüllerin fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2.3). Bu hasarın derecesi Johnsen Skoru kriterlerine göre değerlendirildiğinde varikosel gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (Tablo 4.2.1, Şekil 4.2.1).

Varikosel grubuna ait testis kesitlerindeki bazı hasarlı seminifer tübüllerde, literatürde "simplast"(259) olarak adlandırılan yapıların var olduğu gözlenmiştir

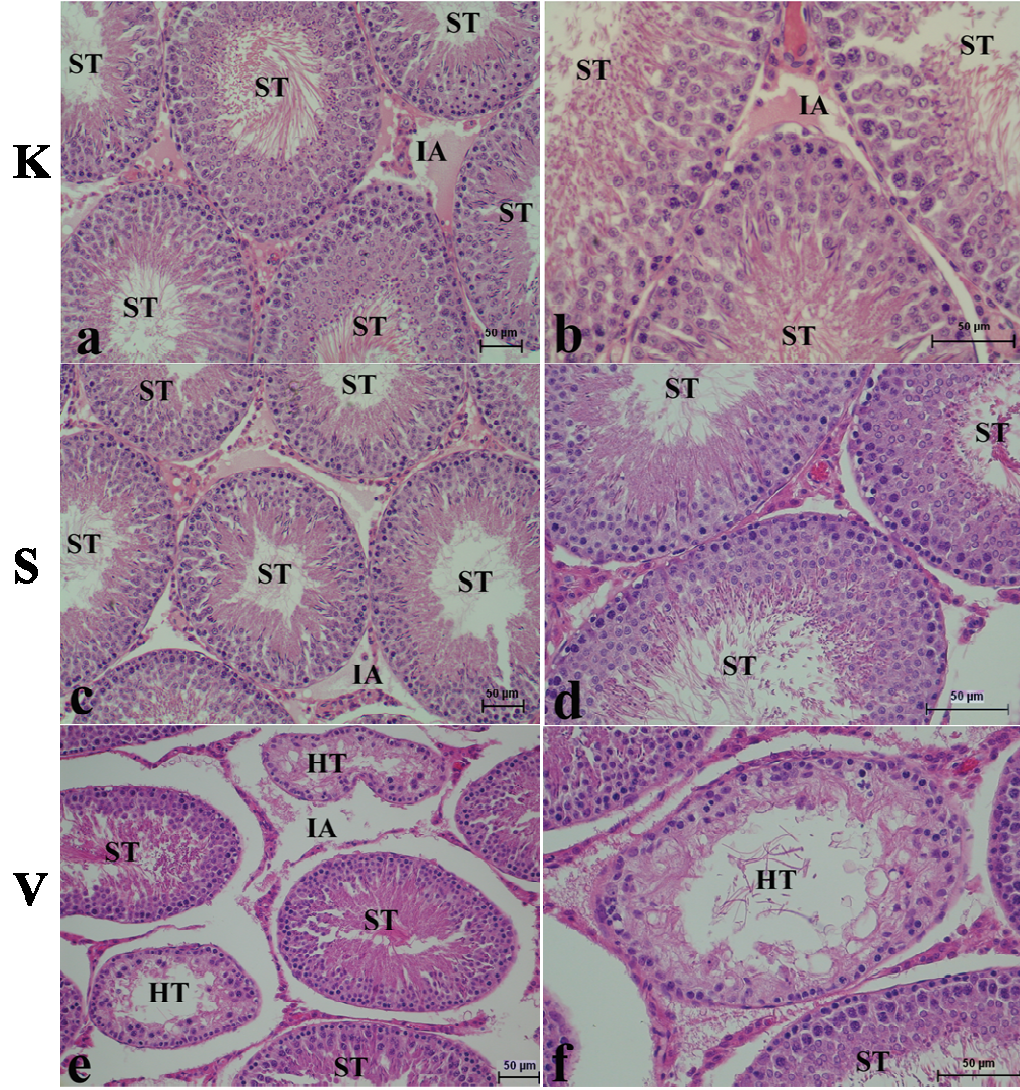
(Şekil 4.2.3/e,f). Simplastlar; yuvarlak spermatid nükleuslarının tek bir sitoplazma içerisinde bulunduğu multinükleer hücre kümeleridir. Ayrıca bazı tübüllerde nükleer kondenzasyonu yeterli olarak gerçekleşmemiş yuvarlak spermatidlerin varlığı da ortaya çıkmıştır (Şekil 4.2.3/g,h). Bu tip yuvarlak spermatidler nükleer kondenzasyonlarını tamamlayamadıklarından nükleer materyalleri çekirdeklerinin sadece periferinde yerleşmiştir ve bu durum literatürde “hale etkisi” olarak tanımlanmaktadır. Simplastların ve hale etkisi gözlenen yuvarlak spermatidlerin nükleus yapılarının net olarak değerlendirilmesi ve doğrulanması amacıyla DAPI işaretleme yapılmıştır (Şekil 4.2.4). Bu işaretleme sonucunda, bu yapıların DNA içeriklerinin tam olmadığı, genetik materyalin sadece periferde lokalize olduğu ortaya konmuştur.

Tablo 4.2.1. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki kesitlerde değerlendirilen tübül sayıları Ve Johnsen Skorları ortalaması \pm SEM (* $p < 0.05$).

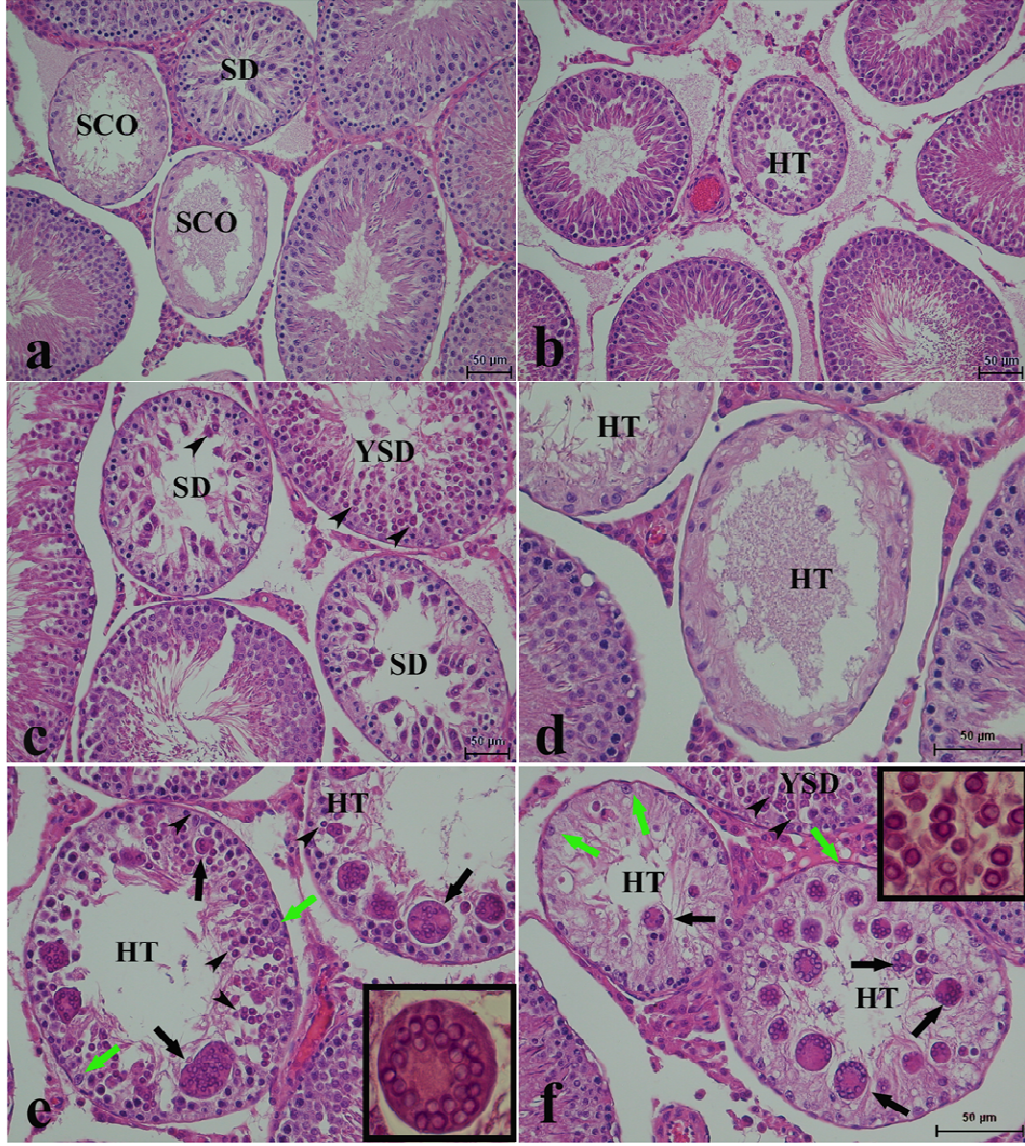
GRUPLAR	Kontrol (n=10)	Sham (n=10)	Varikozel (n=10)
Johnsen Skoru	9.4 \pm 0.03	9.3 \pm 0.04	7.4 \pm 0.1*
Değerlendirilen tübül sayısı	400.3 \pm 6.8	405.4 \pm 5.2	400.2 \pm 6.9



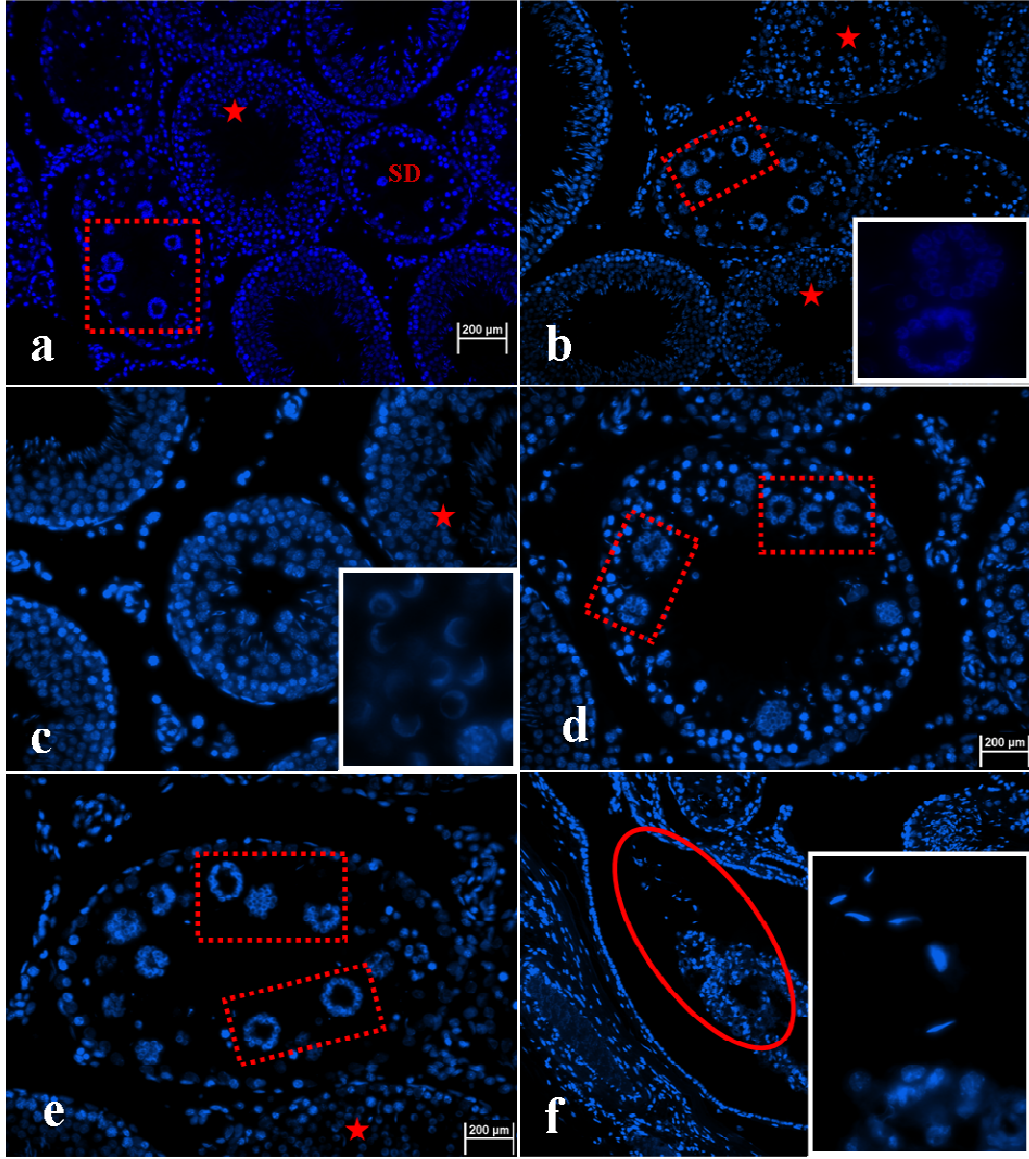
Şekil 4.2.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarında Johnsen Skoru değerlendirilmesi. Seminifer tübül dejenerasyonunu değerlendiren bu skorlamanın varikozel grubunda anlamlı olarak azaldığı görülmüştür (* $p < 0.05$).



Şekil 4.2.2. Kontrol (a,b), sham (c,d) ve varikozel (e,f) gruplarına ait testis doku kesitlerinde HE boyası ile yapılan değerlendirmelere örnek olarak tübüllerin genel görünümleri. K: Kontrol, S: Sham, V: Varikozel, ST: Sağlam Tübül, HT: Hasarlı Tübül, IA: İnterstiyel Alan.



Şekil 4.2.3. Varikosel gruplarına ait testis doku kesitlerinde HE boyaması ile değerlendirilen genel görünüm. HT: Hasarlı Tübül, SD: Spermatid aşamasında duraklamış olan tübül, YSD: Yuvarlak Spermatid aşamasında duraklamış olan tübül, SCO: Sertoli Cell Only (Sadece Sertoli Hücreleri Bulunan) tübül, Sertoli Hücreleri (yeşil oklar), Simplast (siyah oklar), Hale etkisi gözlenen nükleer kondenzasyonu yetersiz olan yuvarlak spermatid nükleusları (ok başları).

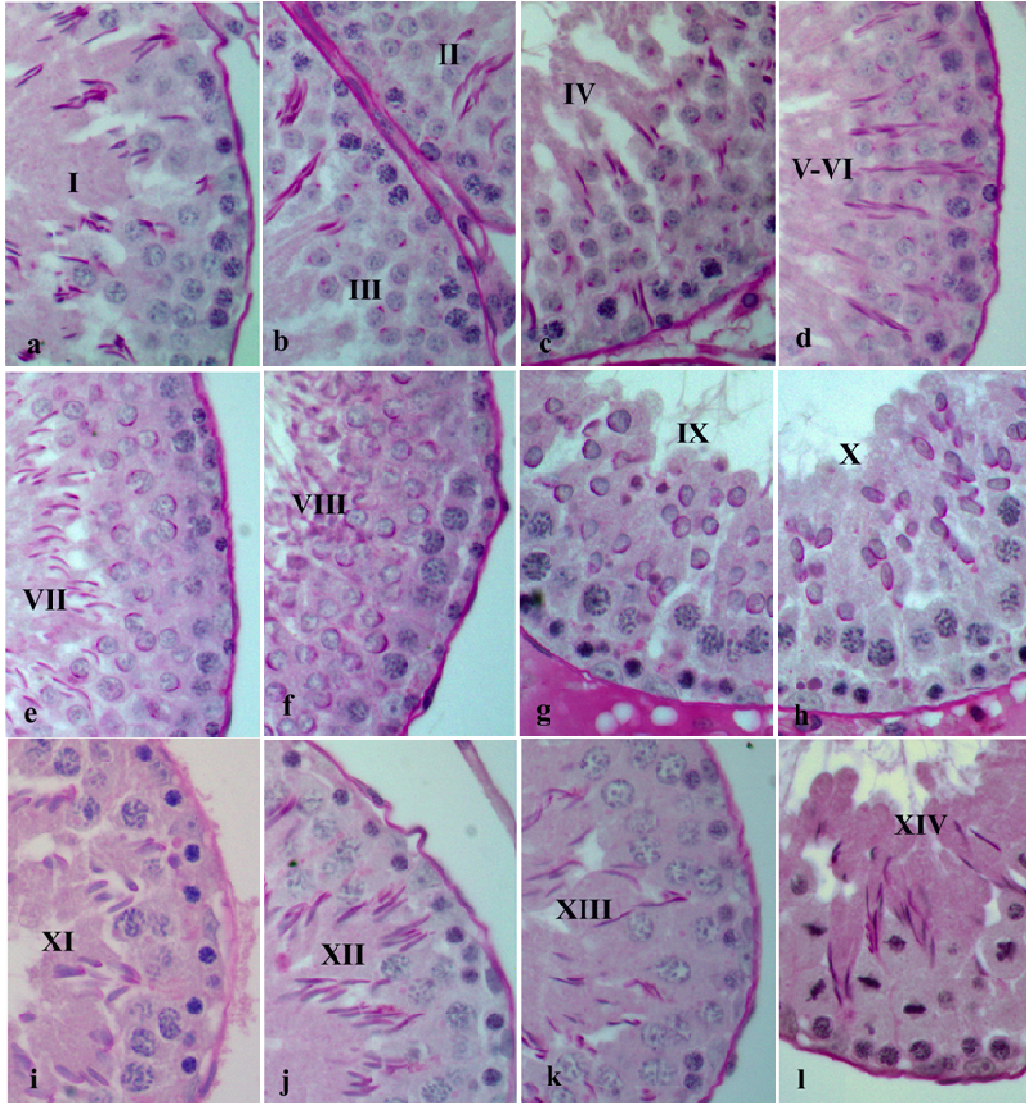


Şekil 4.2.4. Varikozel gruplarına ait testis doku kesitlerinde gözlenen “simplast” ve “hale etkisi” görülen yuvarlak spermatidlerin DAPI işaretlemesi (a-f). SD: Spermatid aşamasında duraklamış olan tübül, simplast (kesik çizgili alanlar ve b içerisindeki küçük resim), nükleuslarında “hale etkisi” gösteren yuvarlak spermatidler (yıldızlar ve c içerisindeki küçük resim), kesitlerde gözlenen epididimis bölgelerinden bir görüntü ve immatür sperm hücreleri (f içerisindeki küçük resim) izleniyor (daire).

4.3. Seminifer Tübül Evreleendirilmesi

Periyodik Asit Schiff (PAS) boyaması uygulanan kontrol, sham ve varikosel gruplarının testis dokusu örnekleri ışık mikroskopik olarak incelenerek seminifer tübül evreleendirilmesi yapılmıştır (Şekil 4.3.1). Sığan testisinde birbirinden farklı spermatogenik hücre tiplerini barındıran seminifer tübül evreleri 14 evreye ayrılmıştır ve tüm seminifer tübül evreleri kontrol grubu hayvanlardan elde edilen şekildeki örnek üzerinden değerlendirilmiştir.

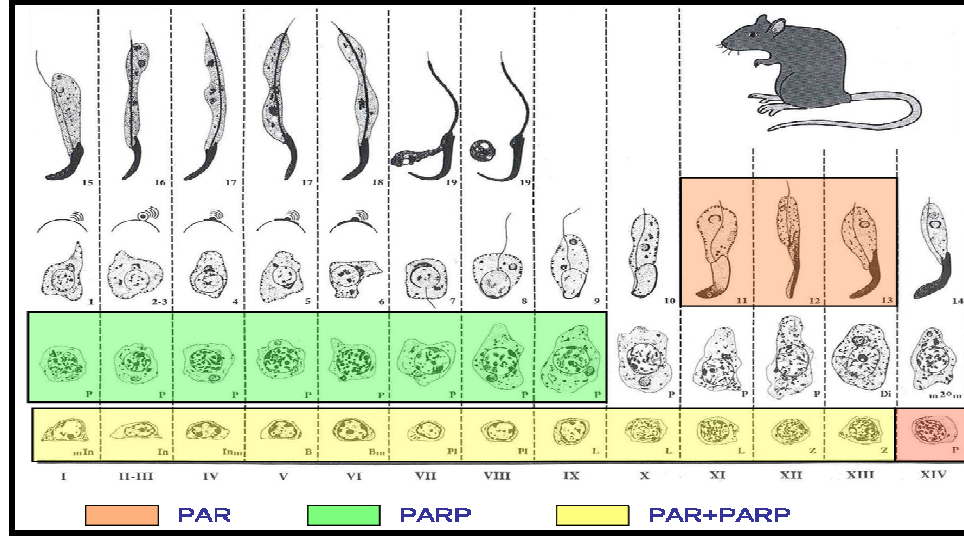
Değerlendirilen proteinlerin ekspresyonları da seminifer tübül evreleendirilmesine dayanarak yapılmıştır.



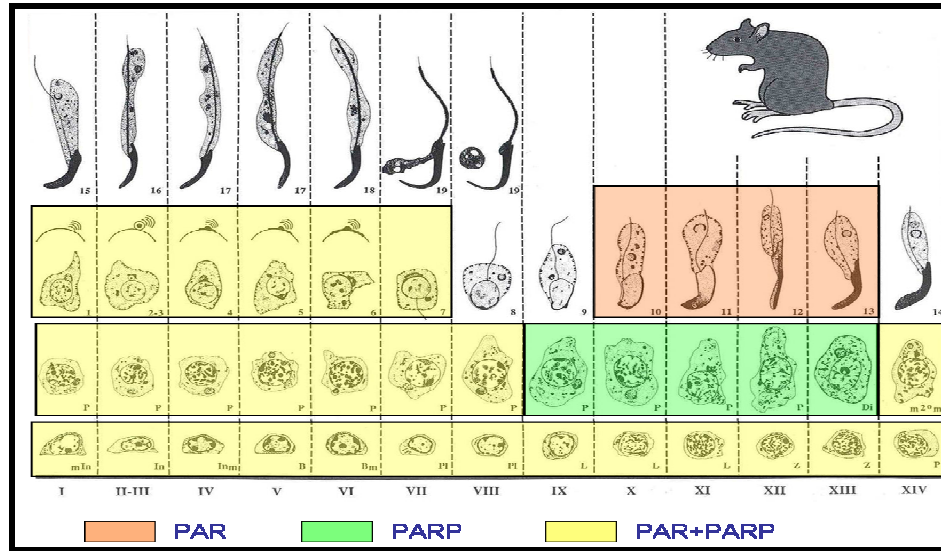
Şekil 4.3.1. Kontrol gruplarına ait testis doku kesitlerinde PAS boyaması sonuçlarına dayanarak yapılan seminifer tübül evreleendirilmesi (a-l). Roma rakamları tübülün evrelerini göstermektedir. Not: a-l: X40.

4.4. İmmünohistokimya

Kontrol, sham ve varikosel gruplarına ait sol testis kesitlerinde PAR ve PARP-1 proteinlerinin ekspresyonları semikantitatif olarak değerlendirilmiştir. PAR ve PARP-1 ekspresyonları değerlendirilirken, ekspresyonun seminifer tübülün hangi evresinde ve hangi hücre tiplerinde görüldüğüne dikkat edilmiştir, ayrıca protein ekspresyonları kontrol, sham ve varikosel grupları arasında karşılaştırılmıştır. Bulgularımız şekiller 4.4.1 ve 4.4.2’de özetlenmiştir.



Şekil 4.4.1. Seminifer tübül evrelerine göre kontrol ve sham grubu testislerde PAR ve PARP-1 ekspresyonu.

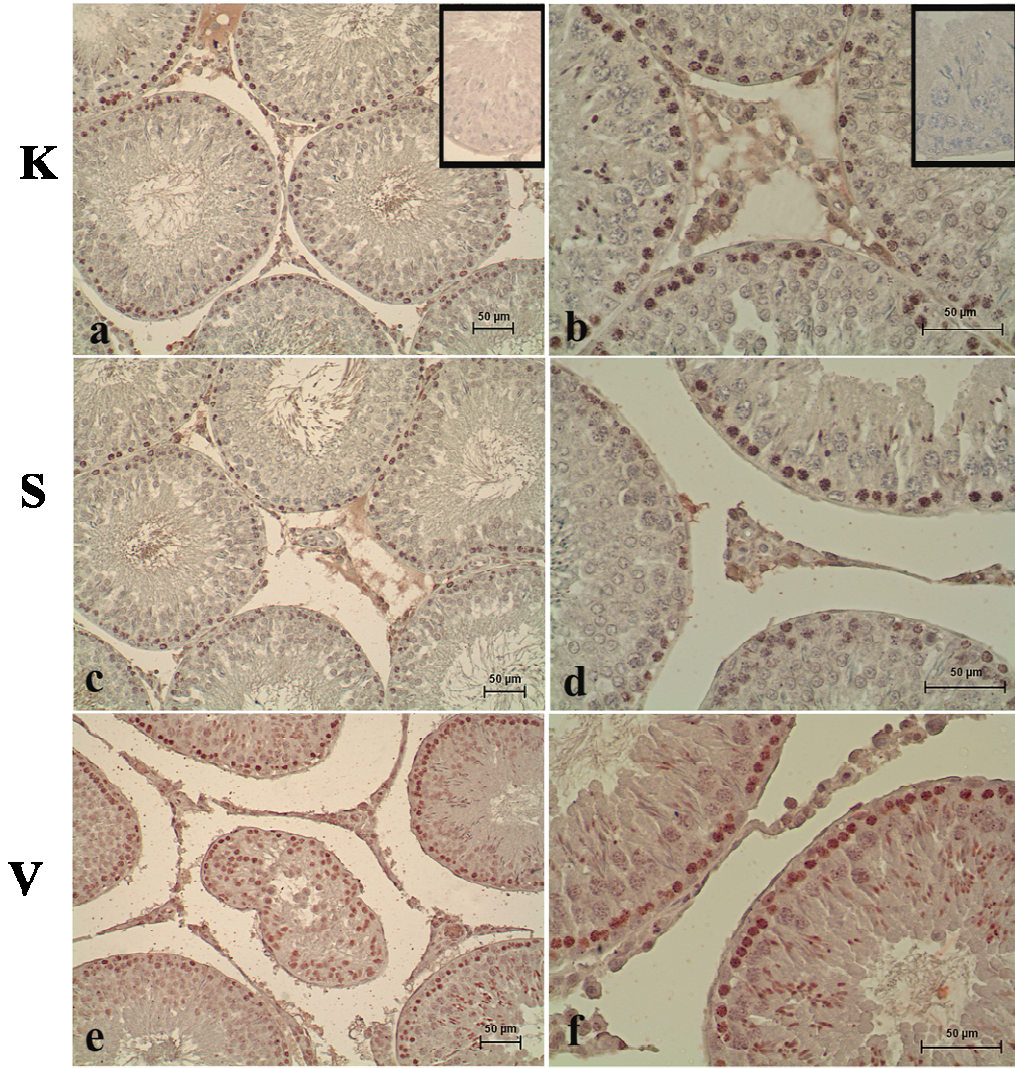


Şekil 4.4.2. Seminifer tübül evrelerine göre varikosel grubu testislerde PAR ve PARP-1 ekspresyonu.

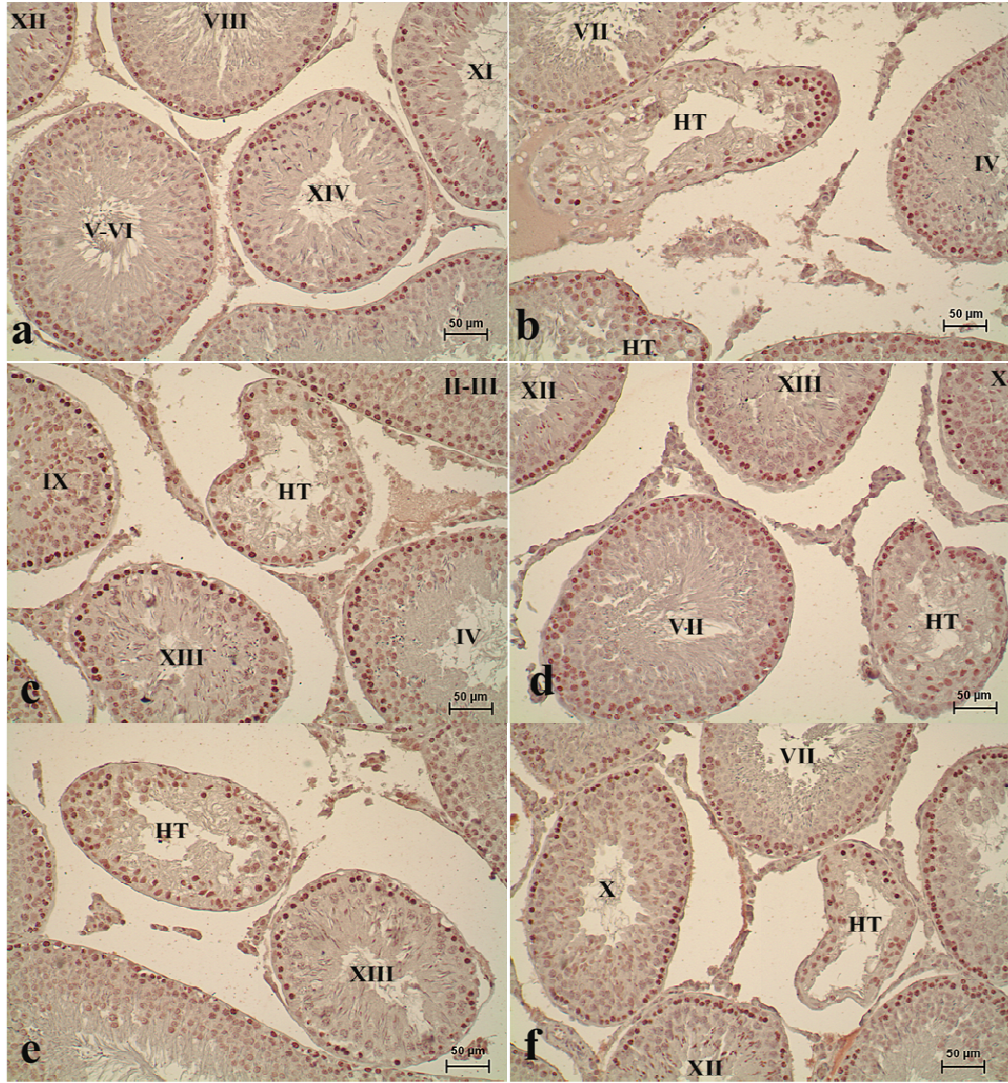
4.4.1. PAR (Poli ADP-Riboz) Proteini Ekspresyonu

Kontrol, sham ve varikosel gruplarına ait PAR immünohistokimyasal boyanma şiddeti seminifer tübül evrelerine ve ekspre oldukları hücre tipine göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.1.1, Tablo 4.4.1.1).

PAR polimerlerinin ekspresyonu kontrol ve sham gruplarında; spermatogonyumlarda, primer spermatisitlerde (preleptoten, leptoten, zigoten ve sadece XIV. evredeki seminifer tübüllerdeki pakiten spermatisitlerde) ve XI-XII. evre seminifer tübüllerdeki uzayan spermatisitlerde nükleer olarak gözlenmiştir. Varikosel gruplarında ise; tüm evrelerdeki spermatogonyumlarda, IX-XII. evrelerdeki primer spermatisitlerde (pakiten ve diploten hariç), sekonder spermatisitlerde, I-VII. evrelerdeki yuvarlak spermatisitlerde ve X-XIII. evrelerdeki uzayan spermatisitlerde gözlenmiştir (Şekil 4.4.1.2 ve şekil 4.4.1.3).

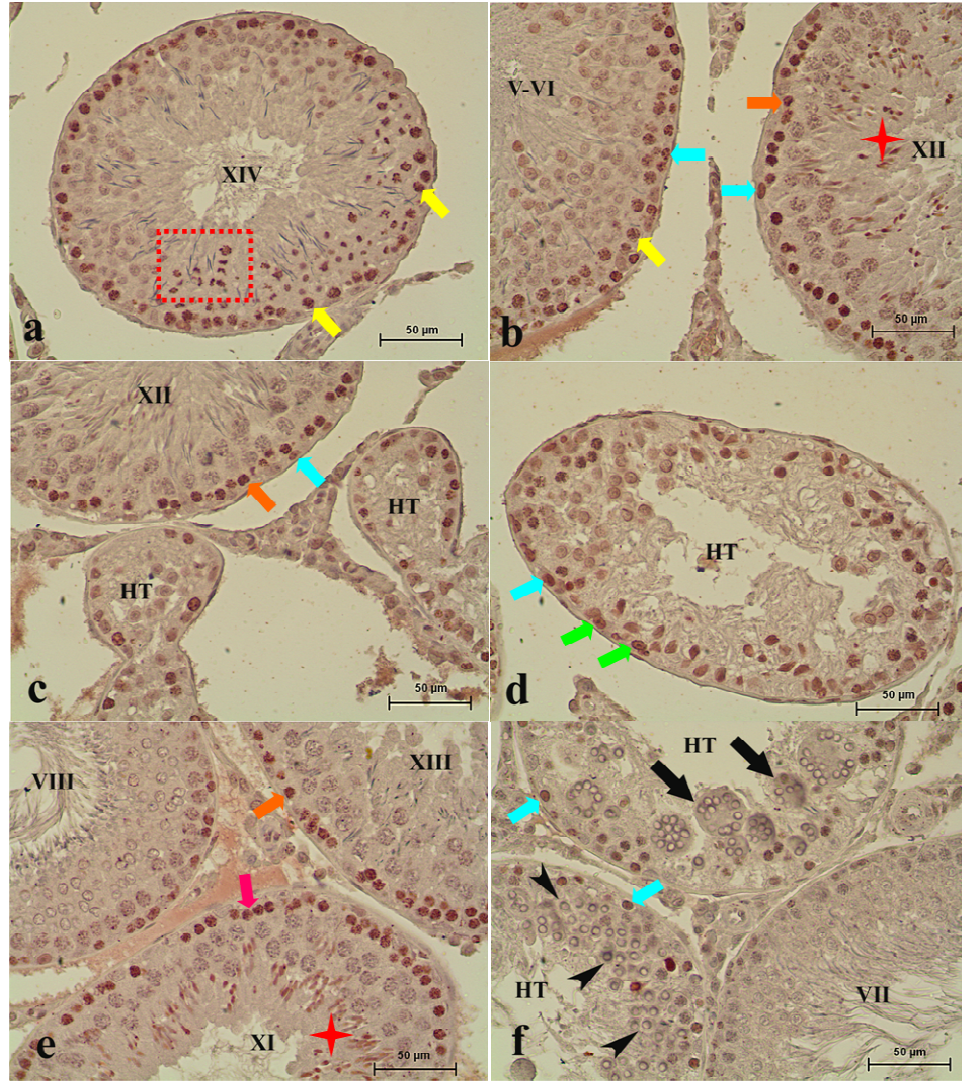


Şekil 4.4.1.1. Kontrol, sham ve varikosel gruplarında PAR immünohistokimyası (a-f). K: Kontrol, S: Sham, V: Varikosel. Şekil a ve b içerisindeki küçük resimler negatif kontrollere aittir.



Şekil 4.4.1.2. Seminifer tübül evrelendirilmesine göre varikozel gruplarında PAR immünohistokimyası (a-f). Roma rakamları evreleri göstermektedir. HT: Hasarlı Tübül.

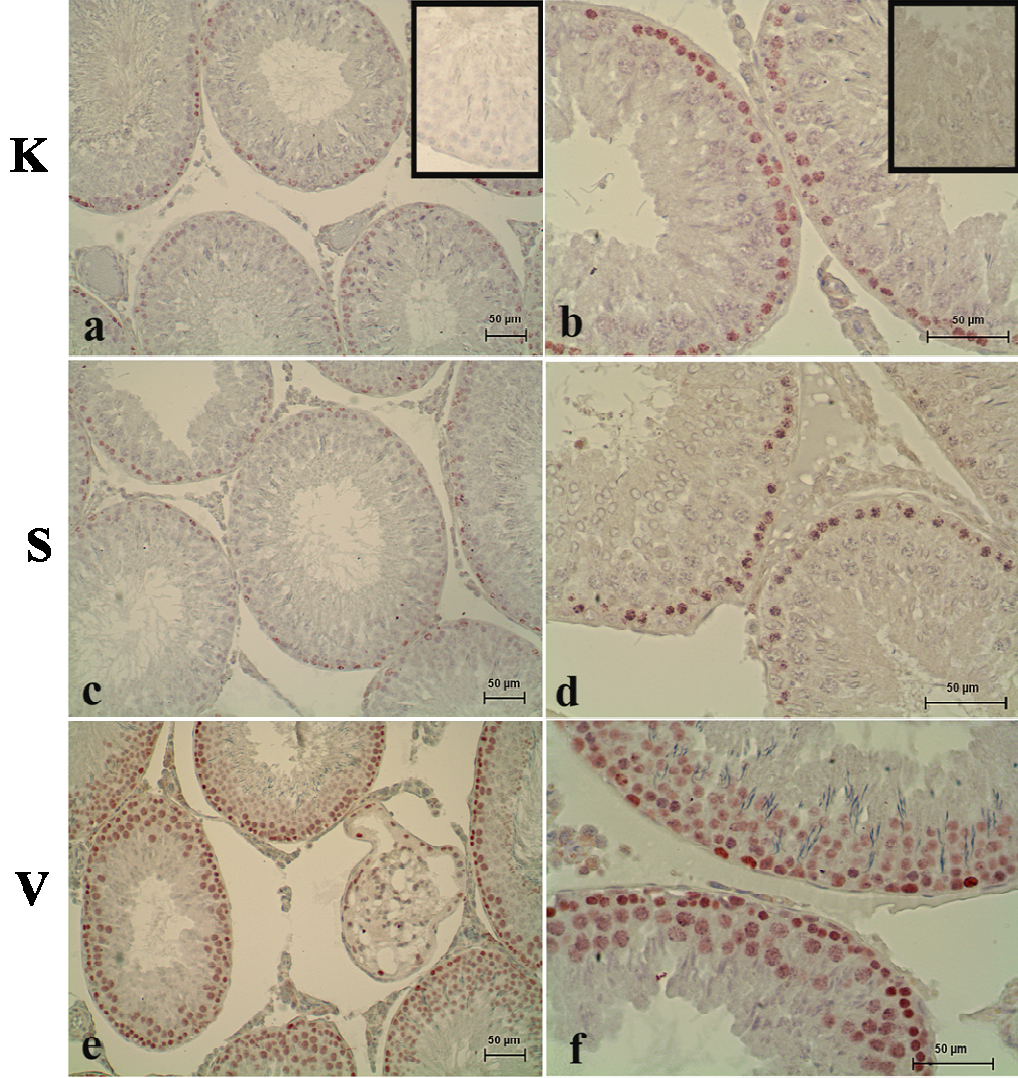
PAR proteininin ekspresyon şiddeti kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında varikozel grubundaki spermatogonyalarda ve uzayan spermatidlerde anlamlı bir şekilde artmıştır. Ayrıca, kontrol ve sham gruplarında ekspresyonu gözlenmezken, varikozel gruplarında; pakiten aşamadaki primer spermatositlerde, sekonder spermatositlerde (mayotik figürler) ve yuvarlak spermatidlerde yoğun bir şekilde ekspre olmaya başlamıştır (Tablo 4.4.1.1). Hasarlı tübüllerde ise tübül içerisinde kalan germ hücre tiplerinde ve bazı Sertoli hücrelerinde ekspresyonun varlığı gözlenmiştir. Ancak simplastlarda ve hale etkisi gözlenen yuvarlak spermatidlerde PAR ekspresyonuna rastlanmamıştır (Şekil 4.4.1.3).



Şekil 4.4.1.3. Varikozel gruplarında PAR proteinini ekspre eden hücre tipleri ve onların buldukları seminifer tübül evreleri (a-f). Roma rakamları evreleri göstermektedir. HT: Hasarlı Tübül, Sekonder spermatozittenki mayoz bölünmeyi temsil eden mayotik figürler (kesik çizgili alan), spermatogonya (mavi oklar), leptoten spermatozite (pembe ok), zigoten spermatozite (turuncu oklar), pakiten spermatozite (sarı oklar), uzayan spermatidler (yıldızlar), Sertoli hücresi (yeşil oklar), simplast (siyah oklar) ve nükleuslarında "hale etkisi" gözlenen yuvarlak spermatidler (siyah ok başları).

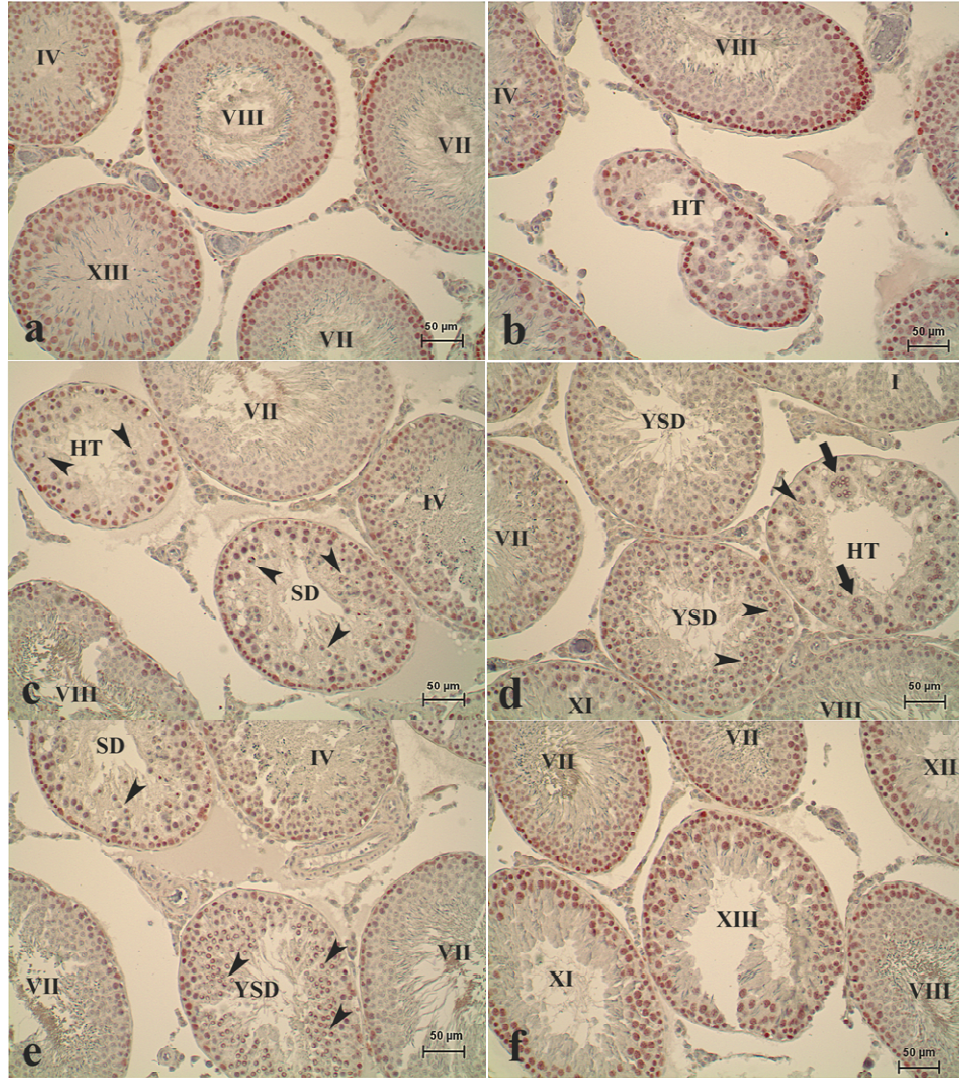
4.4.2. PARP-1 (Poli ADP Riboz Polimeraz-1) Protein Ekspresyonu

Kontrol, sham ve varikosel gruplarına ait PARP-1 immünohistokimyasal boyanma şiddeti seminifer tübül evrelerine ve ekspre oldukları hücre tipine göre değerlendirilmiştir (Şekil 4.4.2.1, Tablo 4.4.2.1).



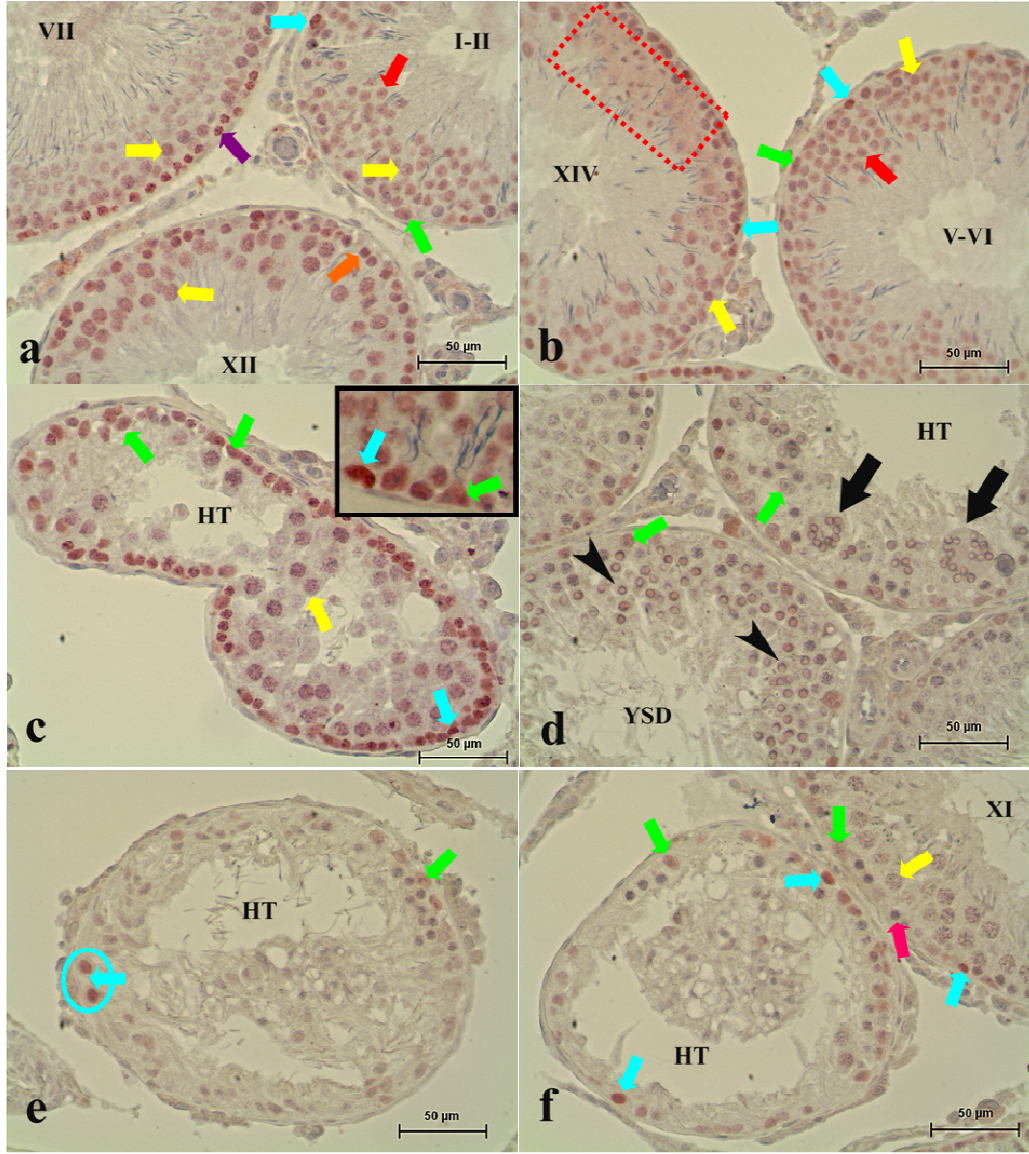
Şekil 4.4.2.1. Kontrol, sham ve varikosel gruplarında PARP-1 immünohistokimyası (a-h). K: Kontrol, S: Sham, V: Varikosel. Şekil a ve b içerisindeki küçük resimler negatif kontrollere aittir.

PARP-1 proteininin ekspresyonu kontrol ve sham gruplarında; spermatogonyumlarda ve primer spermatozoidlerde (preleptoten, leptoten, zigoten, pakiten) nükleer olarak gözlenmiştir (Şekil 4.4.2.1). Varikosel gruplarında ise; spermatogonyumlarda, primer ve sekonder spermatozoidlerde, Sertoli hücrelerinde ve spermiumların sitoplazmik atıklarında gözlenmiştir (Şekil 4.4.2.2 ve 4.4.2.3).



Şekil 4.4.2.2. Seminifer tübül evrelendirilmesine göre varikozel gruplarında PARP-1 immünohistokimyası (a-f). Roma rakamları tübülün evrelerini göstermektedir. HT: Hasarlı Tübül, SD: Spermatid aşamasında duraklamış olan tübül, YSD: Yuvarlak Spermatid aşamasında duraklamış olan tübül, simplastlar (siyah oklar), nükleuslarında “hale etkisi” gözlenen yuvarlak spermatid (siyah ok başları).

PARP-1 proteininin ekspresyon şiddeti kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında varikozel grubunda; spermatogonyumlarda ve primer spermatozoidlerde (preleptoten, leptoten, zigoten) değişmemiştir. Ayrıca, kontrol ve sham gruplarında ekspresyonu gözlenmezken, varikozel gruplarında; IX-XIII. Evredeki pakiten spermatozoidlerde, diploten spermatozoid, yuvarlak spermatidlerde ve VIII-IX. evre spermiumlarının sitoplazmik atıklarında anlamlı bir şekilde artmaktadır. Hasarlı tübüllerde kalan germ hücre tiplerinde ve bazı Sertoli hücrelerinde ekspresyonun varlığı gözlenmiştir. Bazı simplastların multinükleer nükleuslarında ve nükleuslarında hale etkisi gözlenen bazı yuvarlak spermatidlerde PARP-1 ekspresyonu izlenmiştir (Şekil 4.4.2.3).



Şekil 4.4.2.3. Varikozel gruplarında PARP-1 proteinini ekspre eden hücre tipleri ve Onların buldukları seminifer tübül evreleri (a-f). Roma rakamları tübül evrelerini göstermektedir. HT: Hasarlı Tübül, YSD: Yuvarlak Spermatid aşamasında duraklamış olan tübül, Sekonder spermatositteki mayoz bölünmeyi temsil eden mayotik figürler (kesik çizgili alan), spermatogonya (mavi oklar ve halka), preleptoten spermatosit (mor ok), leptoten spermatosit (pembe ok), zigoten spermatosit (turuncu ok), pakiten spermatosit (sarı oklar), yuvarlak spermatid (kırmızı ok), Sertoli hücresi (yeşil oklar), simplast (siyah oklar), nükleuslarında "hale etkisi" gözlenen yuvarlak spermatidler (siyah ok başları).

4.5. Western Blot Sonuçları

Kontrol, sham ve varikosel gruplarına ait dokulardaki 4-HNE, PAR ve PARP-1 proteinlerinin ekspresyon şiddetleri ölçülerek, internal kontrol olarak kullanılan Beta-aktin proteininin ekspresyon şiddetine oranlanmıştır (Tablo 4.5.1).

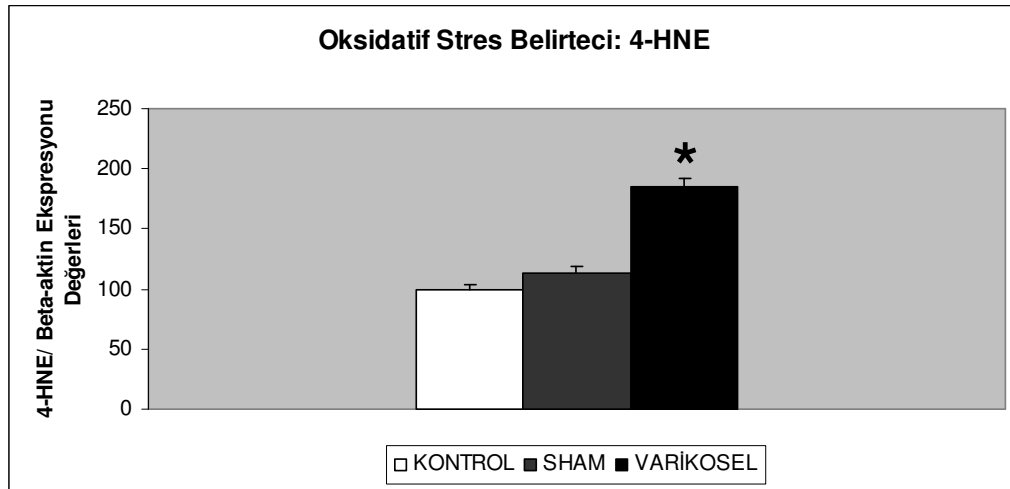
Western blot analizlerinin sonuçları kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında, varikosel gruplarında bu üç proteinin de ekspresyonlarının anlamlı bir şekilde arttığı ortaya konmuştur ($p<0.05$).

Tablo 4.5.1. Kontrol, sham ve varikosel gruplarındaki 4-HNE, PAR ve PARP-1 protein ekspresyonlarının şiddeti. Ortalama \pm SEM (* $p<0.05$).

Proteinler Gruplar	Ortalama \pm Standart Sapma			
	4-HNE	PAR	PARP-1, 122 kDa	PARP-1, 29 kDa
Kontrol	108.8 \pm 3.8	112.3 \pm 3.5	114.1 \pm 3.9	115.3 \pm 4.0
Sham	113.8 \pm 4.7	117.3 \pm 5.2	115.0 \pm 6.7	125.6 \pm 6.2
Varikosel	185.7 \pm 6.2*	363.6 \pm 70.1*	299.3 \pm 92.9*	357.7 \pm 52.0*

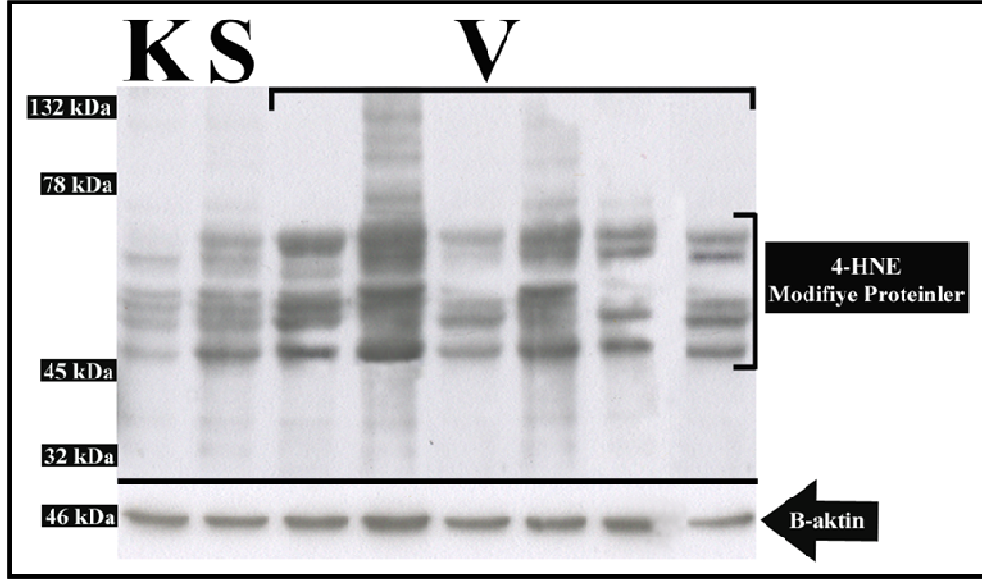
4.5.1. Dört-HNE (4-Hidroksi-2-Nonenal)

Kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında varikosel gruplarında, 4-HNE proteininin ekspresyon şiddeti anlamlı bir şekilde artmaktadır ($p<0.05$).



Şekil 4.5.1.1. Kontrol, sham ve varikosel gruplarına ait 4-HNE ekspresyon şiddetlerinin Beta-Aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri (* $p<0.05$).

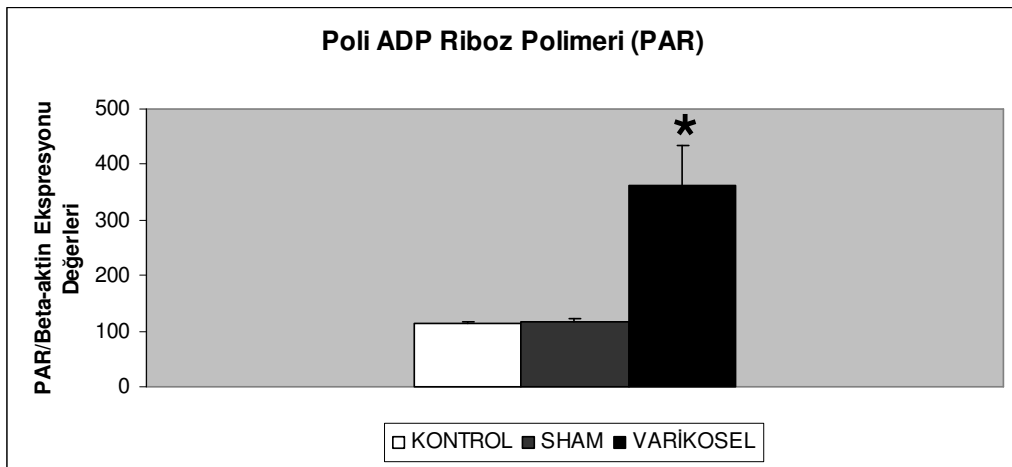
Kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında varikozel gruplarında anlamlı olarak arttığı görülen 4-HNE modifiye proteinler 45kDa ve 78kDa'luk protein aralığında gözlenmiştir ($p<0.05$).



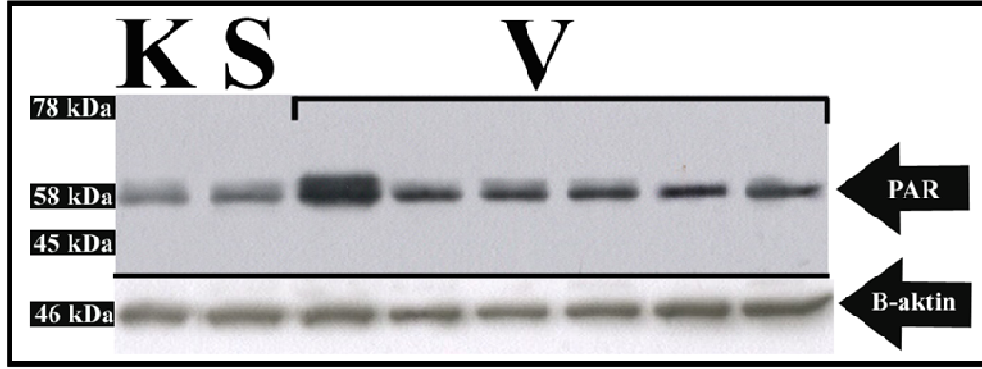
Şekil 4.5.1.2. Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait 4-HNE modifiye proteinler ve Beta-Aktin (46kDa) protein ekspresyonları.

4.5.2. PAR (Poli ADP Riboz) Polimeri

Kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında varikozel gruplarında, PAR polimerlerinin ekspresyon şiddeti anlamlı bir şekilde artmaktadır ($p<0.05$).



Şekil 4.5.2.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait PAR ekspresyon şiddetlerinin Beta-Aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri (* $p<0.05$).

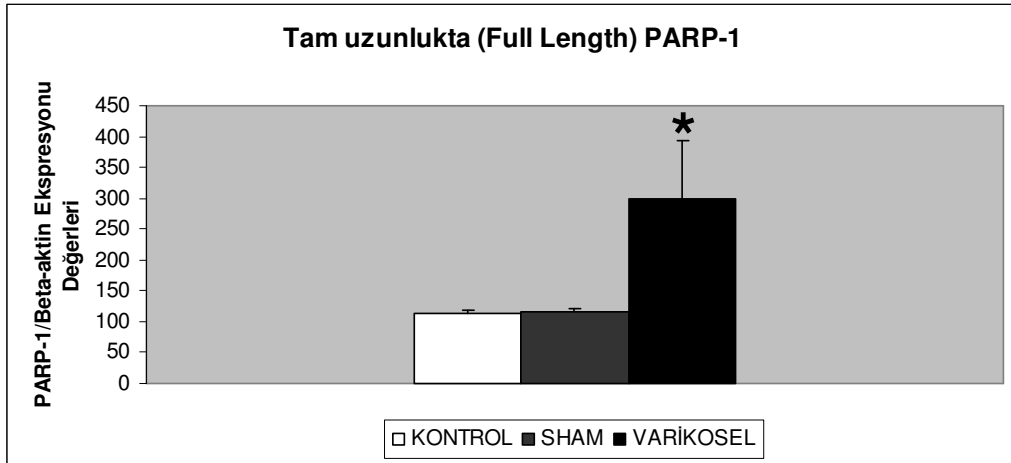


Şekil 4.5.2.2. Kontrol, sham ve varikösel gruplarına ait PAR (58kDa) ve Beta-Aktin (46kDa) ekspresyonları.

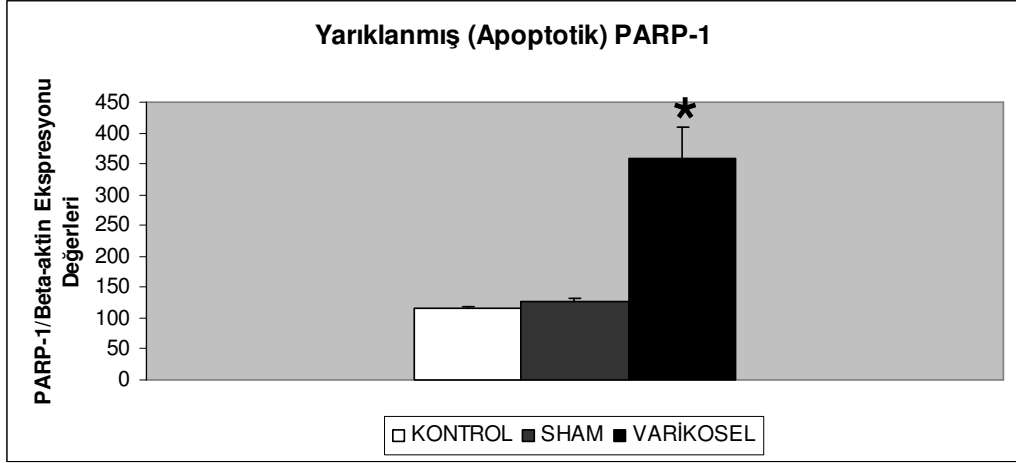
4.5.3. PARP-1 (Poli ADP Riboz Polimeraz-1)

PARP-1 proteininin 122 kDa'luk tam uzunlukta (full length) ve 29 kDa'luk yarıklanmış (cleaved=apoptotik) formlarının ekspresyonları bütün deney gruplarında gösterilmiştir.

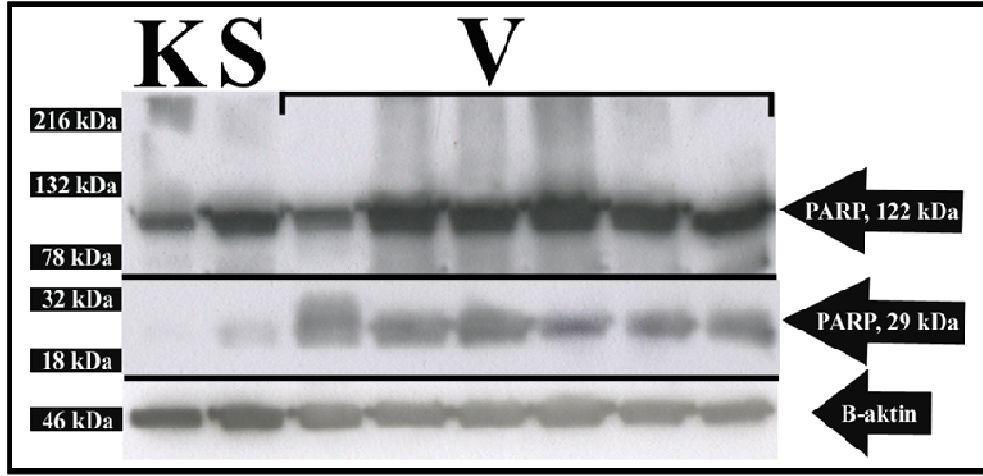
Kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında varikösel gruplarında, tam uzunlukta olan PARP-1 proteininin ve yarıklanmış olan PARP-1 proteininin (apoptik form) ekspresyon şiddeti anlamlı bir şekilde artmaktadır ($p < 0.05$).



Şekil 4.5.3.1. Kontrol, sham ve varikösel gruplarına ait PARP-1(122 kDa) ekspresyon şiddetlerinin Beta-Aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri (* $p < 0.05$).



Şekil 4.5.3.2. Kontrol, sham ve varikösel gruplarına ait apoptotik PARP-1(29 kDa) ekspresyon şiddetlerinin Beta-Aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri (* $p < 0.05$).



Şekil 4.5.3.3. Kontrol, sham ve varikösel gruplarına ait PARP-1 (122 ve 29 kDa) ve Beta-Aktin (46kDa) ekspresyonları.

4.6. TUNEL Sonuçları

Kontrol, sham ve varikösel gruplarındaki apoptotik hücre indeksi karşılaştırılmıştır (Tablo 4.6.1).

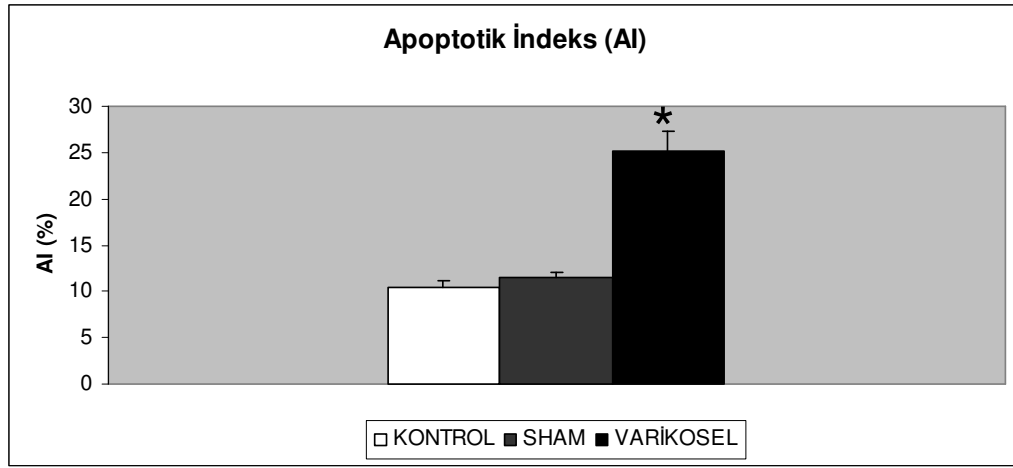
TUNEL pozitif hücreler kontrol, sham ve varikösel gruplarına ait testis dokularındaki bütün seminifer tübüller dikkate alınarak sayılmıştır. Kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında varikösel gruplarında TUNEL pozitif hücrelerin anlamlı bir şekilde arttığı tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

TUNEL pozitif sinyallerin gözlemlendiği hücreler kontrol ve sham gruplarında, primer spermatositler iken, varikösel grubunda primer spermatositlere ek olarak bazı sekonder spermatositlerde, mayotik figürlerde, bazı tübüllerin uzayan

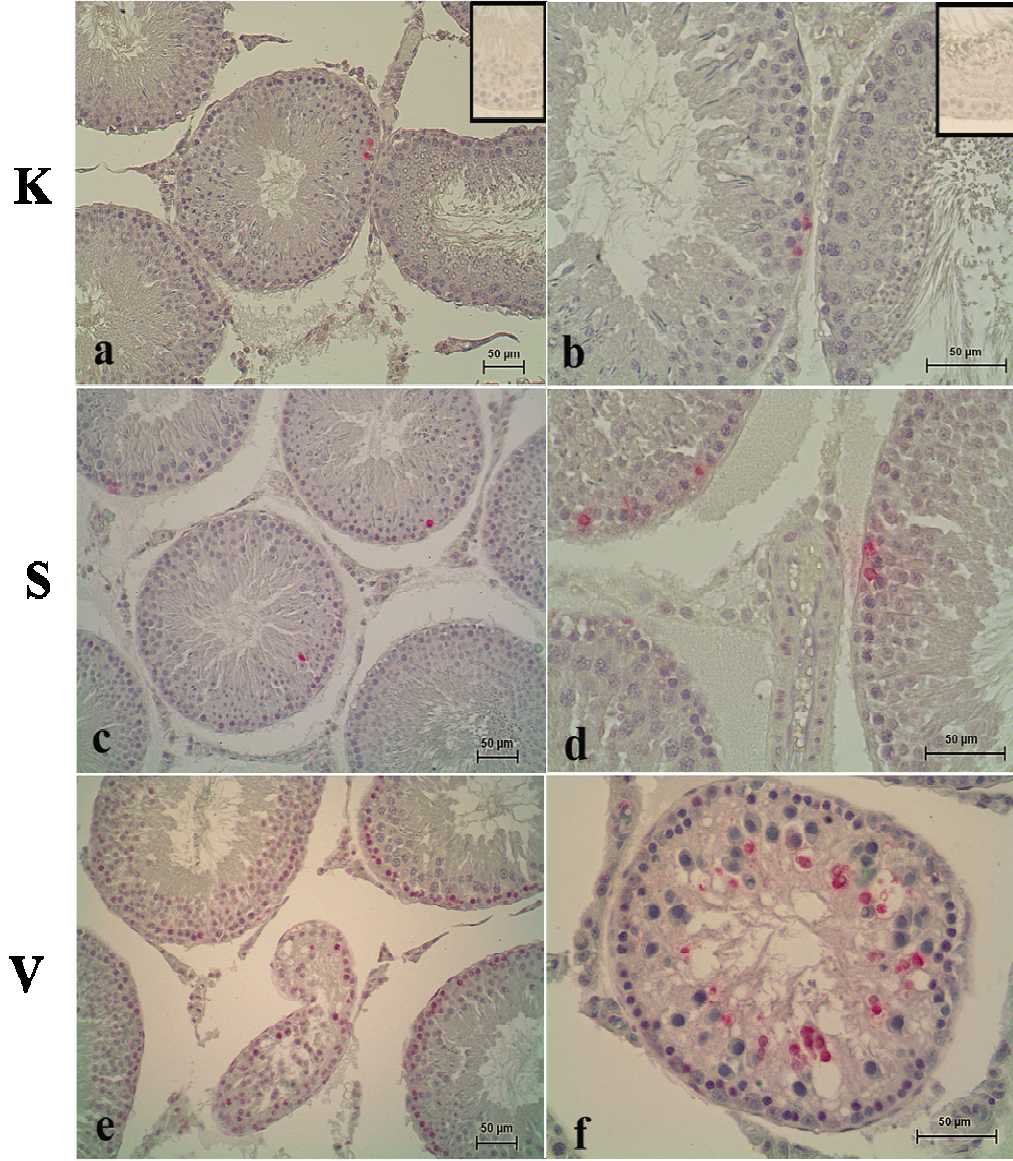
spermatidlerinde ve XII-XIII. evrelerdeki zigoten spermatositlerde de gözlenmiştir. Ayrıca aşırı hasar gören tübüllerde de karakterize edilemeyen hücre tiplerinde TUNEL pozitif sinyallerin olduğu görülmüştür.

Tablo 4.6.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarında apoptotik indeks (AI) yüzdesi. Ortalama \pm SEM (* $p < 0.05$).

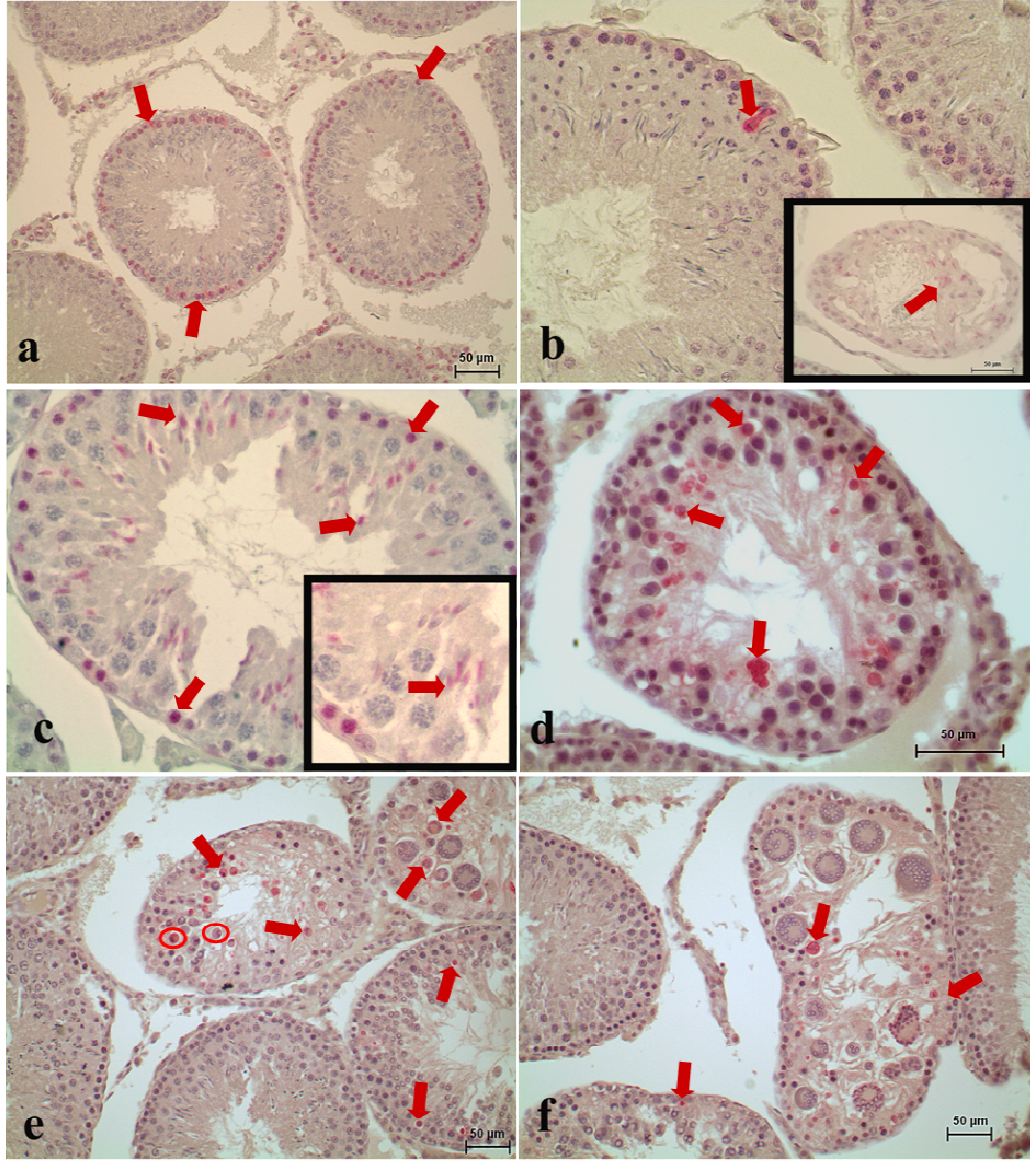
Gruplar	AI (%)
Kontrol	10.4 \pm 0.1
Sham	11.4 \pm 0.1
Varikozel	25.2 \pm 2.2*



Şekil 4.6.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarında apoptotik indeks (AI) yüzdesi (* $p < 0.05$).



Şekil 4.6.2. Kontrol, sham ve varikosel gruplarında TUNEL sonuçları (a-f). K: Kontrol, S: Sham, V: Varikosel. Kırmızı sinyaller apoptotik hücreleri göstermektedir. Şekil a ve b içerisindeki resimler negatif kontrollere aittir.



Şekil 4.6.3. Varikozel gruplarında TUNEL sonuçları (a-f). TUNEL pozitif hücreler (kırmızı oklar ve halkalar).

TARTIŞMA

Varikoselin ortaya çıkış sıklığı primer infertilitesi olan erkeklerde %20 ile %40 arasında iken, sekonder infertilitesi olan erkeklerde bu oran oldukça yükselmekte ve %80'lere kadar çıkmaktadır (60). Bu yüksek oranlar, varikoseli infertilitenin bilinen en önemli sebebi yapmaktadır. Dolayısıyla, son yıllarda varikoselin tedavisi ile ilgili araştırmalar oldukça artmakta ve dikkatler moleküler düzeyde yapılan çalışmalara çekilmektedir.

Varikosel doğal olarak (kendiliğinden) sadece insanlarda ve koçlarda meydana gelmektedir (260, 261). Ancak, yapılan deneylerde insan materyalinin kullanımında karşılaşılan güçlükler araştırmacıları deneysel varikosel modeli oluşturmaya sevk etmiştir. Sol renal venin parsiyel ligasyonu ile oluşturulan deneysel varikosel modelleri histolojik olarak da incelenerek doğrulanmaktadır. Hayvan modelleriyle elde edilen önemli sonuçlar varikosel hakkında bilinmeyenlerin çoğunu aydınlatmıştır ve aydınlatmaya devam etmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda, varikosel sonucunda testiste ortaya çıkan olumsuz etkilerle ilişkili bağlantılar araştırılmaktadır.

Varikosel için tanımlanan önemli hipotezler arasından birkaçı üzerine oldukça yoğunlaşmış ve burada karşılaşılan eksiklikler daha detaylı incelenerek ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. Bu hipotezler arasında en çok dikkat çeken ve araştırılan; testiküler/skrotal ısı artışı ve testiküler hipoksidir.

Varikoselde, hipoksinin oksidatif stres oluşturduğuna dair çeşitli klinik kanıtlar bulunmaktadır (262). Reaktif oksijen türlerinin sperm üzerinde zararlı etkileri vardır ancak düşük seviyede reaktif oksijen türlerinin varlığı sperm kapasitesini ve sperm motilitesinin indüklenmesi için gereklidir. Varikoselli erkekler arasında yapılan çalışmaların sonucunda; (1)spermatik venden gelen kan karbonil proteinlerinin artması (32, 263, 264); spermatik venin lökosit DNA'sında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) artışı; testiküler ve ejaküle spermde 8-OHdG miktarının artışı, (2)daha fazla sperm DNA'sının fragmentasyonu (263), (3)daha fazla lipid peroksidasyonu (188, 265), (4)testiste 4-HNE modifiye proteinlerinin varlığı ve yaşla birlikte artışı (25, 266), (5)ejakülatta sitoplazmik damlacıklara sahip immatür spermlerin artan oranı (266), (6)semende pro-inflamatuvar sitokinlerin yüksek miktarı (267), (7)ejakülattaki apoptotik sperm yüzdesindeki artış gibi elde edilen bulguların çeşitliliği (263), varikoselli testislerde oksidatif hasarı indükleyen hipoksiyi öne sürmektedir.

Literatürde oksidatif stresin ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak bilinen 4-HNE modifiye proteinler, reaktif oksijen türlerinin en bilinen belirteçlerindedir (26). Ayrıca sitotoksik olarak hasar veren aldehitik moleküllerden biri olan 4-HNE'nin seminifer tübüllerde hasar oluşturduğu gösterilmiştir. Oksidatif stresin hem ürünü hem de düzenleyicisi olarak gösterilen 4-HNE'nin apoptozu indüklediği bilinmektedir. Varikoseli olan infertil erkeklerden elde edilen testis biyopsilerine göre; 4-HNE modifiye proteinlerle (1) proliferen olan germ hücrelerinin kaybı ve (2) p53 protein ekspresyonunun artışı arasındaki ilişkiyi öne süren kanıtlar

ortaya çıkarılmıştır. p53 proteini hücre içi mitokondriyal yolakla apoptozu tetiklemektedir (268). Dolayısıyla varikoselde germ hücresi apoptozu da artmaktadır.

Artan ısının apoptoz artışından sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar olsa da, hipoksi-indükleyen faktör-1 α 'nın varikoselde belirlenmesi hipoksiyi en önemli faktör haline getirmiştir. p53 düzeyi, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve neoanjiyogenez, pro-inflamatuar sitokinler, reaktif oksijen türleri, nitrik oksit düzeyi ve lipid peroksidasyonunun artması ile anti-oksidan savunmanın azalması varikoselin sonuçlarındandır (269). Bu nedenlerle, yapılan çoğu çalışma germ hücre apoptozunu veya oksidatif stresin rolünü desteklemektedir.

Varikoselin meydana gelişine ilgili problemler hala ucu açık sorulardır. Olası varikozel mekanizmalarının çoğunun son basamağında apoptozun bulunması bütün bu görüşleri tek bir noktada toplamaktadır ve son zamanlarda "Apoptozda görevli veya meydana gelişinden sorumlu moleküllerin araştırılması varikozel patofizyolojisinin aydınlanmasına katkı sağlar mı?" sorusuna odaklanılmıştır. Varikoselin sonu apoptozla biten birçok sebebinin olması, bugüne kadar edinilen bilgilerin varikoseli tedavi edici anlamda yetersiz kalması ve bu sebeple moleküler çalışmalara yoğunluk verilmesi; yeni moleküllere yönelmeyi ortaya çıkarmıştır.

Bu çalışmada; son yıllarda önemli bir araştırma konusu olan ve hücre ölüm yollarıyla doğrudan ilişkisi bulunan Poli ADP ribozilasyon mekanizmasının ve varikozel patolojisinin ortak noktalarından yola çıkarak, PARP yolağının araştırılması hedeflenmiştir. Bizim çalışmamızda, varikozel modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuştur ve oksidatif stres artışı açıkça gösterilmiştir. Bu stresin oluşturduğu tübül hasarı, histopatolojik olarak belirlenmiş ve hasarın derecesi Johnsen Skor ile kantitatif olarak ortaya konmuştur. Histopatolojik değerlendirmelerde varikozel grubunda ortaya çıkan tübül hasarları çeşitli aşamaları yansıtmıştır. Primer spermatosit evresinde duraklamış tübüller, yuvarlak spermatid aşamasında duraklamış tübüller, sadece Sertoli hücrelerini içeren tübüller, simplastlar olarak adlandırılan multinükleer dev hücreleri içeren tübüller ve nükleer kondanzasyonu yeterli gerçekleşmemiş (hale etkisi) olan yuvarlak spermatidleri içeren tübüller ortaya çıkmıştır. Oksidatif stres artışına bağlı olarak, PARP-1 ve onun son ürünü olan PAR polimerleri artmıştır.

ROS-ilişkili DNA hasarı hücrede kritik seviyeye ulaştığında PARP-1'in aşırı aktive olduğu bilinmektedir (56, 57, 270). Ardından, PARP-1 tarafından PAR'ın aşırı sentezi gerçekleşmekte ve PAR polimerlerinin üretimi için hücre içinde mitokondriyal NAD⁺ ve ATP'nin aşırı tüketilmesine yol açmaktadır (59, 206). Böylece, hücredeki enerji çöküşünün derecesine bağlı olarak apoptotik ya da nekrotik ölüm yolları aktive olmaktadır (217). PARP-1 apoptozda 2 şekilde rol alır;(1) Kaspaz-bağımlı yolak (2) Kaspaz-bağımsız yolak. Kaspaz-bağımlı yolakta; PARP-1 aşırı aktive olmakta ve mitokondriden sitokrom c salınarak Kaspaz-3'ü aktive etmektedir. Aktive olan Kaspaz-3 PARP-1'i otomodifikasyon domeyninden keserek, yarıklanmış (cleaved) PARP-1 formunu oluşturmaktadır. Ve sonuç olarak apoptotik hücre ölümü gerçekleşmektedir. PARP-1'in apoptotik yolakla ilgisi apoptoz indükleyici faktör (AIF) ile kaspaz-bağımsız olarak da gerçekleşmektedir. Bu durumda ise, aşırı PARP aktivasyonu AIF'yi mitokondriden nükleusa taşımaktadır ve apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonunu indüklemektedir. Yine ortaya çıkan ölüm şekli, apoptozdur. Bizim çalışmamızda da; varikoselli testislerde PARP-1'in tam uzunluktaki (full length) formunun aşırı aktivasyonuna ek olarak, yarıklanmış (cleaved) PARP-1 formunun da artışı, Kaspaz-bağımlı apoptotik yolağın

bu süreçte aktive olduğunu göstermektedir. Ayrıca, TUNEL sonuçlarımız da apoptoza giden hücre artışını göstererek bu bulguları desteklemiştir. Dolayısıyla, varikoselde nekrotik ölümün görülmemesinin altta yatan sebebi, büyük olasılıkla PARP-1'in aşırı aktivasyonunun ardından kaspaz-3 tarafından yarıklanarak, hücreyi nekrozdan koruması ve apoptotik ölüm sinyal yollarına yönlendirmesidir.

PARP-1'in; spermatogenez, spermiyogenez ve sperm kromatin yeniden modellenmesi sırasında gamet farklılaşmasında rolü olduğu bilinmektedir (50, 51, 251). Spermatogenezin farklı matürasyon evrelerindeki tüm spermatogonya tiplerinde PARP-1 ekspresyonunun varlığı gösterilmiş olup, bu ekspresyonun germ hücre hattının farklılaşması boyunca DNA bütünlüğünün korunmasında rezervuar görevi yaptığı öne sürülmüştür (51). İmmünohistokimyasal bulgularımıza göre; farklı seminifer tübül evrelerindeki spermatogenik hücrelerde PARP-1 ve PAR proteinlerinin ekspresyonları belirgin olarak artmıştır. Varikosel grubunda, PARP-1 ekspresyonunun özellikle spermatogonya, primer ve sekonder spermatosit, yuvarlak spermatid ve uzayan spermatidlerde arttığı gözlenmiş ve bu artış PARP-1 aktivitesi sonucu üretilen PAR polimerlerinin artışıyla da paralellik göstermiştir. Bu tablodan ortaya çıkan sonuçlara göre; PARP-1 enzimi ve PAR polimerleri, normal spermatogenezdeki rollerinden farklı olarak, primer ve sekonder spermatositlerde yüksek miktarda PAR polimerleri üreterek bu hücrelerdeki DNA hasarının giderilmesine katkı sağlar gibi görünmektedir. Ayrıca, spermatogonyumlarda artan PARP-1 ve PAR ekspresyonları, bu germ hücre hattında meydana gelen DNA kırıklarını muhtemelen tamir yollarına yönlendirmektedir. Kromatin paketlenmesinin gerçekleştiği yuvarlak spermatidlerde bu proteinlerin artmış olması; bu sırada meydana gelen DNA kırıklarını tamir etmek amacıyla olabilir. Germ hücrelerini korumak amacıyla aktive olmasına rağmen, PARP-1 ve PAR'ın aşırı üretimi sonucunda bazı hücreler kaçınılmaz şekilde apoptozla ilişkili ölüm yollarına sevk edilmektedirler.

Sonuç olarak; genellikle varikoselli bireyin ürettiği sperm hücrelerini değerlendiren çalışmalarla karşılaştırıldığında, üretilen anormal gametlerin oluşumunda PARP yolağının testisteki rolünü değerlendiren bu çalışmanın, varikosel mekanizmasına moleküler düzeydeki katkısı oldukça önemlidir. Sperm araştırmalarından elde edilen bilgilerin yanı sıra, testisten elde edilen moleküler bilgiler, varikoselin spermatogeneze olan olumsuz etkilerinin giderilmesi amacıyla ileride kullanılması gündeme gelebilecek medikal tedaviler için temel oluşturmaktadır. Çalışmamız, varikoselde ortaya çıkan apoptotik süreçlerle PARP yolağının ilişkisi ilk defa ortaya koymuştur ve böylece PARP inhibisyonunun varikosel tedavisinde kullanılıp kullanılmaması ile ilgili tartışmaları başlatmıştır. Bütün bunlarla ilişkili olarak; deneysel varikosel modellerinde PARP inhibitörleri kullanarak, varikosel patogenezinin değerlendirilmesiyle ilgili çalışmaların planlanmasına hızla devam etmekteyiz.

SONUÇLAR

1. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki sıçanların sol testis ağırlıkları vücut ağırlıklarına oranlandığında; varikozel grubundaki sıçanların testis ağırlıklarında anlamlı bir azalma olduğu,
2. Kontrol ve sham gruplarına ait sıçanlar ile varikozel grubundaki sıçanların sol testisleri histolojik olarak incelendiğinde; varikozel grubundaki testislerde seminifer tübül hasarını belirleyen Johnsen Skorlarının anlamlı bir şekilde azaldığı,
3. Western blot analizlerinde; oksidatif stres belirteci olan 4-HNE modifiye proteinlerinin ve poli ADP ribozilasyon mekanizmasının esas sorumlusu olan PARP-1 enziminin ve bu enzimin aktivitesi sonucunda üretilen PAR polimerlerinin varikozel gruplarında anlamlı bir şekilde artış gösterdiği,
4. Seminifer tübül evrelendirilmesi göz önüne alınarak, kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırılan varikozel gruplarında, PAR ve PARP-1 immünoaktivitelerinin spermatogenik seri hücrelerinin nükleusunda gözleendiği ve varikozel gruplarında anlamlı bir artış gösterdiği,
5. Kontrol ve sham gruplarıyla karşılaştırıldığında varikozel gruplarında germ hücrelerinin apoptoz oranının anlamlı bir artış gösterdiği,
6. Kontrol ve sham gruplarına ait sıçanlar ile varikozel grubundaki sıçanların sol testisleri histolojik olarak incelendiğinde; varikozel grubu testislerinde yeterince kondanse olmamış nükleusa sahip germ hücrelerinin ve literatürde “simplast” olarak bilinen multi-nükleer hücre tiplerinin var olduğu sonuçlarına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Schlesinger MH, Wilets IF, Nagler HM. Treatment outcome after varicocelectomy. A critical analysis. *Urol Clin North Am* 1994;21(3):517-29.
2. Benoff S, Gilbert BR. Varicocele and male infertility: part I. Preface. *Hum Reprod Update* 2001;7(1):47-54.
3. Hauser R, Paz G, Botchan A, Yogev L, Yavetz H. Varicocele: effect on sperm functions. *Hum Reprod Update* 2001;7(5):482-5.
4. WHO. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* 1992;57:1289-1293.
5. Belloli G, D'Agostino S, Pesce C, Fantuz E. [Varicocele in childhood and adolescence and other testicular anomalies: an epidemiological study]. *Pediatr Med Chir* 1993;15(2):159-62.
6. Cozzolino DJ, Lipshultz LI. Varicocele as a progressive lesion: positive effect of varicocele repair. *Hum Reprod Update* 2001;7(1):55-8.
7. Marmar JL. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update* 2001;7(5):461-72.
8. Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K, Kamidono S. Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl* 1989;22(2):149-59.
9. Comhaire F. The pathogenesis of epididymo-testicular dysfunction in varicocele: factors other than temperature. *Adv Exp Med Biol* 1991;286:281-7.
10. Sweeney TE, Rozum JS, Gore RW. Alteration of testicular microvascular pressures during venous pressure elevation. *Am J Physiol* 1995;269(1 Pt 2):H37-45.
11. Benoff SH, Millan C, Hurley IR, Napolitano B, Marmar JL. Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium in infertile men with left varicocele. *Hum Reprod* 2004;19(3):616-27.
12. Barbieri ER, Hidalgo ME, Venegas A, Smith R, Lissi EA. Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. *J Androl* 1999;20(6):713-7.
13. Meucci E, Milardi D, Mordente A, et al. Total antioxidant capacity in patients

with varicoceles. *Fertil Steril* 2003;79 Suppl 3:1577-83.

14. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 1999;161(6):1831-4.
15. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000;73(3):459-64.
16. Zini A, Defreitas G, Freeman M, Hechter S, Jarvi K. Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000;74(3):461-4.
17. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9(4):331-45.
18. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59(5):1037-46.
19. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999;115(1):1-7.
20. Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998;13(6):1429-36.
21. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997;68(3):519-24.
22. Duru NK, Morshedi M, Schuffner A, Oehninger S. Semen treatment with progesterone and/or acetyl-L-carnitine does not improve sperm motility or membrane damage after cryopreservation-thawing. *Fertil Steril* 2000;74(4):715-20.
23. Shiraishi K, Naito K. Increased expression of Leydig cell haem oxygenase-1 preserves spermatogenesis in varicocele. *Hum Reprod* 2005;20(9):2608-13.
24. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 1996;48(6):835-50.
25. Shiraishi K, Naito K. Generation of 4-hydroxy-2-nonenal modified proteins

in testes predicts improvement in spermatogenesis after varicocelectomy. *Fertil Steril* 2006;86(1):233-5.

26. Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003;42(4):318-43.
27. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11(1):81-128.
28. Cam K, Simsek F, Yuksel M, et al. The role of reactive oxygen species and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vitamin E treatment. *Int J Androl* 2004;27(4):228-33.
29. Kwon YW, Masutani H, Nakamura H, Ishii Y, Yodoi J. Redox regulation of cell growth and cell death. *Biol Chem* 2003;384(7):991-6.
30. Tanaka H, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Kamidono S. Apoptosis-related proteins in the testes of infertile men with varicocele. *BJU Int* 2002;89(9):905-9.
31. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ, Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 2003;80(6):1431-6.
32. Chen CH, Lee SS, Chen DC, et al. Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *J Androl* 2004;25(3):348-53.
33. Ku JH, Shim HB, Kim SW, Paick JS. The role of apoptosis in the pathogenesis of varicocele. *BJU Int* 2005;96(7):1092-6.
34. Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *Bioessays* 2004;26(8):882-93.
35. Lautier D, Lagueux J, Thibodeau J, Menard L, Poirier GG. Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism. *Mol Cell Biochem* 1993;122(2):171-93.
36. Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG, Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 1995;20(10):405-11.
37. D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J* 1999;342 (Pt 2):249-68.
38. Schreiber V, Ame JC, Dolle P, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with

PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* 2002;277(25):23028-36.

39. Malanga M, Althaus FR. The role of poly(ADP-ribose) in the DNA damage signaling network. *Biochem Cell Biol* 2005;83(3):354-64.
40. Meyer-Ficca ML, Meyer RG, Jacobson EL, Jacobson MK. Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(5):920-6.
41. Laniel MA, Bergeron MJ, Poirier GG, Guerin SL. A nuclear factor other than Sp1 binds the GC-rich promoter of the gene encoding rat poly(ADP-ribose) polymerase in vitro. *Biochem Cell Biol* 1997;75(4):427-34.
42. Di Meglio S, Denegri M, Vallefuoco S, Tramontano F, Scovassi AI, Quesada P. Poly(ADPR) polymerase-1 and poly(ADPR) glycohydrolase level and distribution in differentiating rat germinal cells. *Mol Cell Biochem* 2003;248(1-2):85-91.
43. Quesada P, Farina B, Jones R. Poly(ADP-ribosylation) of nuclear proteins in rat testis correlates with active spermatogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1989;1007(2):167-75.
44. Quesada P, Atorino L, Cardone A, Ciarcia G, Farina B. Poly(ADPribosyl)ation system in rat germinal cells at different stages of differentiation. *Exp Cell Res* 1996;226(1):183-90.
45. Di Meglio S, Tramontano F, Cimmino G, Jones R, Quesada P. Dual role for poly(ADP-ribose)polymerase-1 and -2 and poly(ADP-ribose)glycohydrolase as DNA-repair and pro-apoptotic factors in rat germinal cells exposed to nitric oxide donors. *Biochim Biophys Acta* 2004;1692(1):35-44.
46. Alcivar AA, Hake LE, Hecht NB. DNA polymerase-beta and poly(ADP)ribose polymerase mRNAs are differentially expressed during the development of male germinal cells. *Biol Reprod* 1992;46(2):201-7.
47. Tramontano F, Malanga M, Farina B, Jones R, Quesada P. Heat stress reduces poly(ADPR)polymerase expression in rat testis. *Mol Hum Reprod* 2000;6(7):575-81.
48. Tramontano F, Di Meglio S, Quesada P. Co-localization of poly(ADPR)polymerase 1 (PARP-1) poly(ADPR)polymerase 2 (PARP-2) and related proteins in rat testis nuclear matrix defined by chemical cross-linking. *J Cell Biochem* 2005;94(1):58-66.
49. Atorino L, Alvarez-Gonzalez R, Cardone A, Lepore I, Farina B, Quesada P. Metabolic changes in the poly(ADP-ribosylation) pathway of differentiating rat germinal cells. *Arch Biochem Biophys* 2000;381(1):111-8.

50. Maymon BB, Cohen-Armon M, Yavetz H, et al. Role of poly(ADP-ribose)ylation during human spermatogenesis. *Fertil Steril* 2006;86(5):1402-7.
51. Meyer-Ficca ML, Scherthan H, Burkle A, Meyer RG. Poly(ADP-ribose)ylation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis. *Chromosoma* 2005;114(1):67-74.
52. Mandir AS, Poitras MF, Berliner AR, et al. NMDA but not non-NMDA excitotoxicity is mediated by Poly(ADP-ribose) polymerase. *J Neurosci* 2000;20(21):8005-11.
53. Szabo C, Dawson VL. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia-reperfusion. *Trends Pharmacol Sci* 1998;19(7):287-98.
54. Suh SW, Aoyama K, Chen Y, et al. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci* 2003;23(33):10681-90.
55. Kauppinen TM, Suh SW, Genain CP, Swanson RA. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in a primate model of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 2005;81(2):190-8.
56. Berger NA. Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. *Radiat Res* 1985;101(1):4-15.
57. Ha HC, Snyder SH. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(24):13978-82.
58. Yu SW, Wang H, Poitras MF, et al. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 2002;297(5579):259-63.
59. Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly(ADP-ribose)ylation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev* 2005;19(17):1951-67.
60. Jarow JP. Effects of varicocele on male fertility. *Hum Reprod Update* 2001;7(1):59-64.
61. April EW. *NMS Klinik Anatomi*; 1998.
62. Fretz PC, Sandlow JI. Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Urol Clin North Am* 2002;29(4):921-37.
63. Pettersson S, Soderholm B, Persson JE, Eriksson S, Fritjofsson A. Testicular blood flow in man measured with venous occlusion plethysmography and xenon133. *Scand J Urol Nephrol* 1973;7(2):115-9.

64. Steinberger E, Tjioe DY. Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. *Fertil Steril* 1969;20(4):639-49.
65. Chehval MJ, Purcell MH. Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertil Steril* 1992;57(1):174-7.
66. Silber SJ. Microsurgical aspects of varicocele. *Fertil Steril* 1979;31(2):230-2.
67. Shafik A, Moftah A, Olfat S, Mohi-el-Din M, el-Sayed A. Testicular veins: anatomy and role in varicoceles and other pathologic conditions. *Urology* 1990;35(2):175-82.
68. Harrison RJ. The vascular supply to the human testis. *J Anat* 1949;83(Pt. 1):61.
69. Bayard F, Boulard PY, Huc A, Pontonnier F. Arterio-venous transfer of testosterone in the spermatic cord of man. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;40(2):345-6.
70. Agger P. Scrotal and testicular temperature: its relation to sperm count before and after operation for varicocele. *Fertil Steril* 1971;22(5):286-97.
71. Gökçimen DA. Erkek Genital Sistem Histolojisi. In: *Histoloji ve Embriyoloji Ders Sunusu*. SDÜ Tıp Fakültesi, Isparta; 2008.
72. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi "Patolojiye Giriş"*. Ankara: Palme Yayınevi; 2007.
73. Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann N Y Acad Sci* 1952;55(4):548-73.
74. D. R. Lonnie RE. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*; 1990.
75. Clermont Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am J Anat* 1963;112:35-51.
76. Varikosel. In.
77. Noske HD, Weidner W. Varicocele--a historical perspective. *World J Urol* 1999;17(3):151-7.
78. Kendirci M BU, Miroğlu C. Andrologic surgery of the 15th century. In *Cerrahiyyetü'l Haniyye. The History of Male-Female Sexuality and Fertility in Asia Minor (Today's Turkey)*. İstanbul; 2003.

79. Kursh ED. What is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril* 1987;48(3):510-1.
80. Hargreave TB. Varicocele--a clinical enigma. *Br J Urol* 1993;72(4):401-8.
81. Hendry WF, Sommerville IF, Hall RR, Pugh RC. Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol* 1973;45(6):684-92.
82. Cockett AT, Takihara H, Cosentino MJ. The varicocele. *Fertil Steril* 1984;41(1):5-11.
83. Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Behre HM. Treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod* 1995;10(2):347-53.
84. Gorelick JJ, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* 1993;59(3):613-6.
85. Witt MA, Lipshultz LI. Varicocele: a progressive or static lesion? *Urology* 1993;42(5):541-3.
86. 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.
87. 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.
88. J O. Varicoceles in children and adolescents. *Scand J Urol Nephrol* 1973;5:27-32.
89. Akbay E, Cayan S, Doruk E, Duce MN, Bozlu M. The prevalence of varicocele and varicocele-related testicular atrophy in Turkish children and adolescents. *BJU Int* 2000;86(4):490-3.
90. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001;7(5):473-81.
91. Kohler FP. On the etiology of varicocele. *J Urol* 1967;97(4):741-2.
92. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N, Fritjofsson A. Phlebography in varicocele scroti. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 1966;4(5):517-28.
93. Coolsaet BL. The varicocele syndrome: venography determining the optimal level for surgical management. *J Urol* 1980;124(6):833-9.
94. Comhaire F, Kunnen M, Nahoum C. Radiological anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. *Int J Androl* 1981;4(3):379-

87.

95. Braedel HU, Steffens J, Ziegler M, Polsky MS, Platt ML. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol* 1994;151(1):62-6.
96. Dennison AR, Tibbs DJ. Varicocele and varicose veins compared. A basis for logical surgery. *Urology* 1986;28(3):211-7.
97. 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.
98. Grillo-Lopez AJ. Primary right varicocele. *J Urol* 1971;105(4):540-1.
99. Dubin L, Amelar RD. Varicolectomy: 986 cases in a twelve-year study. *Urology* 1977;10(5):446-9.
100. Hargreave TB. Debate on the pros and cons of varicocele treatment--in favour of varicocele treatment. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl 1:151-7.
101. Comhaire F, Zalata A, Schoonjans F. Varicocele: indications for treatment. *Int J Androl* 1995;18 Suppl 2:67-71.
102. Etriby AA, Ibrahim AA, Mahmoud KZ, Elhaggar S. Subfertility and varicocele. I. Venogram demonstration of anastomosis sites in subfertile men. *Fertil Steril* 1975;26(10):1013-7.
103. Tanji N, Fujiwara T, Kaji H, Nishio S, Yokoyama M. Histologic evaluation of spermatic veins in patients with varicocele. *Int J Urol* 1999;6(7):355-60.
104. Harrison RM, Lewis RW, Roberts JA. Pathophysiology of varicocele in nonhuman primates: long-term seminal and testicular changes. *Fertil Steril* 1986;46(3):500-10.
105. Salama N, Bergh A, Damber JE. The changes in testicular vascular permeability during progression of the experimental varicocele. *Eur Urol* 2003;43(1):84-91.
106. Sigman M. Male infertility. *Med Health R I* 1997;80(12):406-9.
107. Turner TT, Brown KJ, Spann CL. Testicular intravascular volume and microvessel mitotic activity: effect of experimental varicocele. *J Androl* 1993;14(3):180-6.
108. Green KF, Turner TT, Howards SS. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J Urol* 1984;131(6):1208-11.

109. Hurt GS, Howards SS, Turner TT. Repair of experimental varicoceles in the rat. Long-term effects on testicular blood flow and temperature and cauda epididymidal sperm concentration and motility. *J Androl* 1986;7(5):271-6.
110. Li H, Dubocq F, Jiang Y, Tiguert R, Gheiler EL, Dhabuwala CB. Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology* 1999;53(6):1258-62.
111. Turner TT, Miller DW. Protein synthesis and secretion by the rat seminiferous tubule in vivo not affected by experimental varicocele. *J Urol* 1996;156(5):1881-7.
112. Sharpe RM. Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 1984;30(1):29-49.
113. Lipshultz LI, Corriere JN, Jr. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol* 1977;117(2):175-6.
114. Dahl HV, HJ. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg Gynecol Obstet* 1959;108:697-705.
115. Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl* 1995;18(4):169-84.
116. Zorngiotti AW, Macleod J. Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril* 1973;24(11):854-63.
117. Goldstein M, Eid JF. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. *J Urol* 1989;142(3):743-5.
118. Mieusset R, Bujan L, Mondinat C, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril* 1987;48(6):1006-11.
119. Lund L, Nielsen KT. Varicocele testis and testicular temperature. *Br J Urol* 1996;78(1):113-5.
120. Salisz JA, Kass EJ, Steinert BW. The significance of elevated scrotal temperature in an adolescent with a varicocele. *Adv Exp Med Biol* 1991;286:245-51.
121. Wright EJ, Young GP, Goldstein M. Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology* 1997;50(2):257-9.
122. Lerchl A, Keck C, Spiteri-Grech J, Nieschlag E. Diurnal variations in scrotal temperature of normal men and patients with varicocele before and after treatment. *Int J Androl* 1993;16(3):195-200.

123. Sofikitis N, Miyagawa I. Left adrenalectomy in varicoceles in rats does not inhibit the development of varicocele-related physiologic alterations. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1993;38(4):250-5.
124. Shafik A, Wali MA, Abdel Azis YE, et al. Experimental model of varicocele. *Eur Urol* 1989;16(4):298-303.
125. Nishiyama H, Danno S, Kaneko Y, et al. Decreased expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am J Pathol* 1998;152(1):289-96.
126. Namiki M, Nakamura M, Okuyama A, et al. Influence of temperature on the function of Sertoli and Leydig cells of human testes. *Fertil Steril* 1987;47(3):475-80.
127. Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C, Gore RW. Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *Am J Physiol* 1991;260(5 Pt 2):H1581-9.
128. Hsu HS, Chang LS, Chen MT, Wei YH. Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *Eur Urol* 1994;25(1):71-5.
129. Hsu HS, Wei YH, Li AF, Chen MT, Chang LS. Defective mitochondrial oxidative phosphorylation in varicocele-bearing testicles. *Urology* 1995;46(4):545-9.
130. Shafik A. Venous tension patterns in cord veins. II. After varicocele correction. *J Urol* 1983;129(4):749-51.
131. Turner TT, Lopez TJ. Effects of experimental varicocele require neither adrenal contribution nor venous reflux. *J Urol* 1989;142(5):1372-5.
132. Comhaire F, Vermeulen A. Varicocele sterility: cortisol and catecholamines. *Fertil Steril* 1974;25(1):88-95.
133. Steeno O, Koumans J, De Moor P. Adrenal cortical hormones in the spermatic vein of 95 patients with left varicocele. *Andrologia* 1976;8(2):101-4.
134. Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology* 1989;124(6):3043-9.
135. Rajfer J, Turner TT, Rivera F, Howards SS, Sikka SC. Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. *Biol Reprod* 1987;36(4):933-7.

136. Turner TT, Lopez TJ. Testicular blood flow in peripubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to the unilateral lesion. *J Urol* 1990;144(4):1018-21.
137. Ghosh PK, York JP. Changes in testicular testosterone and acid and alkaline phosphatase activity in testis and accessory sex organs after induction of varicocele in Noble rats. *J Surg Res* 1994;56(3):271-6.
138. Sofikitis N, Miyagawa I. Bilateral effect of unilateral varicocele on testicular metabolism in the rabbit. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994;39(4):239-47.
139. Kazama T. [Effect of experimental left varicocele on rat Leydig cell function]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1995;86(2):308-15.
140. Cayan S, Kadioglu A, Orhan I, Kandirali 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):1046-9.
141. Hudson RW. Free sex steroid and sex hormone-binding globulin levels in oligozoospermic men with varicoceles. *Fertil Steril* 1996;66(2):299-304.
142. Kass EJ, Freitas JE, Salisz JA, Steinert BW. Pituitary gonadal dysfunction in adolescents with varicocele. *Urology* 1993;42(2):179-81.
143. Sirvent JJ, Bernat R, Navarro MA, Rodriguez Tolra J, Guspi R, Bosch R. Leydig cell in idiopathic varicocele. *Eur Urol* 1990;17(3):257-61.
144. Su LM, Goldstein M, Schlegel PN. The effect of varicocelectomy on serum testosterone levels in infertile men with varicoceles. *J Urol* 1995;154(5):1752-5.
145. Swerdloff RS, Walsh PC. Pituitary and gonadal hormones in patients with varicocele. *Fertil Steril* 1975;26(10):1006-12.
146. Schiff I, Wilson E, Newton R, et al. Serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone responses to gonadotropin-releasing factor in males with varicoceles. *Fertil Steril* 1976;27(9):1059-61.
147. Hudson RW, McKay DE. The gonadotropin response of men with varicoceles to gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 1980;33(4):427-32.
148. 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(5):633-7.
149. Hudson RW, Perez-Marrero RA, Crawford VA, McKay DE. Hormonal parameters of men with varicoceles before and after varicocelectomy. *Fertil*

Steril 1985;43(6):905-10.

150. Segenreich E, Shmuely H, Singer R, Servadio C. Andrological parameters in patients with varicocele and fertility disorders treated by high ligation of the left spermatic vein. *Int J Fertil* 1986;31(3):200-3.
151. Comhaire F, Vermeulen A. Plasma testosterone in patients with varicocele and sexual inadequacy. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;40(5):824-9.
152. Fujisawa M, Hayashi A, Imanishi O, et al. The significance of gonadotropin-releasing hormone test for predicting fertility after varicocelectomy. *Fertil Steril* 1994;61(4):779-82.
153. Hadziselimovic F, Leibundgut B, Da Rugna D, Buser MW. The value of testicular biopsy in patients with varicocele. *J Urol* 1986;135(4):707-10.
154. Jarow JP, Sanzone JJ. Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol* 1992;148(6):1805-7.
155. Cameron DF, Snyder FE. The blood-testis barrier in men with varicocele: a lanthanum tracer study. *Fertil Steril* 1980;34(3):255-8.
156. Turner TT, Jones CE, Roddy MS. Experimental varicocele does not affect the blood-testis barrier, epididymal electrolyte concentrations, or testicular blood gas concentrations. *Biol Reprod* 1987;36(4):926-32.
157. Shook TE, Nyberg LM, Collins BS, Mathur S. Pathological and immunological effects of surgically induced varicocele in juvenile and adult rats. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1988;17(4):141-4.
158. Golomb J, Vardinon N, Homonnai ZT, Braf Z, Yust I. Demonstration of antispermatozoal antibodies in varicocele-related infertility with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fertil Steril* 1986;45(3):397-402.
159. Rogers BJ, Mygatt GG, Soderdahl DW, Hale RW. Monitoring of suspected infertile men with varicocele by the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1985;44(6):800-5.
160. Vigil P, Wohler C, Bustos-Obregon E, Comhaire F, Morales P. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* 1994;26(2):55-60.
161. Benoff S, Barcia M, Hurley IR, et al. Classification of male factor infertility relevant to in-vitro fertilization insemination strategies using mannose ligands, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. *Hum Reprod* 1996;11(9):1905-18.
162. Benoff S CG, Hurley IR Calcium-ion channel blockers and sperm fertilization. *Assist Reprod Rev* 1995;5:2-13.

- 163.** Benoff S, Hurley IR, Barcia M, Mandel FS, Cooper GW, Hershlag A. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Fertil Steril* 1997;67(2):336-47.
- 164.** Hikim AP, Swerdloff RS. Temporal and stage-specific effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated rat. *Endocrinology* 1995;136(1):253-61.
- 165.** Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of germinal epithelium. *Anat Rec* 1998:905-926.
- 166.** Brinkworth MH, Weinbauer GF, Bergmann M, Nieschlag E. Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in elderly men. *Int J Androl* 1997;20(4):222-8.
- 167.** Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipshultz LI, Kim ED. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 1997;158(5):1791-3.
- 168.** Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI, Kim ED. In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. *Fertil Steril* 1997;68(6):1065-9.
- 169.** 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):935-41.
- 170.** 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(5):296-300.
- 171.** Simsek F, Turkeri L, Cevik I, Bircan K, Akdas A. Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. *Arch Esp Urol* 1998;51(9):947-50.
- 172.** Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996;28(4):587-96.
- 173.** Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999;140(4):1709-17.
- 174.** Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of

apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 1993;7(5):643-50.

175. Ku WW, Wine RN, Chae BY, Ghanayem BI, Chapin RE. Spermatoocyte toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;134(1):100-10.
176. Li LH, Wine RN, Chapin RE. 2-Methoxyacetic acid (MAA)-induced spermatoocyte apoptosis in human and rat testes: an in vitro comparison. *J Androl* 1996;17(5):538-49.
177. Holland MK, Alvarez JG, Storey BT. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1982;27(5):1109-18.
178. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* 1993;59(6):1291-5.
179. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays* 1994;16(4):259-67.
180. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* 1989;10(3):214-20.
181. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992;57(2):409-16.
182. Alkan I, Simsek F, Haklar G, et al. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 1997;157(1):140-3.
183. Aitken RJ, 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(2):459-69.
184. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987;8(5):338-48.
185. Weese DL, Peaster ML, Himsl KK, Leach GE, Lad PM, Zimmern PE. Stimulated reactive oxygen species generation in the spermatozoa of infertile men. *J Urol* 1993;149(1):64-7.
186. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. The

reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod* 1999;14(11):2801-7.

187. Mancini A, Conte G, Milardi D, De Marinis L, Littarru GP. Relationship between sperm cell ubiquinone and seminal parameters in subjects with and without varicocele. *Andrologia* 1998;30(1):1-4.
188. Koksall IT, Tefekli A, Usta M, Erol H, Abbasoglu S, Kadioglu A. The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. *BJU Int* 2000;86(4):549-52.
189. Janos Z K, D. Nutrients and cell signaling. In: *Oxidative Stress and Disease*: Taylor&Francis; 2005.
190. Çavdar C SA, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997;3-4:92-95.
191. Burçak G AG. Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004;35.
192. 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.
193. Peltola V, Mantyla E, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the rat testis after cigarette smoke inhalation or administration of polychlorinated biphenyls or polychlorinated naphthalenes. *J Androl* 1994;15(4):353-61.
194. Quinn PG, Payne AH. Oxygen-mediated damage of microsomal cytochrome P-450 enzymes in cultured leydig cells. Role in steroidogenic desensitization. *J Biol Chem* 1984;259(7):4130-5.
195. Chen H, Liu J, Luo L, Baig MU, Kim JM, Zirkin BR. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol* 2005;40(8-9):728-36.
196. Zini A, Schlegel PN. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J Androl* 1996;17(5):473-80.
197. Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl* 1992;13(5):450-5.
198. Banfi B, Molnar G, Maturana A, et al. A Ca(2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem* 2001;276(40):37594-601.
199. 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.

- 200.** Grunewald S, Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Relationship between sperm apoptosis signalling and oocyte penetration capacity. *Int J Androl* 2008;31(3):325-30.
- 201.** 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.
- 202.** Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 2008;153(1):6-20.
- 203.** Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003;9(4):169-76.
- 204.** Zarkovic N. 4-hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med* 2003;24(4-5):281-91.
- 205.** Nadkarni DV, Sayre LM. Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal. *Chem Res Toxicol* 1995;8(2):284-91.
- 206.** Burkle A. Poly (ADP-Ribosyl)ation. Konstanz, Germany: Landes Bioscience; 2006.
- 207.** Chambon P, Weill JD, Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 1963;11:39-43.
- 208.** Sugimura T, Fujimura S, Hasegawa S, Kawamura Y. Polymerization of the adenosine 5'-diphosphate ribose moiety of NAD by rat liver nuclear enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1967;138(2):438-41.
- 209.** Nishizuka Y, Ueda K, Nakazawa K, Hayaishi O. Studies on the polymer of adenosine diphosphate ribose. I. Enzymic formation from nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian nuclei. *J Biol Chem* 1967;242(13):3164-71.
- 210.** Brightwell M, Shall S. Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase in *Physarum polycephalum* nuclei. *Biochem J* 1971;125(3):67P.
- 211.** Durkacz BW, Omidiji O, Gray DA, Shall S. (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature* 1980;283(5747):593-6.
- 212.** Purnell MR, Whish WJ. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J* 1980;185(3):775-7.

213. Benjamin RC, Gill DM. ADP-ribosylation in mammalian cell ghosts. Dependence of poly(ADP-ribose) synthesis on strand breakage in DNA. *J Biol Chem* 1980;255(21):10493-501.
214. Ushiro H, Yokoyama Y, Shizuta Y. Purification and characterization of poly(ADP-ribose) synthetase from human placenta. *J Biol Chem* 1987;262(5):2352-7.
215. Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Perez JM. Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications. *Prog Biophys Mol Biol* 2005;88(1):143-72.
216. Menissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, et al. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *Embo J* 2003;22(9):2255-63.
217. Burkle A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺. *Febs J* 2005;272(18):4576-89.
218. Diefenbach J, Burkle A. Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(7-8):721-30.
219. NCBI P. GenBank XP_037275 residues 796-1014. In; 2009.
220. Wang ZQ, Auer B, Stingl L, et al. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribose)ylation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev* 1995;9(5):509-20.
221. Dantzer F, Giraud-Panis MJ, Jaco I, et al. Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* 2004;24(4):1595-607.
222. Augustin A, Spenlehauer C, Dumond H, et al. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 8):1551-62.
223. Kickhoefer VA, Siva AC, Kedersha NL, et al. The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase. *J Cell Biol* 1999;146(5):917-28.
224. van Zon A, Mossink MH, Schoester M, et al. The formation of vault-tubes: a dynamic interaction between vaults and vault PARP. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 21):4391-400.
225. Smith S, Giriat I, Schmitt A, de Lange T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 1998;282(5393):1484-7.

- 226.** Kaminker PG, Kim SH, Taylor RD, et al. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* 2001;276(38):35891-9.
- 227.** Meyer RG, Meyer-Ficca ML, Jacobson EL, Jacobson MK. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) gene and the common promoter sequence it shares with inner mitochondrial membrane translocase 23 (TIM23). *Gene* 2003;314:181-90.
- 228.** Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* 2000;275(52):40974-80.
- 229.** von Kobbe C, Harrigan JA, Schreiber V, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates both the exonuclease and helicase activities of the Werner syndrome protein. *Nucleic Acids Res* 2004;32(13):4003-14.
- 230.** Oei SL, Ziegler M. ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). *J Biol Chem* 2000;275(30):23234-9.
- 231.** Rouleau M, Aubin RA, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ated chromatin domains: access granted. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 6):815-25.
- 232.** Hassa PO, Hottiger MO. The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell Mol Life Sci* 2002;59(9):1534-53.
- 233.** Petrilli V, Hecceg Z, Hassa PO, et al. Noncleavable poly(ADP-ribose) polymerase-1 regulates the inflammation response in mice. *J Clin Invest* 2004;114(8):1072-81.
- 234.** De Block M, Verduyn C, De Brouwer D, Cornelissen M. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance. *Plant J* 2005;41(1):95-106.
- 235.** Saxena A, Wong LH, Kalitsis P, Earle E, Shaffer LG, Choo KH. Poly(ADP-ribose) polymerase 2 localizes to mammalian active centromeres and interacts with PARP-1, Cenpa, Cenpb and Bub3, but not Cenpc. *Hum Mol Genet* 2002;11(19):2319-29.
- 236.** Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S. Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* 2002;22(1):332-42.
- 237.** Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 1996;65:801-47.

- 238.** Kanai M, Tong WM, Sugihara E, Wang ZQ, Fukasawa K, Miwa M. Involvement of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 and poly(ADP-Ribosyl)ation in regulation of centrosome function. *Mol Cell Biol* 2003;23(7):2451-62.
- 239.** Tarapore P, Tokuyama Y, Horn HF, Fukasawa K. Difference in the centrosome duplication regulatory activity among p53 'hot spot' mutants: potential role of Ser 315 phosphorylation-dependent centrosome binding of p53. *Oncogene* 2001;20(47):6851-63.
- 240.** Smith S, de Lange T. Cell cycle dependent localization of the telomeric PARP, tankyrase, to nuclear pore complexes and centrosomes. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 21):3649-56.
- 241.** Chi NW, Lodish HF. Tankyrase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles. *J Biol Chem* 2000;275(49):38437-44.
- 242.** Sbodio JJ, Lodish HF, Chi NW. Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem J* 2002;361(Pt 3):451-9.
- 243.** Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, et al. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990;348(6300):448-50.
- 244.** Eicher EM, Washburn LL, Schork NJ, et al. Sex-determining genes on mouse autosomes identified by linkage analysis of C57BL/6J-YPOS sex reversal. *Nat Genet* 1996;14(2):206-9.
- 245.** Brennan J, Capel B. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 2004;5(7):509-21.
- 246.** Li Y, Oh HJ, Lau YF. The poly(ADP-ribose) polymerase 1 interacts with Sry and modulates its biological functions. *Mol Cell Endocrinol* 2006;257-258:35-46.
- 247.** Tramontano F, Malanga M, Quesada P. Differential contribution of poly(ADP-ribose)polymerase-1 and -2 (PARP-1 and -2) to the poly(ADP-ribose)ylation reaction in rat primary spermatocytes. *Mol Hum Reprod* 2007;13(11):821-8.
- 248.** Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B. Acute cyclophosphamide exposure has germ cell specific effects on the expression of stress response genes during rat spermatogenesis. *Mol Reprod Dev* 2001;60(3):302-11.
- 249.** Eddy EM, O'Brien DA. Gene expression during mammalian meiosis. *Curr Top Dev Biol* 1998;37:141-200.

- 250.** Maleki S, Keeney S. Modifying histones and initiating meiotic recombination; new answers to an old question. *Cell* 2004;118(4):404-6.
- 251.** McPherson S, Longo FJ. Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids. *Eur J Histochem* 1993;37(2):109-28.
- 252.** Mahfouz RZ, Sharma RK, Poenicke K, et al. Evaluation of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage (cPARP) in ejaculated human sperm fractions after induction of apoptosis. *Fertil Steril* 2009;91(5 Suppl):2210-20.
- 253.** El-Domyati MM, Al-Din AB, Barakat MT, et al. The expression and distribution of deoxyribonucleic acid repair and apoptosis markers in testicular germ cells of infertile varicocele patients resembles that of old fertile men. *Fertil Steril* 2008.
- 254.** Turner TT. The study of varicocele through the use of animal models. *Hum Reprod Update* 2001;7(1):78-84.
- 255.** Demir PDR. *Histolojik boyama teknikleri başvuru kitabı*. Ankara: Palme Yayınevi; 2001.
- 256.** 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.
- 257.** Lewis-Jones DI KD. A modified Johnsen's count for evaluation of spermatogenesis in the rat. *IRCS Med Sci* 1985;13:510-511.
- 258.** Kondo T, Shono T, Suita S. Age-specific effect of phthalate ester on testicular development in rats. *J Pediatr Surg* 2006;41(7):1290-3.
- 259.** Vogel T, Speed RM, Teague P, Cooke HJ. Mice with Y chromosome deletion and reduced Rbm genes on a heterozygous Dazl1 null background mimic a human azoospermic factor phenotype. *Hum Reprod* 1999;14(12):3023-9.
- 260.** Watt DA. Testicular pathology of Merino rams. *Aust Vet J* 1978;54(10):473-8.
- 261.** Murray RM. Scrotal abnormalities in rams in tropical Queensland with particular reference to ovine brucellosis and its control. *Aust Vet J* 1969;45(2):63-7.
- 262.** de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl 1:15-21.
- 263.** Smith R, Kaune H, Parodi D, et al. Increased sperm DNA damage in patients

with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;21(4):986-93.

264. Chen SS, Chang LS, Wei YH. Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radic Biol Med* 2001;30(11):1328-34.
265. Chen LP, Wang SQ, Zhao YZ, Liu L, Wang SX, Lu YZ. [The changes of IL-1 and NO levels in the testes of rats with experimental varicocele]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2002;8(2):125-6.
266. Zini A, Buckspan M, Jamal M, Jarvi K. Effect of varicocelectomy on the abnormal retention of residual cytoplasm by human spermatozoa. *Hum Reprod* 1999;14(7):1791-3.
267. Nallella KP, Allamaneni SS, Pasqualotto FF, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in patients with varicocele. *Urology* 2004;64(5):1010-3.
268. Shiraishi K, Naito K. Effects of 4-hydroxy-2-nonenal, a marker of oxidative stress, on spermatogenesis and expression of p53 protein in male infertility. *J Urol* 2007;178(3 Pt 1):1012-7; discussion 1017.
269. Lee JD, Jeng SY, Lee TH. Increased expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the internal spermatic vein of patients with varicocele. *J Urol* 2006;175(3 Pt 1):1045-8; discussion 1048.
270. de Murcia G, Menissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 1994;19(4):172-6.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Rize’de doğdu. 1995 yılında İstanbul Kazım Karabekir İlkokulu’ndan, 1998’da İstanbul Cemal Diker İlköğretim Okulu’ndan ve 2002 yılında İstanbul Erenköy Kız Lisesi (YDA)’nden mezun oldu. 2002 yılında Akdeniz Üniversitesi’nde Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü bitirdi. 2006 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Üreme Biyolojisi Yüksek Lisans programına başladı. Merih Tekcan İngilizce bilmektedir.