

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL VARİKOSEL OLUŞTURULAN ERKEK RATLARDA İPİLATERAL
VE KONTRALATERAL TESTİSDE APOPİTOZ GELİŞİMİ,
SERBEST OKSİJEN RADİKAL DÜZEYLERİ VE MELATONİN
UYGULAMASININ APOPİTOZU ÖNLEMEDEKİ ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

107985

Dr. Rahmi ONUR

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Atilla SEMERCİÖZ

ELAZIĞ-2001

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin hazırlanması aşamasında her türlü destek ve yardımlarından dolayı değerli hocam Doç. Dr. Atilla SEMERCİÖZ'e minnet ve şükranlarımı arz ederim.

Üroloji ihtisasım süresince eğitimime olan katkılarından dolayı hocalarım; Prof. Dr. Can BAYDİNÇ'e, Doç. Dr. M. Kemal ATİKELER, Doç. Dr. Orhan YALÇIN, Yrd. Doç. Dr. Arslan ARDIÇOĞLU'na ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum mesai arkadaşlarım Uzman Dr. F. Ahmet ŞENOL, Uzman Dr. Ertürk ERGİN, Dr. Yılmaz SALATAN, Dr. M. N. BODAKÇI, Dr. Veysel YÜZGEÇ, Dr. Mustafa KANBAY, Dr. Sezai OĞRAŞ, Dr. Murat BARAZİ, Dr. İmed DUKSAL ve kliniğimiz çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanması aşamasında değerli katkılarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Hayrettin YEKELER ve Patoloji Anabilim dalı tüm öğretim üyeleri ve çalışanları ile Biyokimya Anabilim Dalından Dr. Şemsettin ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, uzmanlık eğitimime başladığım günden itibaren cerrahi ve bilimsel anlamda pek çok şey öğrendiğim ve 4 yıl boyunca her türlü destek ve yardımını hep yanımda hissettiğim hocam Yrd. Doç. Dr. İrfan ORHAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
I. ÖZET	1
II. ABSTRACT.....	3
III. GİRİŞ.....	5
III.1. VARİKOSEL.....	5
III. 1. 1. Sıklık.....	5
III. 1. 2. Anatomik özellikler ve Patofizyoloji.....	6
III. 1. 3. Varikozel ve Testiküler Hasar.....	10
III. 2. APOPİTOZ.....	14
III. 2. 1 . Apopitozun Kontrolü.....	16
III. 2. 2. Aktivasyon.....	17
III. 2. 3. Apopitoz ve Testis.....	19
III. 2. 4. Varikozelde Apopitoz.....	20
III. 2. 5. Testiküler Apopitozda Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidan Tedavi.....	21
III. 3. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ, PATOLOJİK ETKİLERİ VE ANTIOKSİDAN SİSTEMLER.....	23
III. 4. MELATONİN.....	26
III. 4.1. Melatonin Sentezi.....	26
III. 4. 2. Melatonin ve Antioksidan Özellikleri.....	28
IV. GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
IV. 1. Denek Seçimi.....	30
IV. 1. 1. Deneysel Grupların Oluşturulması.....	31

IV. 2. İşlem.....	31
IV. 3. Antioksidan Uygulama ve Peryodu.....	33
IV. 3.1. Melatonin Hazırlanışı.....	33
IV. 4. Dekapitasyon işlemi.....	34
IV. 5. Doku Çıkarılması.....	34
IV. 6. Yöntem.....	35
IV. 7. Hematoksilin ve Eozin Boyama ile Testiküler Doku Analizi.....	35
IV. 8. İmmünohistokimyasal Boyama.....	36
IV. 8. 1. Bcl-2 ve Bax tayini.....	37
IV. 9. Doku Düzeyinde Serbest Radikal ve Antioksidan Düzeylerinin Saptanması.....	39
IV. 10. İstatistiksel Analizler.....	40
V. BULGULAR.....	41
V. 1. İpsilateral Testiküler Apoptoz.....	41
V. 2. Kontralateral Testiste Apoptoz.....	44
V. 3. Bilateral Testiküler Dokuda Spermatogenetik Aktivite ve Apoptozun Karşılaştırılması.....	47
V. 4. Doku MDA ve Antioksidan Düzeyleri.....	49
VI. TARTIŞMA.....	56
VII. KAYNAKLAR.....	67
VIII. ÖZGEÇMİŞ.....	76

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1. C. Elegans ve memeli hücrelerinde apoptozda rol oynayan gen grupları.....	17
Tablo 2. Deneysel varikozel oluşturulan testiste immünohistokimyasal boyama ile germ hücrelerde Bax , Bcl-2'nin belirlenmesi.....	41
Tablo 3. Kontralateral testiste immünohistokimyasal olarak germ hücrelerde Bax ve Bcl-2'nin belirlenmesi.....	45
Tablo 4. Bütün gruplardaki doku MDA düzeyleri.....	49
Tablo 5. Sağ testis tüm grupların doku MDA düzeyleri.....	50
Tablo 6. Her iki testiküler doku SOD düzeyleri.....	52
Tablo 7. Her iki testiküler doku GSH-Px düzeyleri.....	54

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. Testisin venöz sisteminin şematizasyonu.....	7
Şekil 2. Renkli doppler ultrasonografide saptanan stop tipte varikozel. Eksternal ve internal spermatic venler ve varikozel gelişimi.....	9
Şekil 3. Eksternal ve internal spermatic venlerde şant ve varikozel gelişimi.....	10
Şekil 4. Melatoninin kimyasal yapısı.....	27
Şekil 5. Melatonin sentezi.....	28
Şekil 6. Glutasyon peroksidaz varlığında oksidasyon.....	40
Şekil 7. İmmünohistokimyasal Bax negatif boyama. x 200.....	42
Şekil 8. Sham grubu ratlarda güçlü Bcl-2 pozitif boyanma. x 200.....	42
Şekil 9: Deneysel sol varikozele bağlı oluşan apoptozun gruplara göre dağılımı.....	43
Şekil 10. İmmünohistokimyasal olarak az ya da orta düzeyde Bax boyanma. x400.....	44
Şekil 11. Kontralateral testiste apoptoz gelişimi.....	46
Şekil 12. Apoptozun gerçekleştiği olgularda azalmış Bcl-2 boyanma oranı.x400.....	46
Şekil 13. Sham grubu ratlarda testiküler doku normal histopatolojik görüntüsü.....	48
Şekil 14. Varikozele sekonder her iki testiste izlenen spermatogenetik aktivitede anlamlı azalma.....	48
Şekil 15. Grup IV'de izlenen spermatogenetik aktivitede azalma. H&E. x 200.....	49
Şekil 16. Sham ve Çalışma grubundaki ratlarda sol testiküler doku MDA düzeyleri.....	50
Şekil 17. Her iki testiste doku MDA düzeyleri karşılaştırması (p>0.05).....	51
Şekil 18. Her iki testiste doku SOD düzeyleri karşılaştırması.....	52
Şekil 19. Tüm gruplarda sol testis GSH-Px (U/gr.protein) düzeyleri.....	53
Şekil 20. Tüm gruplarda sağ testis GSH-Px (U/gr.protein) düzeyleri.....	54
Şekil 21. Sağ testis doku katalaz düzeyleri.....	55

KISALTMALAR

MDA	Malonil dialdehit
PG	Prostaglandin
ICE	İnterlökin-1 konverting enzim
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
OH [•]	Hidroksil Radikali
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
HIOMT	Hidroksiindol-O-Metil Transferaz
H&E	Hematoksilin ve Eozin
PAP	Peroksidaz-antiperoksidaz
ABK	Avidin-Biotin Kompleksi
TBA	Tiyobarbitürik asit
GSH	Redükte Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon
NADPH	Nikotin amid adenin dinükleotid

I. ÖZET

En sık düzeltilebilir infertilite sebebi olan varikoselde spermatogenezin hangi mekanizma ile bozulduğu tam olarak bilinmemektedir. Varikoselde saptanan histopatolojik değişiklikler genel olarak stres paterni olarak tanımlanmış ve bu değişikliklerin bir bölümü farklı stimuluslarla oluşan apoptozdaki sitomorfolojik değişikliklere benzetilmiştir. Programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan apoptoz, hücrelerde fizyolojik bir oranda gerçekleşebilir ancak farklı patolojik durumlarda artan oranlarda bulunabilir. Ayrıca, varikoselde artan oksidatif stresin apoptozun bir düzenleyicisi olduğu ve buna bağlı antioksidan sistemlerin etkinliğinin artırılarak apoptozun engellenebileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada, deneysel sol varikosele oluşturulan ratlarda bilateral testiküler dokuda apoptoz oranları incelenerek, farklı dozlarda melatonin uygulamasının serbest oksijen radikallerinde oluşturacağı değişim ve buna bağlı apoptozdaki etkilenmenin belirlenmesi amaçlandı.

Wistar tipi 40 erişkin erkek rat çalışmada 4 gruba ayrılarak incelendi: Grup I: sham, Grup II: deneysel olarak sol varikosele oluşturulan grup, grup III: varikosele + 5 mg/kg melatonin verilen ve grup IV: varikosele + 10 mg/kg melatonin verilen gruplar. Tüm gruplarda apoptoz varlığında artan Bax ve apoptozu engelleyen Bcl-2 proteinleri immünohistokimyasal olarak araştırıldı. Bu iki proteinin birbirlerine oranı elde edilerek apoptoz belirlenmeye çalışıldı. Ayrıca biyokimyasal olarak da antioksidan süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz ve Malonildialdehid (MDA) ölçümleri gerçekleştirildi.

Deneysel olarak sol varikosele oluşturulan ratlarda ipsilateral ve kontralateral testiküler dokuda apoptozda anlamlı artış sağlanırken, bu grupta bilateral doku MDA

düzeylei artmış, doku antioksidan düzeylei ise sham grubuna göre anlamlı olarak azalmış olarak bulundu ($p<0.05$). Melatonin 5 ve 10 mg/kg dozunda uygulandığı grup III ve IV'deki ratlarda ise antioksidan düzeylelerinde belirgin artış sağlandı. Her iki grup arasında ise 10 mg/kg melatonin dozunda daha yüksek oranda artış izlendi. Aynı şekilde, bu dozda melatonin uygulaması ile apopitozda anlamlı azalma saptandı ($p<0.05$).

Varikosele bağlı oluşan apopitozun bilateral testiküler hasar oluşturabileceği göz önüne alınacak olursa, erkek infertilitesinde apopitozu engelleyecek tedavi modellerinin de önemi artacaktır. Bu çalışmada, güçlü bir antioksidan olan melatoninin uygulandığı sol varikoselli ratlarda artan doza bağlı olarak antioksidan düzeylelerinde progressif artma ve buna bağlı olarak da apopitozda gerileme saptandı.

Anahtar Kelimeler : Varikosel, Apopitoz, Antioksidan, Melatonin.

II. ABSTRACT

Although varicocele is the most common correctable cause of infertility, it was not completely known by which mechanism the spermatogenesis is impaired in varicocele. Histopathological changes determined in varicocele were generally described as stress pattern and some of these changes were found to resemble the cytomorphological changes induced by apoptosis due to various stimuli. Apoptosis or programmed cell death may be detected in physiological rates within the cells, however it may increase in various disease states. Additionally, it was reported that increased oxidative stress due to varicocele is a regulator of apoptosis and enhancement of the antioxidant systems may prevent the apoptosis. In the present study, bilateral testicular apoptosis was assessed in rats with experimentally induced left varicocele and the changes in free oxygen radicals and subsequent effects on apoptosis was aimed to be determined after the use of melatonin at different doses.

A total of 40 adult male Wistar rats examined in 4 groups: Group I: sham, group II: experimentally induced left varicocele group, group III and IV: varicocele induced rats receiving 5 and 10 mg/kg melatonin, respectively. Apoptosis in bilateral testicles of all groups were compared immunohistochemically in respect to positive Bax and Bcl-2 staining, and biochemically the level of Malonydialdehyde (MDA), antioxidant superoxide dismutase, glutation peroxidase and catalase were determined in all groups.

There was significantly increased rate of apoptosis in ipsilateral and contralateral testes in rats with experimentally induced varicocele. The level of MDA was also found to be increased bilaterally in this group and the antioxidants were significantly decreased when compared to control group($p<0.05$). However, in the groups III and IV of which

melatonin was given at doses of 5 and 10 mg/kg respectively, there was significant improvement at the levels of antioxidants. In comparison of these two groups, it was determined that melatonin at 10 mg/kg dose was more effective. Similarly, at this dose there was a significant reduction in the development of apoptosis ($p < 0.05$).

Considering the bilateral testicular injury formed as a result of varicocele and apoptosis, the importance of treatment modalities in the prevention of apoptosis in male infertility will increase. In the present study, melatonin, a potent antioxidant with increasing doses induced progressive improvement in antioxidant levels and consequently reduced the rate of apoptosis development.

Key Words: Varicocele, Apoptosis, Antioxidant, Melatonin.

III. GİRİŞ

III. 1. VARİKOSEL

Varikozel, spermatik kord içerisinde testiküler venlerin dilatasyonu olarak tanımlanır ve erkek infertilitesinin en sık düzeltilebilir nedenidir(2,61). Varikozel, internal spermatik venin bir pelvik tümör ya da izlediği yol üzerinde herhangi bir patolojik oluşum nedeni ile kompresyona uğraması sonucu, ileri evre böbrek tümörünün renal vene invazyonu sonrası veya bu venin obstrüksiyonuna sekonder olarak oluşabilir. Ancak, klinikte daha sık görülen ve özellikle infertilite ile ilişkili olan; primer varikozeldir (14,37).

III. 1. 1. Sıklık

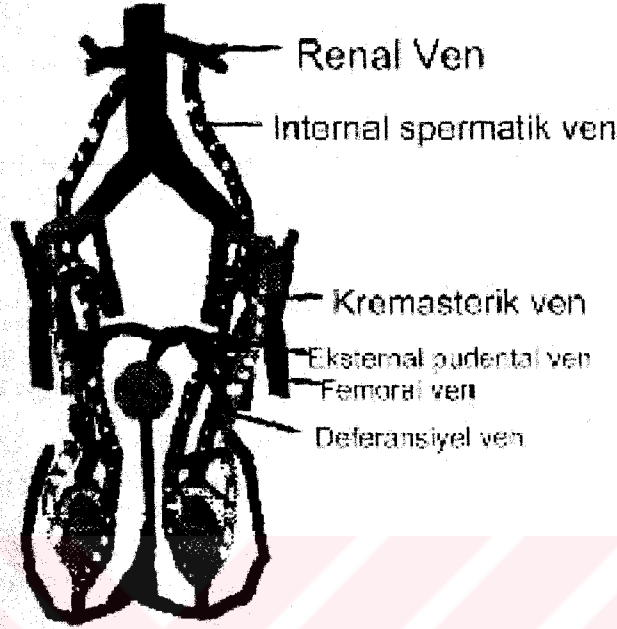
İnfertiliteye yol açan hastalıklar içerisinde ilk sırada gelen patoloji varikozeldir, bu nedenle pek çok araştırmanın konusu olmuştur. Sağlıklı erkeklerin % 10-15'inde, infertil erkeklerde ise % 21-41 oranında varikozel bulunabilir (16,37). Puberte öncesi belirlenmesi oldukça nadirdir ve en erken 9 yaşında saptanabilir (66). Adolesan dönemdeki erkeklerde varikozelin görülme insidansı %16 olarak bildirilmiştir. Bu oran normal erişkin erkek popülasyonundaki varikozel insidansı ile benzerdir (2,14,66). Ayrıca, ırklara göre sıklık farkı bildirilmemiştir (47).

III. 1. 2. Anatomik özellikler ve Patofizyoloji

Sol varikosel oluşumunda ya da sol testiküler venlerin daha sık dilatasyonunda bazı anatomik nedenler ön plandadır. Sağ ve sol testiküler venler farklı drenaj yolları izler (66). Sol internal spermatic ven (gonadal ven) sol renal vene dökülürken, sağda bu drenaj direk olarak inferior vena kavaya olur (Şekil 1). Ayrıca, sol spermatic vende sağa oranla daha az venöz kapakçık bulunur (2).

Varikosel lokalizasyon olarak daha çok sol tarafta görülür. Solda % 80-90 oranında bulunurken, tek başına sağ tarafta varikosel oranı % 2'den azdır (14). Sağ tarafta görülen varikosel situs inversus dışında vena kava inferior ya da sağ internal spermatic vende kompresyona veya obstrüksiyona yol açan patolojilere bağlı olarak oluşur (28).

İnfertilite incelemelerinde, bilateral varikosel insidansı %15-20'leri bulmaktadır. Günümüzde gelişen tanı yöntemleri, venografi ve renkli doppler ultrasonografinin daha sık kullanılması ile bu oran %50'lere ulaşmıştır(16,76).



Şekil 1. Testisin venöz sisteminin şematizasyonu (14)

Venöz sistemde hidrostatik basınç artışı ya da pleksus pampiniformiste reflü oluşturarak varikosele yol açan diğer nedenler şunlardır (Şekil 2,3): 1- Solda internal spermatik vende genellikle rastlanılan anatomik yapı, spermantik kordda ya da retroperitonda birden fazla venin iştirak etmesi ve bunların renal vene girmeden birleşerek daha büyük tek bir ven haline gelmesidir. Dilate olan bu gonadal ven altta pampiniform pleksusta retrograd bir akıma neden olabilir (71).

2- Sol internal spermatik ven sol renal vene dik açıyla drene olurken, sağda dar açı ile oblik olarak vena kava inferiora drene olur. İnternal spermantik ven, solda sağa göre 8-10 cm daha uzundur. Anatomik yapıdaki bu farklılıklar, ayakta dik olarak

duran bir erkekte sol tarafta daha yüksek bir hidrostatik basınç oluşmasına yol açar (14).

3- Sol gonadal venöz sistemde hidrostatik basınçta artışa neden olan bir diğer anatomik mekanizma “nutcracker” yani sıkıştırılma fenomenidir. Farklı damarsal yapıların basısı ve gonadal venlerde yarattıkları basınç artışı yolu ile varikozel gelişimi olarak tanımlanır. Bu fenomenin iki tipi vardır: Proksimal tipte (klasik tip) kişi, özellikle dik pozisyonda iken renal ven, abdominal aorta ve süperior mezenterik arter arasında kompresyona uğradığı için internal spermatic vende dilatasyon oluşmaktadır. Distal tipte ise common iliak arter, sol iliak vene bası yaparak eksternal spermatic vende venöz basıncı artırmaktadır.

4- Pleksus pampiniformise olan reflü: Varikozel oluşumunda reflüye yol açan iki mekanizma vardır. Bunlardan ilki, internal spermatic vendeki valvlerin yokluğu veya sağa göre az sayıda oluşu ya da yetersizliğidir. Ahlberg, 79 olgunun kadavra incelemesinde sol internal spermatic venin kranial kısmında % 46 oranında valv olmadığını göstermiştir (1). Reflüdeki ikinci mekanizma ise, venöz kollaterallerin varlığında kan akımının normal gonadal venöz sisteme olan reflüsüdür (11). Pleksus pampiniformiste kollateral oluşturan iki venöz sistem bulunmaktadır:

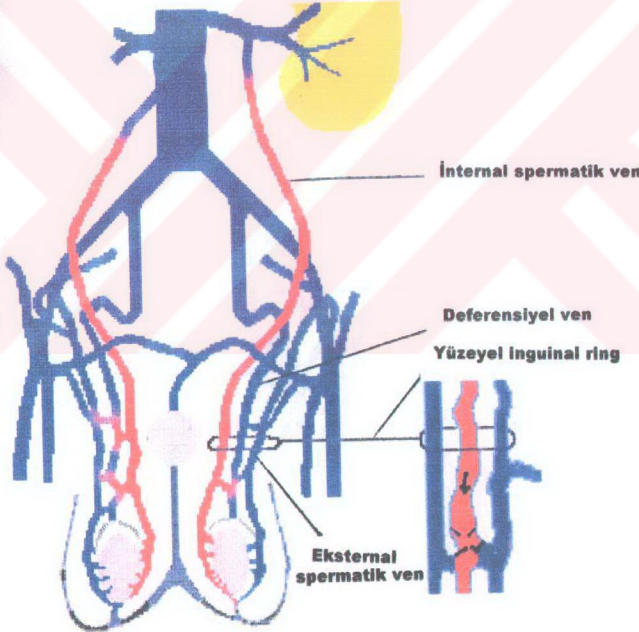
- a) Yüzeysel venöz sistem
- b) Derin venöz sistem.

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

Varikozelde internal venöz sistemdeki dilatasyona ek olarak, eksternal kremasterik sistemin dilatasyonu da klinik öneme sahiptir. Coolsaet, sol ana iliak venin parsiyel

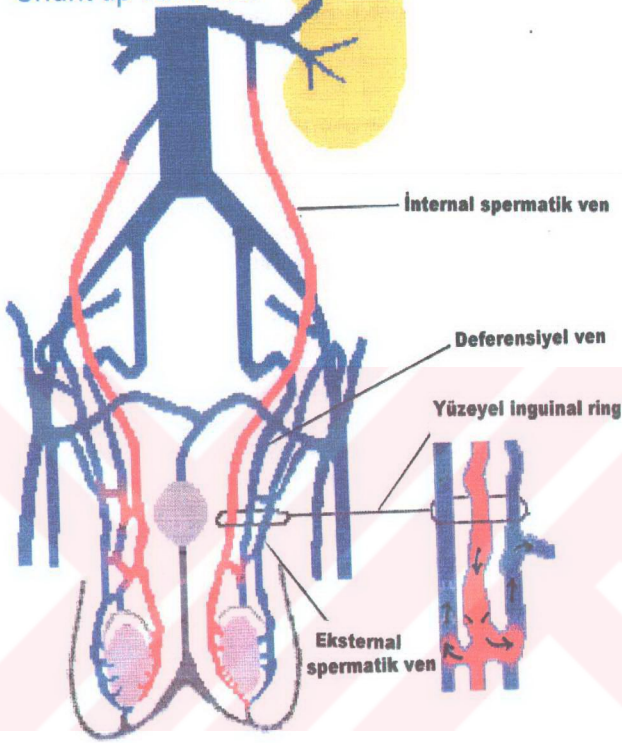
obstrüksiyonunda eksternal spermatic vende ve pampiniform pleksusda dilatasyon olduğunu göstermiştir (13). Eksternal spermatic ven, varikoseli saptanmayan erişkinlerde normalde 2-3 mm çapındadır. Öte yandan, 4 mm ve daha dilate eksternal spermatic ven çapı görülme oranı ise % 16-74 olarak bildirilmiştir (4,27). Varikosektomi sırasında saptanamayan ya da bağlanmayan bu venler nedeni ile nüks oluşabilmektedir.

Stop tip varikosel



Şekil 2. Stop tipte varikosel. Eksternal ve internal spermatic venler ve varikosel gelişimi (14).

Shunt tip varikozel



Şekil 3. Eksternal ve internal spermatik venlerde shunt ve varikozel gelişimi(14).

III. 1. 3. Varikozel ve Testiküler Hasar

Varikozele bağlı oluşan testiküler hasarı açıklamada pek çok farklı hipotez öne sürülmüştür. Hormonal fonksiyon bozukluğu, artmış ya da azalmış testis kan akımı, hipoksi, sigara kullanımı, ısı artışı, renal ve adrenal metabolitlerin reflüsü

varikozel patofizyolojisinde öne sürülen mekanizmalardan birkaçıdır (56,71). Ancak, varikozele bağlı oluşan testiküler disfonksiyonda en çok kabul gören iki teori ısı artışı ve reflüdür (71). Varikozele bağlı oluşan infertiliteyi bu mekanizmalardan sadece biri ile açıklamak mümkün olmayıp varikozeli olan hastalarda infertilite patogenezindeki birden çok neden öne sürölmüştür (61,66).

Oligospermik varikozelli hastalarda skrotum içerisindeki ısı varikozeli olmayan olgularla karşılaştırıldığında yaklaşık 0.6°C daha yüksek bulunmuştur (66,82). Aynı şekilde, varikozeli olan hastalarda testis içerisindeki ısı da 0.78°C daha yüksek bulunmuştur. Öte yandan, varikozel bulunmayan hastalarda yatar pozisyondan ayakta durur pozisyona geçtiklerinde, testislerde 0.5°C'lik bir ısı düşüşü belirlenmiştir (80). Saypol, tek taraflı deneysel varikozel oluşturulan hayvanlardaki incelemeleri sonucu bilateral testiküler ısı artışı ve bozulmuş spermatogenez saptamıştır (61). Klaiber ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, varikozeli olan hastalarda tek başına sigara kullanımının diğer tüm faktörlerden ayrı ayrı daha fazla zararlı etkisi olduğu bulunmuştur (42). Ancak oligospermik hastalarda spermatogenez bozan patoloji ne olursa olsun, testis içi ısısında belirgin artış olduğu bildirilmiştir (66).

Varikozelli hastalarda serum testosteron düzeyinde azalma olduğunu bildiren çalışmalar olmasına rağmen, diğer araştırmalarda hipofizer-hipotalamik yol değerlendirmesi sonrası serum östradiol, LH, FSH ve testosteron düzeylerinde anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır (54,69).

Böbrekte oluşan Prostaglandin (PG) E₂ ve PG F_{2-α} nın testislere olan reflüsü ve buna bağlı bozulan spermatogenez, testiküler disfonksiyonu açıklayan diğer bir teoridir (35). Varikosektomi sonrası semendeki fosfolipaz A₂ düzeyindeki düşüş bu teoriyi desteklemektedir. Böbrekten reflü ile testise gelen diğer metabolitler ise serotonin ve anjiotensin 1'dir. Artmış PG'ler tarafından oluşturulan vazokonstriksiyon nedeni ile sperm transportunda bozulma ve epididim matürasyonunda etkilenme oluşmaktadır (12). Ayrıca, yüksek testis içi ısı artışına bağlı Leydig hücre fonksiyonunda bozulma ve azalan testosteron düzeyi sonrasında da epididimal disfonksiyon ve sperm motilite bozukluğu oluşabilir(14).

Varikoselli olguların % 90'ında azalmış sperm motilitesi vardır. Ayrıca, bu hastalarda sperm hücrelerinde yaygın yapısal bozukluklar ve testis dokusunda da morfolojik değişiklikler bildirilmiştir(14,37). Bunlar; genellikle şekilsiz hücreler topluluğu ve immatür hücrelerden oluşmuştur. Tüm bu histopatolojik değişiklikler "stres paterni" olarak tanımlanmış ve apopitozdaki sitomorfolojik değişikliklere benzetilmiştir (70). Bu nedenle, varikosel ve apopitoz arasındaki ilişki giderek artan bir oranda incelenmekte ve varikosele bağlı testiküler hasarda apopitozun rolü sorgulanmaktadır.

Varikoselde ipsilateral ya da kontralateral testiste makroskopik ve mikroskopik hasar oluşabilir. Çalışmalarda, varikoselli olguların unilateral ya da bilateral testiste, varikosel olmayan olgulara oranla etkilenme olduğu, boyutunda azalma veya atrofi geliştiği gösterilmiştir (47). Genellikle ışık mikroskobunda; immatür germ hücre deskuamasyonunun eşlik ettiği hipospermatogenez veya normal spermatogenez, Leydig hücre hiperplazisi, sertoli hücrelerinde dejeneratif değişiklikler, tübülüslerin çapında azalma ve peritubular fibrozis, spermatid veya spermatozoid düzeyinde

matürasyon arresti gibi değişiklikler tesbit edilebilir. Ancak, bunların hiç biri varikozel için spesifik değildir.

Klinikte varikozelli hastaların bir bölümünde semen dansitesinde bozulma izlenirken aynı yaş grubu ve aynı düzeyde varikozel olan bazı olgularda ise sadece sperm motilite disfonksiyonları bildirilmiştir. Azoospermik hastaların yaklaşık % 12'sinde varikozel bulunmuştur(14,26). Öte yandan, varikozelli hastalarda özellikle erken spermatidleri içeren germinal immatür hücreler ve ağır oligospermi gibi histopatolojik değişiklikler hastaların %90'ından fazlasında saptanmış ve bu durum stres paterni olarak tanımlanmıştır (70). Ancak, başka bir çalışmada bu semen inceleme sonuçlarının varikozel için patognomonik olmadığı, varikozel dışında viral hastalıklar, antispermatojenik ajanlar ve diğer infertilite nedenleriyle de oluşabileceği bildirilmiştir (48).

Varikozel nedeni ile incelenen infertil hasta grubunda semen parametrelerinde görülen çok değişken veriler bu patolojinin tek bir patofizyolojik mekanizma ile etki göstermediğinin bir kanıtıdır. Bu nedenle, varikozele bağlı infertilite oluşumunu açıklamaya yönelik mekanizmaların bir çoğu kısmen ya da tamamen infertilite gelişiminde rol oynayabilir.

Son çalışmalarda testiküler germ hücrelerinde ısı artışına bağlı oluşan dejeneratif değişikliklerin testiste apoptoz gelişimi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (64). Dolayısı ile, varikozel sonucu oluşan infertilite patofizyolojisinde tanımlanan mekanizmalardan sonuncusu apoptoz olmuştur. Normal testiküler dokuda apoptoz belli bir oranda sürekli olarak gerçekleşir (77,78). Varikozelde ise apoptozu artıran stimülüs, oksidan-antioksidan sistemdeki değişiklikler olarak bildirilmiştir (34). Buna

bağlı olarak apopitozda serbest oksijen radikallerinin rolü incelenmekte ve varikosele bağlı hipospermatogenezdeki etkileri araştırılmaktadır.

III. 2. APOPİTOZ

Normal hücre siklusu büyüme, farklılaşma ve ölüm şeklinde devam eden bir süreçtir. Hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir : Apopitoz ve nekroz (30). Multisellüler organizmalarda hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin devamı ile sağlanır. Apopitoz programlı ya da fizyolojik bir ölüm şeklini ifade ettiğinden bu dengenin korunmasında ya da sağlanmasında önemli rol oynar (3). Fizyolojik olarak hücrelerin ölümü uzun yıllardır bilinmesine rağmen apopitoz terimi ilk kez 1972'de Kerr ve arkadaşlarının ölen hücrede gelişen karakteristik yapısal değişiklikleri belirlemeleri ve bu olayı apopitoz olarak tanımlamaları ile kullanılmaya başlanmıştır (39).

Günümüzde metabolizmaların devamlılığında hücre proliferasyonu kadar hücre ölümünün de oldukça önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hücre ölümünde normal fizyolojik bir görevi ifade eden apopitoz üzerinde önemle durulmakta, apopitozu düzenleyen mekanizmalar açıklığa kavuşmakta, bu olayı uyaran veya inhibe eden bir çok sinyal tanımlanmaktadır (3,62). Genetik olarak programlanmış hücre ölümü olarak da tanımlanan apopitoz, normal insan gelişimi için zorunlu bir olaydır (36). Normal metabolizmadaki gerekliliği bir kaç örnekle açıklanacak olursa: doku dengesinin korunması, virüslerce enfekte edilen hücrelerin uzaklaştırılması ve immünolojik toleransın korunması bunlardan bazılarıdır (77). Apopitozun engellenmesi ile gelişimsel anomaliler, otoimmün hastalıklar ve kanser olguları

saptanırken, bu sürecin aşırı işlemesi ile dejeneratif nörolojik ve kas hastalıkları ortaya çıkabilir. Apoptoz, hücre düzeyinde inhibitör ve promotor moleküller tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu moleküllerin denge halleri hücre ölümünün ya da devamının en önemli belirleyicisidir (36).

Nekroz ve apoptoz arasında biyolojik ve morfolojik olarak belirgin değişiklikler vardır. Nekroz, kimyasal ve fiziksel hasarlar sonrası ortaya çıkan ölümü ifade eder. Bu tip bir hücre ölümü patolojik bir ölüm şeklidir (10,77). Başta mitokondri olmak üzere sitoplazma içerisindeki organeller hasar görür, hücre membranı seçici geçirgenliğini (selektif permeabilite) kaybeder ve şişerek rüptüre olur. Hücre içeriği çevre dokuya yayılarak, inflamatuvar bir cevaba neden olur (3). Apoptozda ise nekrozun aksine tamamen farklı bir ölüm gerçekleşir. Hücre şişmesi yerine küçülmesi meydana gelir. Hücre büzülmesi, nükleer zarın altında kromatin yapının kompakt bir hal alması, hücre DNA'sının parçalanarak nükleozom boyutunda bölünmesi, hücre membranında cepçikler "bleb" ya da sitoplazmik çıkıntılar oluşması ve sağlam organellerin başlangıçta korunması bu ölüm şeklinde görülen başlıca basamaklardır (25,31). Apoptotik hücrede nekrozun aksine en çarpıcı değişiklik çekirdekte meydana gelir: Sitoplazmada yoğunlaşma, hücre dansitesinde artma ve çekirdek membranına yakın bölgeden başlayarak kromatinde yoğunlaşma görülür. Daha sonra tüm çekirdek kondanse olur ve DNA'nın parçalanması meydana gelir. Nükleer piknoz karakteristiktir (36). Hücre herbiri membranla kaplı bir çok apoptotik partiküle ayrılır. Komşu hücreler ya da fagositler tarafından bu apoptotik partiküller fagosite edilerek dokudan hızla uzaklaştırıldıkları için nekrozun aksine bu tip hücre ölümünde inflamatuvar reaksiyonlar görülmez. Komşu hücreler ya da organizma zarar görmez ve sakin bir ölüm gerçekleşir(3).

Apoptozun başlamasında ya da durmasında çok çeşitli iç ve dış uyarılar etkili olmaktadır (78). Gelişme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin sinyalleri olmadığında hücreler apoptoza giderler. Ayrıca, toksinler, iyonize radyasyon, reaktif oksijen radikalleri, kimyasal ajanlar, yaşlanma veya iskemi sonucu gelişen hasarlar da hücredeki apoptotik süreci aktive eder (3).

III. 2. 1 . Apoptozun Kontrolü

Hücre ölümünde apoptoza ilişkin en önemli bilgiler küçük bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın yaşam süreci ve genetik yapısının incelenmesi ile ortaya konulmuştur (33,51). Bu nematodun yaşam siklusu incelendiğinde 1090 hücrenin 131'inin ölüme programlandığı saptanmıştır. Programlanmış hücre ölümünün gerçekleşmesinde de bu nematoda spesifik gen grubu tanımlanmıştır. Gelişim süreci detaylı olarak incelenen bu nematoda her hücrenin yaşam süresi önceden belirlenmiş, ölümün başlaması için gerekli genler ve ölümün yani apoptozun engellenmesindeki genler de önceden programlanmıştır. İki farklı gen olan Ced-3 ve Ced-4 apoptozu başlatan en önemli uyarılar olarak görev alırlar (33). Otozomal dominant mutasyonla ced-9 geni varlığında ise bu genin fonksiyonel hale gelişi programlanmış hücre ölümlerini engeller (3). Tablo 1'de ilk tanımlanan apoptoz genlerinin memeli hücrelerindeki eşdeğerleri belirtilmiştir. Interlökin-1-konverting enzim (ICE) intrasellüler bir proteaz olup interlökin klivajı gerçekleştirerek etkisini gösterir. ICE / Ced-3 proteaz grubu moleküllerine benzeyen insanda 10 farklı proteaz daha tanımlanmıştır. Tüm bu moleküllerin aktif kısımlarında sistein aminoasidi bulunur ve hedef proteinlerini aspartik asit lokalizasyonlarında kırarlar; bu özellikleri

nedeni ile de “kaspazlar” olarak tanımlanmışlardır (3). Apoptozda, kaspazlar proteolitik bir zincir oluşturacak şekilde birbiri ardına diğerlerinin aktivasyonuna yol açarak programlı hücre ölümünü indüklerler. Kaspazlar, ced-3 ve ced-4’ün insanlardaki eşdeğerleridir, öte yandan ced-9’un ise insanda anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ile homoloji gösterdiği saptanmıştır (3,33).

Tablo 1. *C. Elegans* ve memeli hücrelerinde apoptozda rol oynayan gen grupları

Apoptoz genleri	
<i>C. elegans</i>	Memelideki eşdeğerleri
Ces (transkripsiyon faktörü)	Multipl dokuya özel genler
Ced-9	Bcl-2 gen grubu
Ced-4	(Kalsiyum-bağlayıcı proteinler)
Ced 3 (sistein proteaz)	ICE grubu proteinler
Nuc I (Nükleaz)	Endonükleazlar

III. 2. 2. Aktivasyon

Apoptoz, tüm organizmalarda devamlı olarak nükleer düzeyde hücre ölümünün kontrollü bir şekilde gerçekleştiği bir hücre sel yok etme mekanizmasıdır (43,73). Dolayısıyla, programlanmış hücre ölümü ya da hücre intiharı sadece aktive edilmeyi bekleyen bir süreçtir (43,75,77). Bu aktivasyonun olduğu ve apoptozun fizyolojik oranın üzerinde gerçekleştiği durumlardan birine virüslerce enfekte edilen bir hücrede meydana gelen değişiklikler örnek olarak verilebilir. Viral enfeksiyonda,

vücutta aktive olan lenfositler enfekte edilen hücrenin kendini imha etmesini sağlar, sonuçta da virüsün çoğalmasını ve diğer hücrelere sıçramasını engellemiş olurlar. Virüsle enfekte olan bir hücre varlığında lenfositler, enfekte hücre yüzeyine farklı proteinler salgılar ve bu yolla hücre içine apoptozu sağlayacak bazı özel proteinler girer. Hücre içerisinde artan bu proteinler ya da kaspazlar proteolitik bir zincir oluşturarak apoptozu artırır (43).

Apoptoz dış uyaranlarla olduğu kadar intrasellüler uyaranlar varlığında da kontrol edilebilir. Hücre içi uyaranlara en iyi örnek Bcl-2 grubu proteinlerdir (5,43). Bcl-2 daha önce tanımlanan apoptoz genlerinden Ced-9'un eşdeğeri (25). Apoptotik stimuluslarla hücre ölümünün incelendiği çalışmalarda, hücre düzeyinde Bcl-2 proteinleri eklendiğinde apoptozun önlendiği saptanmıştır (43). Bu nedenle Bcl-2'nin arttığı olgularda dolaylı olarak apoptozun olmadığı, azaldığı ya da kısmen engellenebildiği sonucuna varılabilir. Öte yandan yine bu gen grubundan olan Bax proteininin Bcl-2'ye oranla daha yüksek bulunması apoptozu indükleyici ve programlanmış hücre ölümünü artırıcı bir faktördür (49). Bcl-2 grubunda yaklaşık 15 farklı bileşen tanımlanmış ve apoptoz indükleyici ve azaltıcı proteinlerin oranı o hücrenin apoptozla olan eğilimini belirlemede kullanılmaya başlanmıştır (25).

Apoptoz kontrolünün sağlanmasında etkili olan faktörlerin kanser, otoimmün hastalıklar, AIDS ve dejeneratif hastalıklar gibi değişik hastalıkların etyolojisinde de etkili olabilecekleri bildirilmiştir (8,77). Bir organizmada yaşamın devamı için fonksiyonları bozulmuş, organizma için gerekliliği kalmamış hücrelerin yok edilmesi gerekmektedir. İstenmeyen bu hücrelerin yok edilmesi, özellikle de çevre sistemlere zarar vermeden, inflamatuvar yanıt oluşturmadan ortadan kaldırılması ancak fizyolojik bir ölüm yolu ile yani apoptozla mümkün olabilmektedir. Apoptozun azalması

kanser, anti-kanser tedaviye direnç ve otoimmün hastalıkların gelişmesine neden olurken, apoptozun önlenemeyen şekilde devamı ise immün yetmezlikler ve dejeneratif doku hastalıkları ile sonuçlanır(3,77,78).

Genel tanımı ile defektif ya da istenmeyen hücrelerin “sakin ölüm” yolu ile organizmadan uzaklaştırılması olan apoptozda, intrasellüler ya da ekstrasellüler uyarıların etkili olduğu bilinmektedir(70). Programlı olarak gerçekleşen bu olay, tamamen organizma kontrolünde olmayabilir ve hücrelerin hastalık, stres ve farklı metabolitlere maruz kaldıkları durumlarda da artabilir (70,75).

III. 2. 3. Apoptoz ve Testis

Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptoz, testiküler dokuda da sık saptanan bir fenomendir. Apoptoz, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar (5). Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (36). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptoz gerçekleştiği bildirilmiştir (40). Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemden erkek germ hücrelerinin % 75'i apoptoza maruz kalır (33). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (3,31,59,77). Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan

hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir (15,30,34,36,73,81).

Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozunun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (18,73). Hipofizektomize immatür ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde masif apoptozun ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da hCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir (18,30). Ayrıca, gonadotropin ya da testosteron eksikliği dışında matürasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda da apoptoz görülebilir (46). Obstrüktif azospermide farklı sonuçlar bildirilse de, apoptoz ve seminal parametreler incelendiğinde sperm konsantrasyon ve motilite bozukluğu olan infertil tüm olgularda artmış DNA fragmantasyonu saptanmıştır (24). Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan sensitivitesi de germ hücrelerin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür (6). Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (10,39,43).

III. 2. 4. Varikoselde Apoptoz

Germ hücre gelişiminde, normal sperm hücre üretiminde, defektif hücrelerin uzaklaştırılmasında vücut savunma sisteminin bir parçası olarak görev alan apoptoz fizyolojik koşullarda kontrollü bir şekilde gerçekleşirken testisi etkileyen farklı hastalıklarda artar (6,22). Hormonal yetersizlik, kriptorşidizm, testise olan kan akımında artma, testiste lokal ısı artışı, venöz staz ve buna bağlı hipoksi, azospermi,

testiküler hipotermi olgularının tümünde testiste artmış oranda apoptoz bulunmuştur (22,30,31,36,61). Testiküler disfonksiyonda saptanan yüksek apoptotik aktive sonrasında, spermatogenezde bozulmanın ve hipospermatogenezin de kontrolsüz apoptozla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (22).

Varikosele bağlı infertilite oluşumunda pek çok faktör tanımlansa da, infertiliteye neden olan bu en önemli patolojide doku hasarı ve bozulmuş spermatogenez ortaya çıkaracak net bir açıklama getirilememiştir. Varikozel nedeni ile incelenen hastaların testislerinde oluşan hasarda apoptozun rolünü inceleyen bir çalışmada, testis histopatolojik incelemesinde olguların üçte birinde testiküler dokuda programlı hücre ölümünde anlamlı oranda artış saptanmıştır (70). Aynı şekilde diğer bir çalışmada ise, deneysel olarak varikozel oluşturulan erişkin tip ratlarda testis kan akımındaki artışa paralel olarak testiküler apoptozda artma bildirilmiştir (34). Öte yandan, varikosele bağlı infertilite gelişen hastalarda testiküler dokuda apoptozda azalmanın bildirildiği literatürdeki tek çalışma Fujisawa ve arkadaşlarına aittir (22). Ancak, araştırmacılar varikozel sonrası infertilite gelişen erkek hastalarda germ hücre apoptozundaki azalmayı açıklayacak mekanizmayı tanımlayamamışlardır (22).

III. 2.5. Testiküler Apoptozda Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidan

Tedavi

Varikozel etyolojisinde ve buna bağlı oluşan testiküler hasarın gelişiminde serbest oksijen radikallerinin (SOR) rolü farklı çalışmalarda incelenmiştir (34,68). Deneysel olarak sol varikozel oluşturulan ratlarda antioksidan uygulaması ile testiküler fonksiyonlarda korunma sağlanmış ve oksidan – antioksidan mekanizmanın

varikozel etyolojisinde etkili olabileceği bildirilmiştir (68). Buttke ve Sandstrom, apopitoz saptadıkları varikozelli olgularda, artan apopitozun kontrolünde oksidatif stresin önemli rolü olduğunu bildirmişlerdir (7).

Klinik tanı ve semen özellikleri ne olursa olsun, infertil hastalarda seminal oksidatif stres bulgularının bulunması infertilite patolojisinde oksidan sistemin rolünün bir göstergesi olabilir. Dolayısı ile bu hasta grubunda infertilite tedavisinde seçilecek olan medikal ya da cerrahi yöntemlerde amaç, oksidatif stresin azaltılması olmalıdır (7,10,34). Varikozel oluşturulmuş deney hayvanlarında testiküler fonksiyonların korunmasında farklı antioksidan ajanlar kullanılmıştır: Taurin, katalaz, süperoksid dismutazın (SOD) bunlardan bir kaçıdır (68). Bu ajanlarla apopitozda genel olarak bir azalma olduğu görülmüş ve taurin uygulamasının en etkin korumayı sağladığı ve semen parametrelerinde bozulmayı en fazla engelleyen ajan olduğu bulunmuştur (68). Farklı stimuluslarla deneysel doku hasarı oluşturulan çalışmalarda hasarın önlenmesinde kullanılan diğer bir antioksidan ajan ise melatonindir. Melatonin, su ve yağlarda yüksek çözünme özelliği ile vücutta kan-testis bariyeri de dahil olmak üzere pek çok sisteme kolaylıkla geçer (38). Literatürde, melatonin genellikle iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı oluşan doku hasarını engellemede kullanılmış ve artan dozlarda etkili antioksidan özellikler göstermiştir (38,58). Diğer tüm antioksidanlarda olduğu gibi, melatonin uygulamasında da amaç; SOR düzeylerinde artışı önlemektir. Dolayısıyla, apopitozun engellenmesinde SOR düzeylerinin kontrolü sağlandığı takdirde varikozele bağlı hasarın da azaltılabileceği farklı çalışmalarda bildirilen ortak sonuçtur (34,68).

III. 3. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ, PATOLOJİK ETKİLERİ VE ANTIOKSİDAN SİSTEMLER

Uzun zamandan beri yüksek konsantrasyondaki oksijenin yaşayan organizmalar üzerinde ölümcül etkilere neden olabildiği bilinmektedir. 1950'lerin başından itibaren serbest oksijen radikallerinin pek çok patolojide rol oynadığı gösterilmiştir (17). Tanım olarak, eşleşmemiş bir ya da daha çok elektronları içeren moleküller olan bu metabolitler in vivo hem yararlı hem de zararlı etkilere sahiptir. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar ve bunların önlenmesindeki savunma mekanizmalarının anlaşılması antioksidan uygulamaların kullanımını da birlikte getirmiştir.

Akciğerlerden giren oksijen lipitte ve akciğer dokularının sıvı fazlarında çözünür, alveolar membranlardan kapillerlere doğru geçiş gösterir ve eritrositler içinde hemoglobine bağlanarak veya kanda çözünerek diğer dokulara dağılır. Doku oksijenizasyonunun normal olduğu durumlarda oksijen çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar sonucu farklı son ürünler verir. Moleküler oksijenin çoğu son ürün olarak su oluşturmak için mitokondriyal sitokrom tarafından redükte edilir. Ancak, hiperoksi, inflamasyon, iskemi, radyasyon, antibiyotik tedavisi alanlarda serbest radikal üretimi büyük oranlara erişir ve membranlar, enzimler, nükleik asit ve polisakkaritler üzerinde toksik etki yaparak çeşitli doku hasarına yol açabilirler (41). Diğer reaksiyonlarda ortaya çıkan son ürünler hücrel hasara yol açar. Hücreleri hasara uğratan son ürün serbest radikaller şunlardır (41):

1- Süperoksit radikali: Oksijen metabolizmasında en sık karşılaşılan serbest radikaldir. Bu radikal pek çok enzimatik tepkimede, bazı hidroksilaz ve oksidaz

tepkimelerinde, mitokondride elektron transportunda, çeşitli biyolojik moleküllerin otooksidasyonunda ve fagositozda rol oynar.

Oksijen radikalleri hangi nedenle hücrede üretilmiş olurlarsa olsunlar, tümü toksik etkilidir ve hücreden uzaklaştırılmaları gereklidir. Süperoksit radikalini yok eden enzim süperoksit dismutazdır (SOD).



(SOD)

2- Hidrojen Peroksit (H₂O₂) : Bütün aerobik hücrelerde bulunan çok çeşitli oksidazlardan biri de hidrojen peroksittir. Tek başına reaktif değildir ancak fotoliz sonucu hidroksil radikallerine dönüşür.

3- Hidroksil Radikali (OH⁻) : Hidroksil radikali güçlü bir oksidan ajan olup, yüksek hız sabiti ile bir çok hücrenel bileşenle reaksiyona girme potansiyelindedir.

Hidroksil radikali üretildiği yerde hemen her molekül ile tepkimeye girer ve diğer serbest oksijen radikal tepkimelerini başlatır. Bu nedenle oksijen radikalleri içerisinde en reaktif ve en toksik olanı hidroksil radikalidir(17,21).

Serbest oksijen radikallerinin üretimi, organizmanın bunları ortadan kaldırma oranından daha yüksek olduğunda dokularda yıkım yani patolojik etkiler görülebilir. Serbest oksijen radikalleri, ekstrasellüler matrikste hiyalüronik asit ve kollajen yapısında değişiklik meydana getirerek dokularda hasara neden olabilirler. SOR, membran yapısında yer alan fosfolipitlerde lipit peroksidasyonuna yol açarak doğrudan hücreye zarar verebilirler. Ayrıca, lizozom ve mitokondrileri çevreleyen zarları yaralayarak bunları da parçalarlar (17,41). Lipit peroksidasyonu son ürünü olarak Malonil dialdehit (MDA) oluşur (17).

DNA üzerine serbest radikallerin saldırısı sonucu; sarmal ayrılması, yıkımı ile baz ve deoksiriboz fragmantasyonu bildirilmiştir. Sonuçta da sitotoksisite, mutasyon ve malign değişim potansiyeli artar.

Doku hasarı oluşan ve buna bağlı SOR'da artış olan önemli klinik durumlardan bazıları şunlardır:

Miyokard enfarktüsü, elektif kardiopleji, organ saklanması ve transplantasyonu, mide mukozasında stres ülseri, şoka bağlı karaciğer yetmezliği, organların iskemi-reperfüzyona maruz kalması, serebral iskemi, artrit, immün yetmezlikler, bağ dokusu hastalıkları, pankreatit, iltihabi barsak hastalıkları, periferik ödem, testiküler hastalıklar, yaşlanma, dolaşım şoku (17).

Serbest oksijen radikallerini oluştukları anda elimine etmede antioksidan sistemler görev alır. Bunlar etkilerini 4 yol ile gösterir (17):

- 1- Toplayıcı (scavenging) etki
- 2- Bastırıcı (quenching) etki
- 3- Onarıcı (repairing) etki
- 4- Zincir kırıcı (chain-breaking) etki.

Bu yolla etki gösteren enzimatik antioksidanlar; SOD, katalaz ve Glutatyon peroksidazdır (GSH-Px). Non-enzimatik etkili olan antioksidanlar ise alfa-tokoferol, karoten, askorbik asit, sistein, seruloplazmin, transferin, albumin ve ekzojen antioksidanlardır.

Serbest oksijen radikali üretiminde süperoksit, süperoksit dismutaz yolu ile hidrojen peroksite dönüştürülür. Daha sonraki basamakta katalaz enzimi tarafından suya parçalanır(17,20).

Lipit hidroperoksit ve Hidrojen peroksit, oksidatif strete artan ve DNA'da zarar verici serbest radikal reaksiyonlarını başlatan moleküllerdir. Diğer bir enzimatik antioksidan olan glutatyon peroksidaz peroksitleri etkisizleştirerek zararlı etkilerin oluşmasını engeller (17).

III. 4. MELATONİN

Bir endojen hormon olan melatonin, pineal bezden salgılanarak retina, tükürük bezleri, karaciğer ve bağırsaklarda sentezlenir ve dolaşıma salınır (44,52). Salınımında en patognomonik özelliği, sirkadian bir ritimde olması ve karanlık fazda serum düzeyinin gün içi konsantrasyonundan 5 ya da 10 kat daha fazla olmasıdır (38,53).

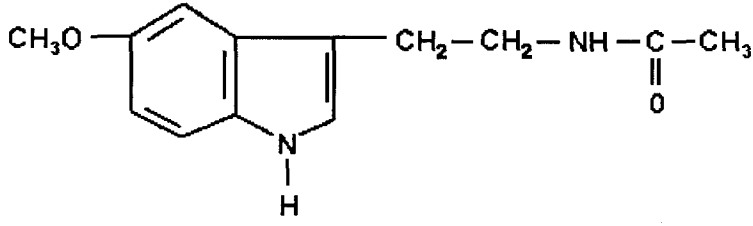
Bir indolamin olan melatonin, tüm subsellüler kompartmanlara ve hücre nükleuslarına geçiş gösterir ve çok büyük bir alanda oluşabilecek bir oksidatif hasarı önlemede etkili olabilir. Melatonin ortamdaki hidroksil radikallerini elimine etmede diğer iki antioksidan ajan olan glutatyon ve mannitolden daha etkilidir (38).

III. 4.1. Melatonin Sentezi

Melatonin sentezinde ışık en önemli belirleyicidir. Karanlıkta uyarılan süperior servikal gangliondan gelen beta adrenerjik postganglionik sempatik sinir sistemi lifleri ile melatonin sentezi uyarılmış olur (67). Melatonin sentezinin ışık varlığında azaldığı bildirilmiştir (67,72).

Memelilerde pineal bez, elektrik sinyallerini hormonal sinyallere çeviren nöroendokrin bir iletici olarak görev yapmaktadır. Pineal bezden iki grup endojen

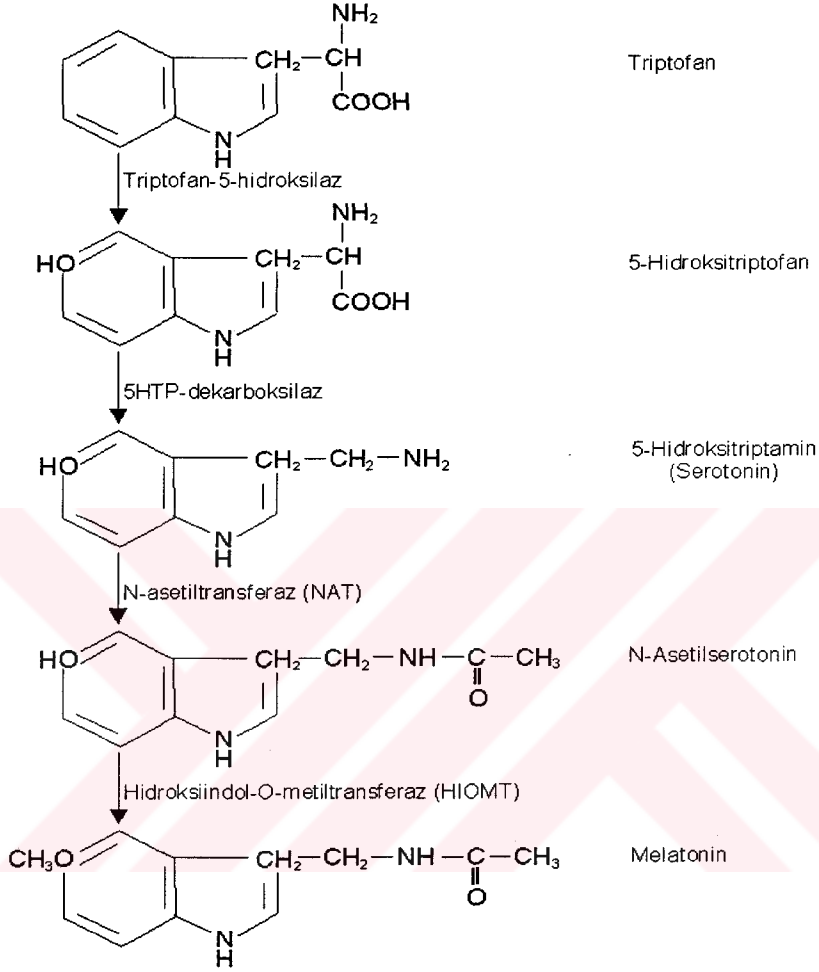
madde salgılanmaktadır. Bunlar indolaminler ve peptidlerdir. İndolaminlerden en önemlisi 232 molekül ağırlıklı melatonin olarak bilinen N-asetil-5- metoksitriptamindir (44,53,67,72) (Şekil 4).



Melatonin= N-Asetil-5-metoksitriptamin

Şekil 4. Melatoninin Kimyasal Yapısı .

Melatonin sentezinde substrat olarak Triptofan kullanılır. Bu aminoasit, triptofan hidroksilaz enzimi katalizörlüğünde 5-hidroksitriptofana hidroksillenir. Daha sonraki basamakta ise 5-hidroksitriptofan, aromatik L-amino asit dekarboksilaz enzimi ile 5-hidroksitriptamine (serotonin) dekarboksile olur. N-Asetiltransferaz enzimi serotoninini N-asetilserotonine ve daha sonra da hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi ile melatonine dönüşüm gerçekleştirilir (Şekil 5) (57).



Şekil 5. Melatonin sentezi

III. 4. 2. Melatonin ve Antioksidan Özellikleri

Yüksek oranda lipofilik özellikte olan melatonin rahatlıkla tüm dokulara geçiş gösterebildiğinden hücre içi organelleri serbest oksijen radikallerinin oluşturacağı zararlı etkilerden korumada, bilinen en güçlü antioksidanlardan biridir (36,52,53).

Deneysel olarak SOR artışı sağlanan ratlarda melatonin uygulaması ile hepatik hücrelerde DNA hasarının engellendiği dolayısıyla melatoninin dokuların yüksek serbest oksijen radikallerine maruz kaldıkları durumda oldukça koruyucu bir rol oynadığı bildirilmiştir (57). Melatonin in vivo ve in vitro diğer antioksidanları da aktive eder, bu özelliği ile de güçlü bir antioksidan olarak bilinmektedir (57,58).

Tüm aerobik organizmalarda var olduğu düşünülen melatoninin oksijen kaynaklı radikallerin üretildiği her dokuya geçebileceği bildirilmiştir (57). Ayrıca bu molekülün yüksek dozlarda dahi bilinen bir yan etkisi yoktur çünkü, endojen olarak salgılanmasından dolayı aşırı konsantrasyondaki melatonin organizma tarafından ortadan kaldırılmaktadır. İnsanlarda, melatonin 5 yıl boyunca 300 mg/gün dozunda herhangi bir yan etkiye yol açmamıştır (65).

Bu çalışmada, organizmada lipofilik özelliğinden dolayı hemen hemen tüm dokulara geçiş gösterebilmesi, bilinen en güçlü serbest oksijen radikal yok edicisi ya da antioksidan ajan oluşu, oksijen radikalleri içerisinde en zararlı molekül olan OH⁻ radikallerini daha spesifik olarak elimine etmesi ve yüksek dozlarda dahi toksik olmayışı nedeni ile melatonin testiste gelişebilecek olan apopitozu önlemede bir antioksidan ajan olarak kullanıldı. Deneysel olarak sol varikozel oluşturulan ratlarda her iki testiste varikosele bağlı apopitoz oluşup oluşmadığı, apopitoz gelişmişse bunun serbest oksijen radikalleri ile olan ilişkisi ve sonuçta da melatoninin bu yolla apopitozu engellemedeki rolü araştırıldı.

IV. GEREÇ VE YÖNTEM

IV. 1. Denek Seçimi

Bu deneysel çalışma için kullanılan 40 adet Wistar tipi erkek rat, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsünden temin edildi. Yaş olarak tüm ratlar 12 – 20 haftalık erişkin tipte olup ağırlıkları 250-350 gram arasında değişmekte idi. Çalışma, Temmuz 2001 ile Ağustos 2001 tarihleri arasında yapıldı ve deneyde ratlara uygulanan cerrahi işlemler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Ratlar 4 farklı gruba randomize olarak ayrıldılar. Sham grubu ratlar (n=10), Deneysel olarak sol varikozel oluşturulan grup(n=10) ve deney süresince farklı dozlarda antioksidan Melatonin uygulanan grup III ve IV (n=20). Tüm ratlar 18-21°C oda sıcaklığında ve 12 saat karanlıkta kalmaları ve 12 saat ışık almaları sağlanarak diüurnal ışık şartlarında, standart rat yemi ile beslenerek ve şehir içme suyu verilerek her bir kafeste beşerli olarak saklandılar. Ratların bakımları ve barındırılmaları etik kurallar doğrultusunda Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı hayvan bakım laboratuvarında gerçekleştirildi. Deney gerçekleştirildikten sonra varikosele bağlı testislerde oluşan hasarın gözlenmesi için 30 gün beklendi (45,74).

IV. 1. 1. Deneysel grupların oluşturulması

Çalışmada toplam 40 adet erişkin Wistar tipinde erkek rat kullanıldı.

I.Grup (n=10): Sham operasyonu uygulanan ratlar. Varikozel insizyonunu takiben işlemin gerçekleştirilmeden bırakıldığı grup.

II.Grup (n=10) : Deneysel olarak sol varikozel oluşturulan grup

III.Grup (n=10) : Deneysel olarak sol varikozel oluşturulan ratlara deney süresince intraperitoneal 5 mg/kg/gün dozunda melatonin (Sigma, St. Louis, MO) uygulanan grup.

IV. Grup: (n=10) : Deneysel olarak sol varikozel oluşturulan ratlara deney süresince intraperitoneal 10 mg/kg/gün dozunda melatonin uygulanan grup.

IV. 2. İşlem

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı (26.7.2001, karar no: 14) alındıktan sonra deneysel sol varikozel oluşturulacak ve sham operasyonu uygulanacak olan ratların tümü işlemden 18 saat öncesinden başlayarak sadece su içmelerine izin verilerek aç bırakıldılar. Ratlarda genel anestezi oluşturmak amacı ile 75 mg/kg dozunda Ketamine hidroklorid (Ketalar flakon, Eczacıbaşı, İstanbul) ve 8 mg/kg dozunda Xylazine hidroklorid (Rompun flakon, Bayer, İstanbul) kullanıldı. Anestezik ajanlar ratların musculus biceps femoris semitendiosus ve musculus gluteus maksimus kaslarına uyan bölgeye intramusküler olarak uygulandı. Tüm ratlar sırt üstü yatırıldı ve batın orta hat çizgisi her iki yanda 1'er cm'lik alan traş edilerek tüylerden arındırıldı. Cerrahi alan açığa çıkarıldıktan sonra % 10 Povidone Iodine

solüsyonu ile temizlendi ve 2 dakika süre ile bekletildi. Yalnızca cerrahi alan açıkta kalacak şekilde batın steril örtülerle kapatıldı.

a)Sham operasyonu (Grup I) (9,45): Steril cerrahi aletlerle karın ön yüzüne 2 cm'lik bir insizyon uygulandı. Linea alba üzerinden cilt cilt altı, karın ön duvarı ve periton geçilerek batın içerisine ulaşıldı. İntestinal segmentler medialize edilerek solda böbrek bulundu ve sol renal ven açığa çıkarıldı. Proksimalde yağ dokusu disseke edildi ve inferior vena kava ve internal spermatic ven bileşim noktaları saptandı. Vena kavaya yakın lokalizasyonda ince uçlu bir klemple sol renal venin altından geçildi ve 4-0 ipek sütür ven etrafından geçirildi. Ancak bağlanılmadan çıkarıldı. Batın ön duvarı ve cilt tam kat 3-0 ipekle kapatıldı ve sham operasyonu sonlandırıldı.

b) Deneysel sol varikozel oluşturulan grup (Grup II,III,IV) (9,45): Sham operasyonu uygulanan grupta olduğu gibi sol renal venin proksimalde disseksiyonuna kadar aynı işlemler uygulandı. Renal ven etrafı çepeçevre dönülerek internal spermatic venin giriş noktasından daha medial bir lokalizasyonda 4-0 ipek kullanılarak sol renal ven çapı azaltıldı. Bu işlem gerçekleştirilirken sol renal ven çapına uyan farklı çapta (0.50 mm-0.85 mm) metal problardan faydalanıldı. İnternal spermatic venin sol renal vene bağlandığı noktanın medialinde renal ven üzerine venin çapına uygun kalınlıktaki metal prob konuldu. Renal ven etrafından geçirilen 4-0 ipek, ven ve metal çubuğun her ikisini içerisine alacak şekilde bağlandı. Daha sonra metal prob geri çekilerek venin sütür noktasına kadar genişlemesine olanak sağlandı. Bu yolla parsiyel ligasyon uygulanan sol renal venler ortalama %50 oranında daraltılmış oldu. İşlemin uygulandığı ratlarda parsiyel bağlanma noktasının lateralinde basınç artışı ve buna bağlı internal spermatic vende dilatasyon olduğu gözlemlendi.

IV. 3. Antioksidan Uygulama ve Peryodu

Deneysel sol varikozel oluşturulmasını takiben testiste biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklerin oluşumu için 4 ya da 8 hafta beklenilmesi önerilmiştir (68). Ancak, sol varikozel uygulanan ratlarda yapılan farklı çalışmalarda genellikle uygulanan deney süresi 30 gündür (45,74).

Bu çalışmada farklı gruplarda incelenen ratların ilk 2 grubuna (Grup I ve II) her gün intraperitoneal olarak vücut ağırlıklarına göre melatonin uygulanan grupla aynı hacimde serum fizyolojik uygulandı. Otuz gün boyunca grup III ve IV'deki ratlara sırası ile 5 mg/kg/gün ve 10 mg/kg/gün dozunda özel olarak hazırlanan melatonin intraperitoneal olarak uygulandı (29).

Melatonin uygulaması her gün diüurnal ritme uygun olarak aynı saatte, melatoninin en düşük düzeylere indiği düşünölen saatlerde (öğle sonu saat 4 ya da 5'de) yapıldı.

IV. 3. 1. Melatonin Hazırlanışı

Melatonin, daha önce de belirtildiği gibi ışıktan olumsuz olarak etkilenen ve tamamen ışık almayan ortamda -20°C'de saklanması önerilen bir maddedir. Bu nedenle deney süresince melatonin, belirtilen ısıda alüminyum folyoya sarılarak saklandı. Günlük enjeksiyonlar öncesinde ilacın yarılanma ömrünü ve etkinliğini değiştirmemek için melatonin özel olarak ve bir günlük enjeksiyon dozunda hazırlandı. Bunun için melatonin steril şartlarda tartılarak saf etanol içerisinde

çözündü ve vortekslendi, daha sonra üzerine % 0.9'luk izotonik sodyum klorür ilave edilerek sonuçta 1:10 dilüsyonunda taze bir çözelti hazırlanmış oldu.

IV. 4. Dekapitasyon işlemi

Deney sonunda, incelenecek olan serum örneklerinin ve her iki testis dokusunun alınabilmesi için ratlar giyotin ile dekapite edildiler. En az stres oluşması için işlemler 5-10 saniye içinde gerçekleştirildi. Tüm ratlar için ardarda yapılan dekapitasyon işleminde, her bir hayvanın kesiminden önce giyotin musluk suyu ile yıkandı ve temizlenerek kurutuldu.

IV. 5. Doku Çıkarılması

Dekapite edilen hayvanlardan kan örneği elde edildikten sonra skrotal bir insizyon uygulandı ve her iki testis açığa çıkarıldı. Tunika vaginalisler uç kısmından 5mm'lik insizyonla açıldıktan sonra her iki testis, caput epididimis, vaz deferens ve spermatik kan damarları skrotum dışına alınarak bilateral orşiektomi yapıldı.

Testisler tüm bu çevre dokulardan ince disseksiyonla ayrıldı ve vertikal olarak orta hattan ikiye bölündü. Her iki testisin yarı kesitleri birer örnek biyokimyasal, birer örnek de histopatolojik inceleme uygulanmak üzere dondurularak, alüminyum folyoya sarıldı ve -20°C'de inceleme gerçekleştirilinceye kadar saklandı.

IV. 6. Yöntem

Bu çalışmada ölçülecek olan parametreler için biyokimyasal, histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanıldı. Histopatolojik incelemelerde Hematoksilin ve Eozin (H&E) boyama ile örneklerde spermatogenezdeki değişiklikler araştırıldı. Çalışmada apoptozun araştırılmasında immünohistokimyasal boyama ile Bax ve Bcl-2 aktiviteleri belirlenerek bu iki proteinin birbirlerine olan oranları incelendi.

Biyokimyasal ölçümlerde her iki testis doku örnekleri homojenize edildi ve örneklerde antioksidan düzeyleri ve doku MDA tayini yapıldı.

IV. 7 Hematoksilin ve Eozin Boyama ile Testiküler Doku Analizi

Histopatolojik incelemede kullanılacak olan testis doku örnekleri tekrar ikiye ayrıldı ve bir bölümü immünohistokimyasal boyama yani Bax ve Bcl-2 tayini için saklandı. Kalan doku örneği standart yöntemlerle rutinde kullanılan tekniğe uyarak histopatolojik inceleme için önce % 10 Formol solüsyonunda bekletildi. Daha sonra parafine gömülen örnekler histolojik kesitler hazırlanarak H&E ile boyandı. Işık mikroskobu ile kesitlerde yapılan histolojik incelemelerde seminifer tübüller, interstisyel ödem, peritübüler hyalinizasyon ve spermatogenez incelendi. İncelemelerde seminifer tübüllerde genel olarak izlenen germ hücre yapıları, nükleer kromatinde kondansasyon, sitoplazmik boyamada artma ya da azalma, farklı germ hücre düzeylerinde matürasyon arresti incelendi.

Histopatolojik incelemelerin sınıflandırılmasında:

- Spermatogenetik aktivitede (+++) azalma : Şiddetli germ hücre kaybı, peritübüler hiyalinizasyon, spermatogenezin olmaması ya da minimal gerçekleşmesi,
- Spermatogenetik aktivitede (++) azalma : Orta düzeyde hücre kaybı, germ hücre sitoplazmik boyamada azalma, spermatosit düzeyinde matürasyon arresti
- Spermatogenetik aktivitede (+) azalma : Minimal düzeyde hücre kaybı, germ hücre sitoplazmik boyamasında çok az azalma.

IV. 8. İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünezimatik ya da immünohistokimyasal boyama teknikleri, doku (hücre) antijenlerinin görülebilmelerine olanak sağlarlar. Bu tekniklerde temel prensip antikorların immünoreaktivitelerinden faydalanmak olup, aynı zamanda işlem, enzimlerin kimyasal özellikleri ve bunların renksiz substrat-kromojenlerle reaksiyona girmeleri sonucu oluşan renkli son ürünün incelenmesi esasına dayanır (19).

İmmünohistokimyasal boyamalarda günümüzde indirekt yöntemler kullanılmaktadır. Boyamada peroksidaz-antiperoksidaz (PAP) enzim sisteminin geliştirilmesi ile immünohistokimyasal boyamanın sensitivitesi daha da artırılmıştır. Hsu ve arkadaşları tarafından avidin-biotin kompleksinin (ABK) de geliştirilmesi ile immünohistokimyasal boyamadaki gelişmeler sürmüştür (32).

İncelemelerin gerçekleştirilebilmesi için immünohistokimyasal boyama öncesi dokular fikse edilmeli ve işleme tabi tutulmalıdırlar. Fiksasyon ile eksizye edilmiş doku otolizden korunmuş olur, antijenitesi kaybedilmez, doku bileşenlerinin refraktif indeksi artırılır ve doku işlemine karşı hücre içeriklerinin direnci artırılmış olur. En

yaygın kullanılan doku fiksatifleri ; Paraffin-gömülü doku, dondurulmuş doku ve diğer spesimenlerdir.

Boyamanın değerlendirilmesinde pozitif kontrol dokular öncelikle incelenmelidir. Kırmızı renkte bir son ürün bulunması pozitif bir reaktivitenin bir göstergesidir. Pozitif kontrol dokuları pozitif boyama göstermezlerse test geçerliliğini yitirir(50). Negatif kontrol dokusunda özel boyanmanın bulunmaması hücre ya da hücre içeriği ile antikorların çapraz reaksiyon vermediklerini gösterir. Çalışılan dokunu incelemesi ise en son olarak gerçekleştirilmektedir. Pozitif boyanma oranı negatif kontroldeki arka zemin spesifik olmayan boyamaları ile karşılaştırılır ve spesifik alanda pozitif boyanmanın olmaması antijenin olmadığı şeklinde ifade edilir (19,32). Tüm bu temel prensipler gözönüne alınarak, çalışmada elde edilen testiküler doku örneklerine Labvision Corp. Neomarkers 2000 kataloğunda önerildiği şekilde immünohistokimyasal boyama uygulandı (50).

IV. 8. 1. Bcl-2 ve Bax Tayini

Bcl-2, ilk kez insan B-hücre lenfomasında t(14;18) translokasyonu kırılma noktasından klonlanmıştır (23). Hücre membranına bağlı bir proteini kodlayarak bcl-2 geni hücre ölümünü normalde engeller. Hücre ölümünde reaktif oksijen moleküllerinin etkilerinin incelendiği bazı çalışmalarda ise Bcl-2'nin doza bağlı olarak hücreyi oksidasyon sonucu oluşan hasardan koruduğu bildirilmiştir (25,43).

Çalışmamızda varikozel uygulanan testiste ve karşı testiküler dokuda immünohistokimyasal boyama ile olarak anti-rat Bcl-2 antikor ve anti-Bax protein (Labvision Corp. Neomarkers, Fremont, CA 94539, USA) kullanılarak germ hücre

apoptozunun varlığı araştırıldı. Değerlendirmede, anti-rat bcl-2 ve anti-bax antikorları ile immünohistokimyasal boyama gerçekleştirildi ve pozitif boyama alanları her iki protein kompleksi için ayrı ayrı değerlendirildi. Bcl-2'nin genellikle geç spermatositler, spermatogonia ve spermatidlerde saptandığı bildirilmiştir(70). Bu çalışmada da ağırlıklı olarak bu germ hücrelerdeki apoptoz araştırıldı.

Apoptozda rol oynadığı bildirilen diğer bir molekül ise Bax protein kompleksidir (43,49). Bax, Bcl-2 gen grubuna ait bir protein kompleksi olmasına rağmen hücre düzeyinde hücre ölümünün indükleyicisi olup programlı hücre ölümünde artan bir moleküldür (43). Pek çok biyolojik sistemin incelenmesi ile metabolizmanın gelişim sürecinde hücrelerin bir ölüm stimulusuna karşı verecekleri cevabı belirlemede Bcl-2/Bax proteinleri oranının etkili olduğu bildirilmiştir (43)

Tüm örneklerde germ hücre apoptozunu belirlemek için pozitif Bcl-2 ve pozitif Bax boyanma alanları saptandı. Aynı kesitte boyanan hücreler bcl-2 ve bax pozitifliği açısından karşılaştırıldı. Her bir spesimende daha önce belirtildiği gibi Bcl-2/Bax oranının yüksek olduğu olgularda apoptozun önlendiği ya da apoptoza karşı direnç olduğu, bu oranın düşük yani Bax'ın daha yüksek olarak bulunduğu örneklerde ise apoptozun gerçekleştiği kabul edildi. İmmünohistokimyasal yöntemle Bax ve Bcl-2 gen grubu üyeleri daha önce Beumer ve arkadaşları tarafından tanımlanan yöntemle gerçekleştirildi. Buna göre germ hücrelerde apoptozun incelenmesinde en sık Bax ve Bcl-2 antikorları ile boyanan hücreler spermatogonia, erken spermatositler, geç spermatositler, spermatidlerdir (5). Bu çalışmada da hem Bax hem de Bcl-2 boyamalarında spermatogonia, spermatosit ve spermatid düzeyinde boyama derecelerine göre inceleme yapıldı. Değerlendirmede güçlü boyama (++) , Orta ya da zayıf boyama (+) ve boyama saptanamaması ise (-) olarak belirtildi (5).

IV. 9. Doku Düzeyinde Serbest Radikal ve Antioksidan Düzeylerinin

Saptanması

Doku düzeyindeki incelemeler için öncelikle homojenat hazırlandı. Bunun için bilateral orşiektomi sonrası testiküler doku örnekleri soğuk %0.9'luk NaCl ile yıkandı. Ölçüm yapılıncaya dek bu örnekler -20°C'de bekletildi. Daha sonra cam-cam homojenizatörle doku örnekleri incelemeler için homojenize edildi.

A)Doku Lipit Peroksit (MDA) ölçümü

Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA tayini Satoh ve Yagi'nin daha önce tanımladıkları bir yöntemin modifiye bir formu ile yapıldı (60,79).

Prensip: Elde edilen homojenatta bulunan lipit peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın, aerobik şartlarda, pH: 3.4 olduğu bir ortamda tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de inkübasyonu sonucu oluşturduğu renkli kompleksin spektrofotometrik olarak ölçümü ile sonuç elde edilir.

B)Eritrosit Süperoksit Dismutaz (SOD) Tayini:

Eritrosit SOD enzim aktivitesi, Randox firmasının (Randox lab.,Diamond Road, Crumlin,BT 29,UK) enzimatik metodla çalışan RANSOD adlı ticari kiti kullanılarak ölçüldü.

C) Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesi

GSH-Px, hidrojen peroksit (H-O-O-H) varlığında redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) yükseltgenmesini kataliz eder. Hidrojen peroksidin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'ye indirgenir. Bu aktivite sırasındaki absorbans farkının 340 nm'de okunması ile enzim aktivitesi ölçülür.

GSH (redükte glutatyon) -----GSSG (Okside glutatyon)

GSH-Px

Şekil 6. Glutatyon peroksidaz varlığında oksidasyon

D)Katalaz Ölçümü

Hidrojen peroksitin ultraviyole aralığında düşen dalga boyu değerlerde artan bir absorpsiyon göstermesi esasına dayanır. 240 nm dalga boyunda doğru ölçüm yapan spektrofotometre ile ölçüm yapılır.

IV. 10. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizlerde lipit peroksidasyon ürünü olan MDA ve antioksidanların karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Çalışmada incelenen sham, varikozel ve 5mg/kg ve 10 mg/kg melatonin uygulanan grupların tümünün ayrı ayrı birbirleri ile karşılaştırılmasında Student's t testi ve apopitozun karşılaştırılmasında ise non-parametrik bir test olan ki-kare testleri kullanıldı. Tüm karşılaştırmalar SPSS 10.0 bilgisayar programı ile gerçekleştirildi.

V. BULGULAR

V.1. İpsilateral Testiküler Apoptoz

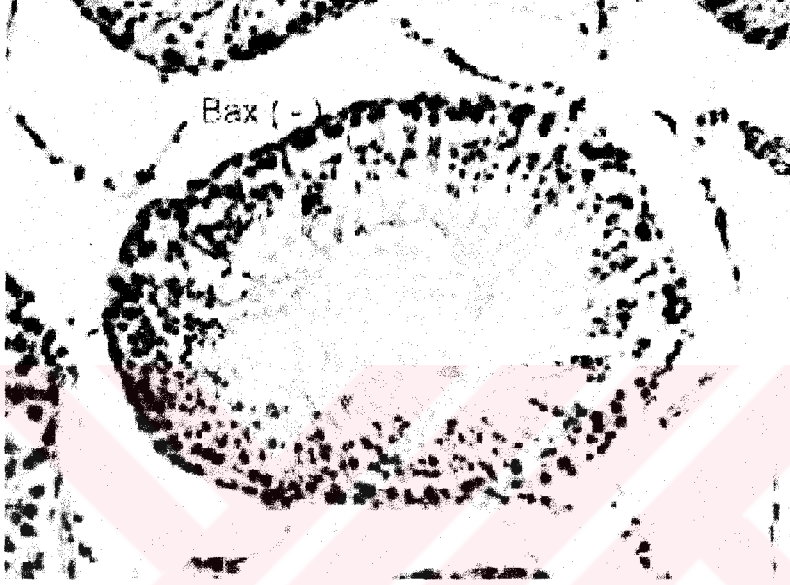
Deneysel sol varikosel oluşturulan erkek ratlarda Bax ve Bcl-2 protein ekspresyonları ayrı ayrı spesimenlerde değerlendirildi. Boyama olmayan germ hücreler (-) olarak kabul edildi. Öte yandan Bax ve Bcl-2 için tüm örnekler zayıf, orta ve güçlü boyama şeklinde gösterildi. Çalışmada incelenen sol testiküler immünohistokimyasal Bax ve Bcl-2 sonuçları Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Deneysel varikosel oluşturulan testiste immünohistokimyasal boyama ile germ hücrelerde Bax , Bcl-2’nin belirlenmesi

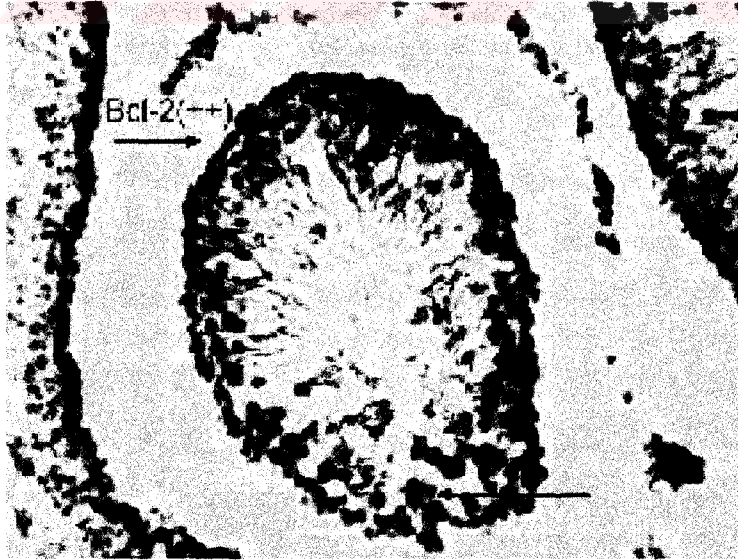
	Grup I		Grup II		Grup III		Grup IV	
	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2
Spermatogonia	— ^a	++ ^b	++	+ ^c	++	+	—	++
Erken Spermatozoid	—	++	++	—	+	+	+	++
Geç Spermatozoid	—	+	++	+	+	—	+	++
Spermatid	—	+	+	+	+	—	+	++

^a : boyama olmaması, ^b : güçlü boyama , ^c : orta ya da düşük düzeyde boyanma ,

Sham operasyonu uygulanan ratların (Grup I) sol testis histopatolojik incelemelerinde immünohistokimyasal Bax boyaması negatif idi (Şekil 7). Öte yandan bu gruptaki olguların tümünde belirgin Bcl-2 pozitifliği belirlendi (Şekil 8). Bu nedenle Bcl-2 / Bax oranı Bcl-2 lehine artmış olarak bulundu (Tablo 2).

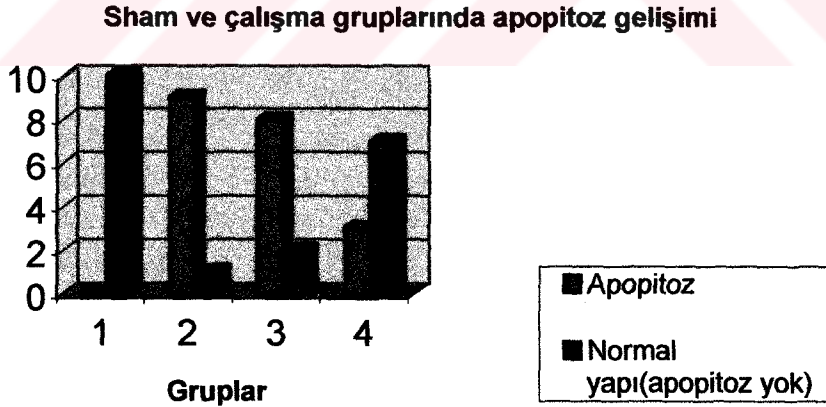


Şekil 7. İmmünohistokimyasal Bax negatif boyama. x 200.



Şekil 8. Sham grubu ratlarda güçlü Bcl-2 pozitif boyanma. x 200.

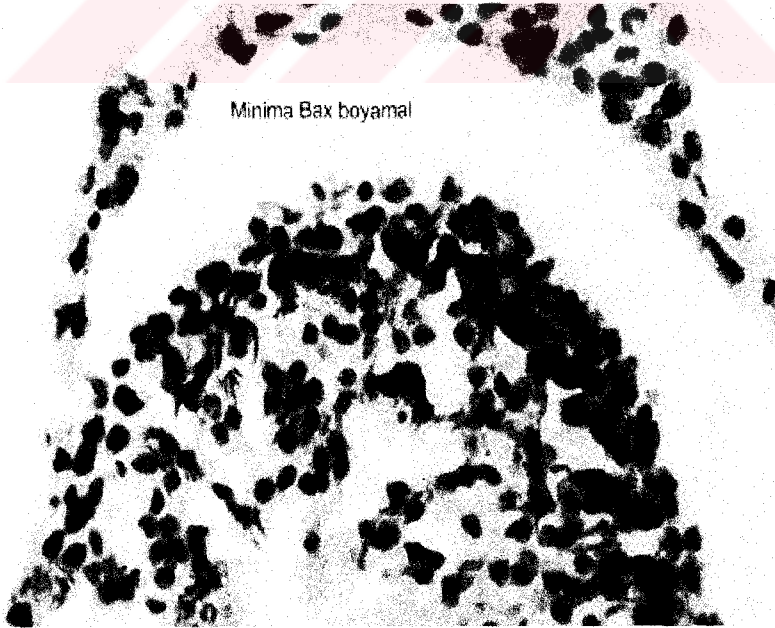
Sol testiküler incelemelerde grup II’de grup III’e oranla Bax boyaması, Bcl-2’ye göre artmış olarak saptandı. Bu oranlar dikkate alındığında apopitozun her iki grupta da artmış olduğu belirlendi (Şekil 9). İki grup arasında arasında Bax/Bcl-2 oranı açısından anlamlı farklılık izlenmezken ($p>0.05$), bu gruplar, sham grubundaki ratlarla karşılaştırıldığında her iki grupta apopitozdaki artış sham grubuna göre (grup I) istatistiksel olarak anlamlı idi (Grup I ve II; $x^2 : 13.33$, $p<0.001$ ve grup I-III ; $x^2:10.76$, $p<0.001$) (Şekil 9). Grup IV’de Bax/Bcl-2 oranı Bcl-2 lehine anlamlı olarak artmış olarak saptandı (Tablo 2). Grup IV’deki ratlar grup I ile karşılaştırıldığında apopitoz gelişimi açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi ($x^2:0.267$, $p:0.606$,Tablo 2). Bu gruptaki ratlarda yüksek dozda melatonin (10mg/kg) uygulaması ile 10 ratın 7’sinde apopitozdaki artış engellendi (şekil 9).



Şekil 9: Deneysel sol varikosele bağlı oluşan apopitozun gruplara göre dağılımı

V . 2 . Kontralateral Testiste Apopitoz

Grup II ve III sağ testis; spermatogonia, erken spermatozoid, geç spermatozoid ve spermatozoid düzeyinde (+) Bax boyama izlendi (Şekil 10). Bu grupta Bcl-2’de ise anlamlı oranda artmış bir boyama saptanmadı. Bax/Bcl-2 oranları karşılaştırıldığında Grup II ve III’de apopitoz geliştiği izlendi (Şekil 11). Tablo 3’de tüm gruplarda sağ testiküler Bax ve Bcl-2 boyanma oranları gösterilmiştir. Gruplar arasında tek yönlü varyans analizi ile yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0.0001$). Gruplar ayrı ayrı incelendiklerinde ise apopitozun Grup I ve IV’de minimal oranda gerçekleştiği görüldü (Şekil 11).



Şekil 10. İmmünohistokimyasal olarak az ya da orta düzeyde Bax boyanma. x400

Tablo 3. Kontralateral testiste immünohistokimyasal olarak germ hücrelerde Bax ve Bcl-2'nin belirlenmesi

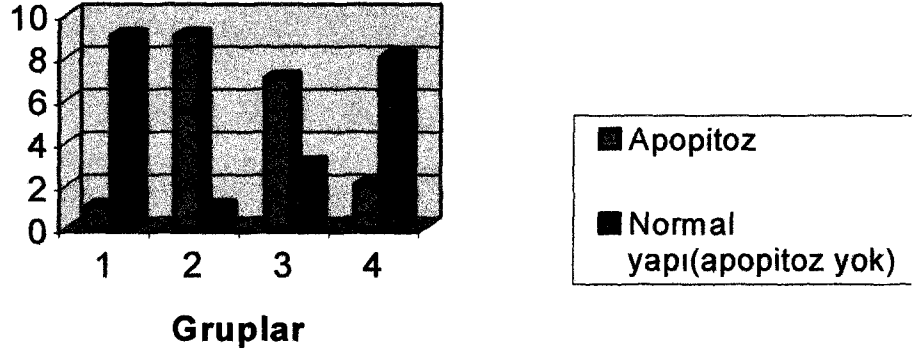
	Grup I		Grup II		Grup III		Grup IV	
	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2	Bax	Bcl-2
Spermatogonia	— ^a	++ ^b	++	—	+ ^c	—	—	++
Erken Spermatosit	—	++	+	+	+	+	—	++
Geç Spermatosit	—	++	+	—	+	—	+	++
Spermatid	—	+	+	+	+	+	+	++

^a : boyama olmaması, ^b : güçlü boyama, ^c : orta ya da düşük düzeyde boyanma,

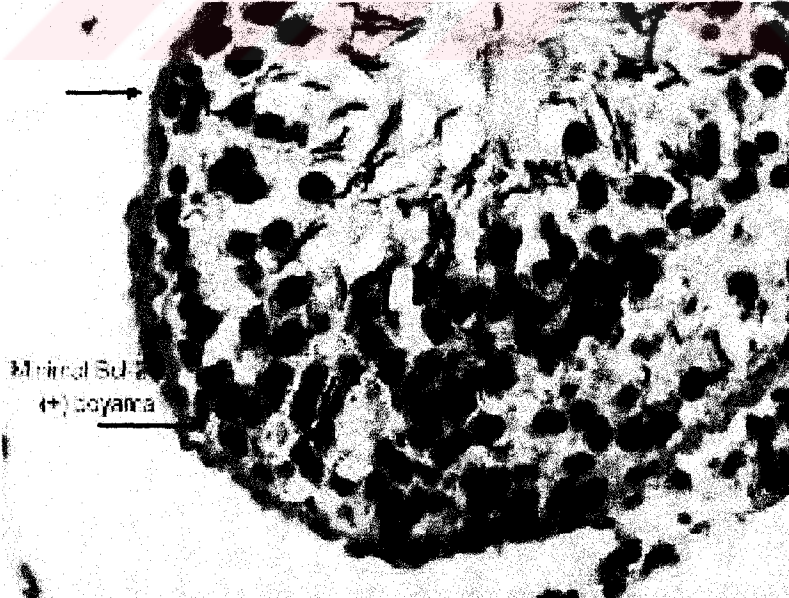
Tablo 3'de de görüldüğü gibi Grup I'deki ratlarda sağ testiküler doku germ hücrelerdeki apoptoz oranı grup II ve III'e göre anlamlı olarak azalmış idi (grup I ve II; χ^2 : 9.989, p:0.002, grup I ve III ; χ^2 : 5,495, p:0.019).

Grup II ve grup III arasında ise apoptoz gelişimi açısından her iki grupta anlamlı farklılık saptanmadı (χ^2 : 0.952, p:0.329). Her iki grupta da Bcl-2'de azalmış boyanma saptandı (Şekil 12). Öte yandan, antioksidan ajan olan grup IV ile grup I arasında anlamlı fark saptanamazken, bu grupta apoptoz grup II ve III'e göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi (χ^2 : 7.200, p:0.007 ve χ^2 : 3.333, p:0.68).

Kontralateral testiste apopitoz oranları



Şekil 11. Kontralateral testiste apopitoz gelişimi.

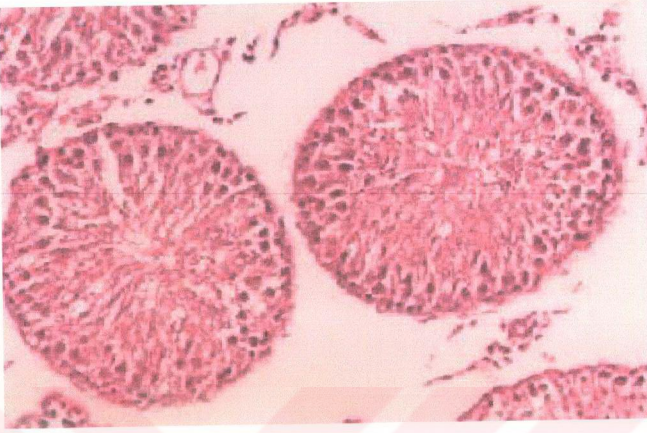


Şekil 12. Apopitozun gerçekleştiği olgularda azalmış Bcl-2 boyanma oranı.x400

V. 3. Bilateral Testiküler Dokuda Spermatogenetik aktivite ve Apoptozun Karşılaştırılması

Deneyssel sol varikozel oluşturulan erkek ratların her iki testis dokularının ışık mikroskobu ile incelemelerinde sham grubu ratlarda spermatogenetik aktivitede azalma saptanmadı (Şekil 13). Sol testis incelemelerinde grup II ve grup III'de spermatogenetik aktivite (++) düzeyinde azalma gösterdi (Şekil 14). Öte yandan grup IV'de ise bu azalma (+) düzeyinde idi (Şekil 15). Bulguların istatistiksel karşılaştırılmasında tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar saptandı, ancak grup IV'deki azalma grup II ve III'e göre oldukça düşük idi.

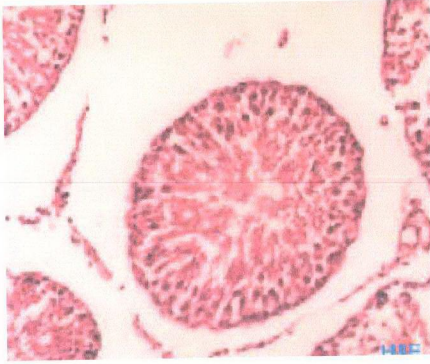
Kontralateral testis incelemelerinde de spermatogenezdeki azalma grup II, III ve IV'de (+) düzeyinde olup, grup I'den anlamlı olarak farklı idi ($p < 0.05$). Ayrıca daha önce belirtildiği gibi apoptoz açısından da tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar mevcuttu. Sağ ve sol testisin spermatogenetik aktivitelerindeki bozulma ve apoptoz oranları karşılaştırıldığında bu iki testis arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı (tüm gruplar için $p > 0.05$).



Şekil 13. Sham grubu ratlarda testiküler doku normal histopatolojik görüntüsü. H&E. x 200.



Şekil 14. Varikosele sekonder her iki testiste izlenen spermatogenetik aktivitede anlamlı azalma. x 200, H&E.



Şekil 15. Grup IV’de izlenen spermatogenetik aktivitede azalma. H&E. x 200

V. 4. Doku MDA ve Antioksidan Düzeyleri

A. Doku MDA düzeyleri

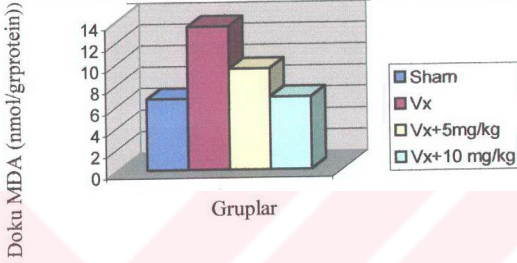
Tablo 4’da sham (grup I), yalnızca varikozel uygulanan grup II, varikozel oluşturularak 5 mg/kg melatonin uygulanan grup III ve melatoninin 10 mg/kg dozunda uygulandığı grup IV’deki erkek ratların sol testiküler doku düzeyindeki ortalama MDA değerleri görülmektedir.

Tablo 4. Bütün gruplardaki doku MDA düzeyleri

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Doku MDA (nmol/grprotein)	6,67 ±1.01 (6-9,30)	13.43 ±2.25* (11-17,3)	9,5±1,76* (8,0+13,6)	6,81±0,77 (6,10-8,50)

*F=40.97 , p<0.05

Gruplar arasında doku MDA düzeyleri incelendiğinde grup I ve IV hariç, tüm gruplarda sol testiküler MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$). Grup I ve IV arasında ise doku MDA düzeyleri açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p: 0.761$)(Şekil 16).



Şekil 16. Sham ve Çalışma grubundaki ratlarda sol testiküler doku MDA düzeyleri.

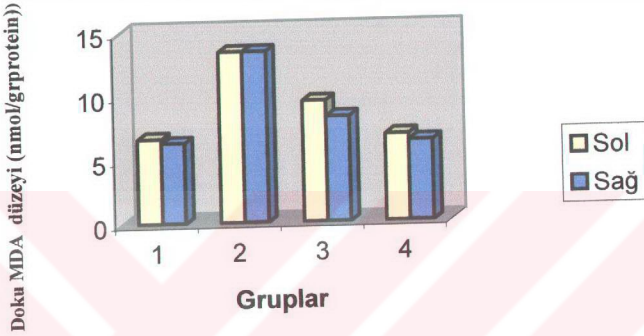
Bu çalışmada ipsilateral testiküler doku incelemesine paralel olarak karşı testiste de doku düzeyindeki lipid peroksidasyonun derecesi ve antioksidan sistemlerin değişimi incelendi. Sağ testiküler dokudaki MDA düzeyleri Tablo 5’de özetlenmiştir. Sağ testis doku MDA düzeyleri arasında da sol testis MDA düzeyleri gibi Grup II ve III diğer gruplara oranla daha yüksek MDA düzeyine sahiptiler.

Tablo 5. Tüm grupların sağ testis doku MDA düzeyleri

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Doku MDA (nmol/gr.protein)	6,33 ±0.63 (4.9-7,20)	13.36 ±1.69* (11-15,4)	8,23±0,39* (7,7-9,0)	6,30±0,60 (5,2-7,1)

* F= 119.521, p:0.001

Doku MDA açısından her iki testis karşılaştırmalarında gruplar arasında istatistiksel farklılık saptanmadı ($p>0.05$) (Şekil 17).



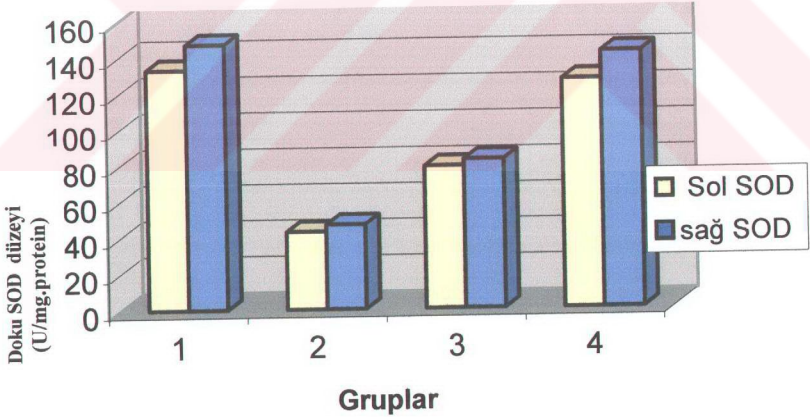
Şekil 17. Her iki testiste doku MDA düzeyleri karşılaştırması ($p>0.05$).

B. Doku Süperoksit Dismutaz Düzeyleri

Her iki testis homojenizasyonu sonrası doku düzeyinde SOD incelemeleri Tablo 6'da görülmektedir. Antioksidan defans sisteminin önemli bir bileşeni olan SOD düzeyi grup II'de sağ ve sol testislerde diğer gruplara oranla anlamlı düşüş gösterdi. Grup III'de de doku SOD düzeyleri her iki testis grup I ve IV'e oranla anlamlı olarak azalmış idi (Şekil 18). Deney grubunda incelenen tüm ratlarda SOD düzeyleri açısından sadece grup I ve IV arasında anlamlı farklılık saptanmadı (sol: $p: 0.1$, sağ: $p: 0.114$).

Tablo 6. Her iki testiküler doku SOD düzeyleri

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Sol testis Doku SOD (U/mg.protein)	133,65 \pm 30,69 (110-210)	43,27 \pm 6,57 (33-53)	79,25 \pm 6,82 (69-91)	127,23 \pm 15,01 (92-115)
Sağ testis Doku SOD (U/mg.protein)	147,63 \pm 34,87 (114-216)	47 \pm 10,77(40-75)	82,56 \pm 15,67 (54-102)	142,90 \pm 28,41 (109-192)
P	0.09	0.07	0.9	0.01

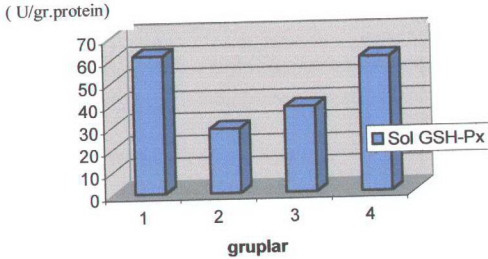


Şekil 18. Her iki testiste doku SOD düzeyleri karşılaştırması.

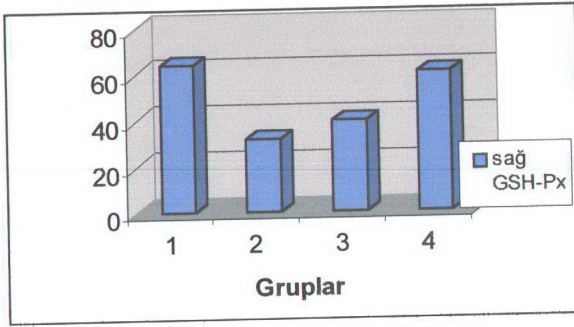
Doku SOD düzeyleri karşılaştırmasında grup III'de doku SOD düzeyi azalmış ancak grup I düzeylerine gerilememiştir (Tablo 6). Grup IV'de ise 10 mg/kg melatoninin, doku antioksidan düzeylerini anlamlı olarak artırarak etkili olabileceği saptandı.

C. Doku GSH-Px düzeyleri

Şekil 19 ve 20'de ipsilateral ve kontralateral testis dokusunda homojenizasyon sonrası ölçülen Glutasyon peroksidaz düzeyleri verilmiştir. Her iki testiste de gruplar arasında antioksidan GSH-Px düzeyleri açısından tek yönlü varyans analizi ile (ANOVA) anlamlı fark saptanırken, her iki testiste de sadece grup I ve IV arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($F: 101.351, p: 0.001$) (Tablo 7).



Şekil 19. Tüm gruplarda sol testis GSH-Px düzeyleri.



Şekil 20. Tüm gruplarda sağ testis GSH-Px (U/gr.protein) düzeyleri

Tablo 7’de her iki testiste doku GSH-Px değerleri ve istatistiksel karşılaştırılmaları verilmiştir.

Tablo 7. Her iki testiküler doku GSH-Px düzeyleri

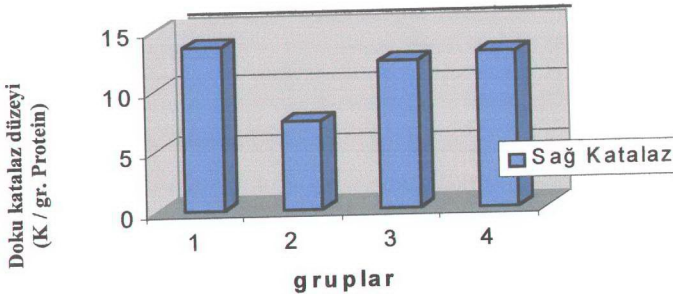
	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Sol testis Doku GSH-Px (U/gr.protein)	61,4 ±4,52 (55-67)	28,7 ±5,33 (21-38)	38,2±3,85 (31-44)	59,8±6,26 (50-71)
Sağ testis Doku GSH-Px (U/gr.protein)	64,2 ±5,05 (57-74)	31 ±4,85 (22-40)	39,5±4,97 (30-46)	60,3±4,99 (56-75)
p	0.1	0.14	0.06	0.8

D. Doku Katalaz Düzeyleri

Sol testiküler doku katalaz ölçümlerinde sham grubunda $13.44 \pm 1,76$ K/gr.protein katalaz oranı saptanırken, bu oran deney grubu olan grup II, III ve IV'deki ratlarda sırası ile $7,21 \pm 1,34$, $10,85 \pm 2,04$ ve $12,57 \pm 1,98$ K/gr.protein olarak bulundu. Grup I Katalaz düzeyleri Grup II ve III'e göre anlamlı farklılık gösterirken, grup IV'le aralarında anlamlı farklılık izlenmedi ($p > 0.05$). Gruplar içerisinde yapılan istatistiksel karşılaştırmada da her bir grup arasında anlamlı farklılık saptandı ($F:30,211$, $p < 0.001$).

Kontralateral testiküler ölçümlerde de tüm gruplar arasında istatistiksel farklılıklar saptandı. Grup II'de doku katalaz düzeyleri diğer tüm gruplara oranla anlamlı azalma gösterdi ($p < 0.01$). Sağ testis Katalaz ölçümlerinde Grup III ve IV'de sırası ile $12,23 \pm 1,71$ ve $12,85 \pm 1,35$ K/gr.protein oranları saptandı (Şekil 21). Her iki grupta Katalaz açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p > 0.05$).

Diğer antioksidan ölçümlerinden farklı olarak sağ testis katalaz düzeyinde hem grup III hem de grup IV, sham grubuna yakın oranda artış gösterdiler. Melatoninin, 5 mg/kg dozunda verildiği gruplar içerisinde sadece sağ testis katalaz düzeyinde anlamlı artış sağladığı ortaya çıktı.



Şekil 21. Sağ testis doku katalaz düzeyleri

VI. TARTIŞMA

Varikosel yetişkin erkek popülasyonda % 15-20, infertilite nedeni ile araştırılan erkek hastalarda ise % 21-40 oranı ile en sık saptanan infertilite nedenidir (16,37,61). Varikosel patofizyolojisi son yıllarda pek çok çalışmada incelenmekte ve varikosel için uygun tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Varikoselde, semen parametrelerinde bozulma, testis dokusunda dejeneratif değişiklikler, spermatogenetik aktivite azlığı, germ hücre kayıpları, spermatid veya spermatozoid düzeyinde matürasyon arresti, saptanan en yaygın patolojik değişikliklerdir (14,66). Tüm bu patolojik değişiklikler testiküler hasara ya da fonksiyon kaybına neden olabileceği gibi testiküler fonksiyonda kısmi bir kayıba da yol açabilir. Bu durumda da varikoselli infertil hastalardan bir bölümü herhangi bir tedavi görmeden fertil duruma gelebilmektedirler (63). Schlesinger ve arkadaşları, varikosel tedavi sonuçlarını inceledikleri çalışmalarında, cerrahi ya da medikal tedavi uygulanan ve tedavi edilmeden takip edilen subklinik varikoseli olan olgular arasında gebelik sağlama oranları açısından anlamlı farklılık bulmamışlardır (63). Dolayısıyla, infertilitenin en sık nedeni olarak gösterilen varikoselin etyolojisi ve patofizyolojisi ile ilgili tanımlanmış olan mekanizmaların hiç biri tek başına varikoselin nedeni infertiliteye sebep olduğunu açıklayamamaktadır.

Varikoselin patogenezindeki önemli teoriler, hormonal fonksiyon bozukluğu, hipoksi, artmış veya azalmış testis kan akımı, renal ve adrenal metabolitlerin reflüsüdür. Bunlar içerisinde testiküler disfonksiyonda rol oynayan en önemli etkenin testiküler ısı artışı olduğu bildirilmiştir (71). Varikosel patofizyolojisinde etken ne olursa olsun semen parametrelerinde bozulma, spermatogenetik aktivitede

duraklama, testiküler hasar oluşumunu koordine eden farklı mekanizmalar bildirilmiştir (34,35). İntratestiküler artmış ısıya bağlı olarak Leydig hücrelerinde fonksiyonel bozulma, internal spermatik vende katekolamin düzeylerinde artma, PGE₂ ve PGF_{2-α}'nın testislere reflüsü, vazokonstrüksiyona sekonder sperm transportunda bozulma bu mekanizmalardan bir kaçıdır (14,35). Unilateral oluşturulan kriptorşidizmde ya da testisin lokal olarak ısıya maruz bırakıldığı olgularda DNA fragmantasyonunda artış meydana gelir. Ayrıca artan ısı stresinin apoptoz yolu ile germ hücre kaybına neden olabileceği de bildirilmiştir (81). Şimşek ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, testiküler ısı artışına neden olan varikoselde amorf yapıda ve immatür ya da küçük tipte hücre artışına rastlanmış ve bu tip morfolojik değişikliklerin apoptozla oluşan dejeneratif yapılara benzerlikleri ortaya konulmuştur. Dolayısıyla, kriptorşidizmde olduğu gibi varikoselde de testiküler hasar gelişiminde artmış programlı hücre ölümü yani apoptozun rolü olduğu vurgulanmıştır(70).

Apoptoz ya da programlı ve fizyolojik hücre ölümü; multisellüler organizmalarda hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin devamını sağlayan önemli bir mekanizmadır (3). Genellikle yaşlı hücrelerin programlı ölümleri, farklı stimulanlar ve stres faktörlerine bağlı olarak kontrol dışı ya da beklenen zaman dışında gerçekleşebilir (3,70). Testiküler homeostazda, germ hücre devamlılığında ve spermatogenezde bozulmaya yol açan varikoselde, ortaya çıkan ısı artışının bu dokuda apoptozu indükleyici ya da artırıcı rolü olduğu bildirilmiştir (34). Şimşek ve arkadaşları, infertilite tedavisi için varikosektomi uyguladıkları hastalarda operasyon sırasında elde ettikleri testis biyopsi incelemelerinde germ hücre apoptozunda anlamlı artış saptamışlardır (70).

In vitro koşullarda hücre költürü ile yapılan diğer bir çalışmada ise, Ikeda ve arkadaşları 32.5°C'de inkübe ettikleri testiküler hücrelerde minimal düzeyde DNA fragmantasyonu ya da apoptoz belirlerken, bu ısıyı 43°C'ye yükselttiklerinde apoptozda progressif olarak bir artış saptamış ve 3. gün sonunda %15 daha fazla apoptoz geliştiğini izlemişlerdir. Aynı çalışmada hücre canlılıkları da % 40 oranında azalma göstermiştir(34). Bu da varikoselde de izlenen testiküler ısı artışının apoptozla olan direkt ilişkisini göstermektedir. Literatürde, hipospermatogenez oluşturan çeşitli patolojilerde apoptozun genellikle var olduğu bildirilmiştir (33). Öte yandan, en sık infertilite nedeni olan varikoselde apoptozun azaldığını bildiren literatürdeki tek alışma Fujisawa ve arkadaşlarına aittir (22). Varikosel nedeni ile incelenen infertil erkeklerde germ hücrelerde apoptozda azalma olması bu çalışmada çeşitli teknik nedenlerle açıklanmıştır. Bunlar arasında, rat modellerinde DNA fragmantasyonunun tam olarak gösterilememesi ve doku fiksasyonu için formalin yerine Bouine solüsyonu kullanılması gösterilmiştir (22). Testiküler ısı artışına bağlı oluşan ve çeşitli mekanizmalarla ortaya çıkan hipospermatogenezin incelendiği pek çok çalışmada apoptozun artmış olduğu göz önüne alınacak olursa Fujisawa ve arkadaşları tarafından saptanan apoptozdaki azalmayı sadece teknik nedenlere bağlamak literatür desteğinden yoksun bir bulgu olacaktır.

Bu çalışmada, deney süresi boyunca intraperitoneal saline enjeksiyonu uygulanan sham grubu ve varikosel grubu rat testisleri incelendiğinde immünohistokimyasal olarak apoptozun varikosel grubu ratlarda anlamlı olarak arttığı saptandı. Gerek ipsilateral gerekse kontralateral testiküler incelemelerde sham grubu ratlarda apoptoz varlığında artan bir gen olan Bax saptanmazken, apoptozu karşı en önemli koruyucu mekanizmalardan biri olan Bcl-2 varlığı güçlü oranda

pozitif bulundu. Bu da normal testiküler dokuda apoptozun yoğun biçimde gerçekleşmediğini göstermektedir. Daha önceki çalışmalarda, nükleer düzeydeki incelemelerle varikoselli hastalarda DNA sentezinde bozulma saptanmıştır (10,77). Aynı şekilde diğer bir çalışmada da varikosel olgularında DNA sentezinde kritik bir enzim olan topoizomeras enziminin aktivitesinde azalma bulunmuştur (70). Tüm bu veriler dikkate alındığında varikoselin testisteki travmatik etkileri nedeni ile apoptoz, ortaya çıkması beklenen bir sonuçtur. Şimşek ve arkadaşları, varikoselli hastaların testiküler biyopsi incelemelerinde olguların üçte birinde artmış apoptoz saptamışlardır(70). Çalışmamızda, testisteki apoptoz sham grubuna göre varikoselli ratlarda %50 artmış olarak bulundu. Deneysel yolla ileri derecede varikosel oluşturulduğundan ve 1 ay gibi ratlar için uzun bir süre hasara maruz bırakıldığından bu oran daha önceki üçte bir oranından daha yüksek olarak bulunmuştur.

Çalışma grubunda incelenen deneysel sol varikosel oluşturulan ratlarda karşı testiste de apoptoz artışı varikoselin bilateral testiküler hasar oluşturması ile açıklanabilir (63,74). Varikosele bağlı testiküler ısı artışı infertilite patofizyolojisinde suçlanan en önemli nedendir (74). Bunda her iki testise olan kan akımındaki artışın yol açtığı öne sürülmüştür (63). Aynı şekilde, Turner ve Lopez de deneysel sol varikosel oluşturulan ratlarda bilateral testiküler kan akımında artış saptamışlardır (74). Ancak çeşitli hormonal ve nöral mekanizmalar sonucu kan akımında artış olmasına rağmen subfertil erkeklerde normal fertil erkeklere oranla her iki testiste anlamlı olarak küçülme oluşabilir (47). Sol spermatik ven distansiyonu sonucu oluşan sol varikoselin sağ testiküler kan akımına olan etkisi, kontralateral organların ipsilateral bir uyarana varlığında ortaya çıkan çeşitli hormonal ya da nöral mekanizmalarla açıklanabilir. Deneysel sol varikosel sonrası 30. günde sağ testiküler

hasar ve ısı artışının saptanmasına karşılık sol varikoselektomi sonrası her iki testisteki kan akımı ve ısıların normale döndüğü belirtilmiştir (74). Günümüzde en sık saptanan infertilite nedeni olmasına rağmen varikoselde hipospermatogenezin hangi temel mekanizma ile oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Aynı şekilde sol spermatik ven distansiyonu ya da reflüsü olan olgularda sağda da testiküler hasar oluşumunun nasıl gerçekleştiği de hala tam olarak ortaya konulamamıştır. Tek taraflı varikosele kontralateral bir cevap olması ve bunun sol spermatik vendeki baroreseptörlerin direk etkisi ile ya da diğer bazı nöral ve nöral olmayan yollarla gerçekleştiği yönünde çeşitli açıklayıcı teoriler öne sürülmüştür (74). Çalışmamızda da deneysel sol varikosele oluşturulan ratlarda her iki testis arasında apoptozdaki artış açısından anlamlı farklılık izlenmedi ($p>0.05$).

Hipospermatogenezde ve spermatogenetik aktivitede duraklama olan olgularda apoptotik aktivitenin arttığı ve buna bağlı olarak semen parametrelerinde bozulma olduğu bildirilmiştir (46). Lin ve arkadaşları infertil erkeklerde testiküler doku incelemelerinde artmış apoptoz belirlemiş ve artmış apoptozun direkt olarak infertilite ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır (46). Apoptozda meydana gelen artma ile germ hücrelerde programlı hücre ölümü hızlanmakta ve buna bağlı olarak da hipospermatogenez oluşmaktadır (24). Apoptozun hangi tipte germ hücrelerini daha çok etkilediğini araştıran çalışmalarda primer olarak spermatogonya, erken ve geç spermatositler ile spermatidlerde apoptozun gerçekleştiği bulunmuştur (81). Beumer ve arkadaşları radyasyona bağlı testiküler hasarın germ hücre düzeyinde incelendiği çalışmalarında spermatogonia'da orta düzeyde apoptoz saptarken, erken spermatosit, geç spermatosit ve spermatidlerde ileri derecede apoptoz belirlemişlerdir (5). Çalışmamızda, immünohistokimyasal yöntemle apoptozun bir

göstergesi olarak Bax pozitifliği incelenirken, apoptozun engellenmesinde ise artan Bcl-2 boyaması dikkate alındı. Grup I'deki ratlarda her iki testisin immünohistokimyasal germ hücre incelemelerinde spermatogonia düzeyinde Bcl-2 aktivitesi daha belirgin iken, varikozel oluşturulan grupta Bax boyama anlamlı olarak artmış bulundu ($P<0.05$). Grup II'de erken ve geç spermatositlerde ve spermatid düzeyinde Bax boyaması, Bcl-2'ye oranla artmış olarak saptandı ($p<0.05$). Sol ve sağ testiküler apoptoz karşılaştırmasında ise grup II'de sağ testiste sola oranla daha az bir etkilenme olsa da bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p: 0.352$).

Çalışmada incelenen diğer bir parametre ise varikozele bağlı gelişen apoptozla oksidan-antioksidan sistemin ilişkisi idi. Varikozele bağlı oluşan serbest oksijen radikallerindeki artış temel olarak varikozelin oluşturduğu artan ısıyla ilişkilidir (34). Tüm yaşayan organizmalarda serbest oksijen radikalleri sabit bir oranda üretilmekte ve çeşitli antioksidan defans sistemler yolu ile de bunlar temizlenmektedir. Testislerde ve sperm hücrelerinde serbest radikallerde artışın ısıya bağlı olarak arttığı ve bunun sonucunda da testiküler hasar oluşabileceği bildirilmiştir. Ayrıca, unilateral varikozelli olgularda nöral ya da nöral olmayan yollarla karşı testiste hasar oluşması ve buna bağlı infertilite gelişmesi de serbest oksijen radikallerindeki artışla açıklanmıştır. Ikeda ve arkadaşları rat testiküler hücre kültürlerinde eksojen yolla reaktif oksijen moleküllerini ortama eklemiş ve artan dozda serbest oksijen radikallerinin doza bağımlı olarak apoptotik hücre sayısında artış sağladığını saptamışlardır(34). Aynı çalışmada araştırmacılar hücre kültürlerine antioksidan sistemin aktif bileşenleri olan SOD ve Katalaz eklemiş ve serbest oksijen radikallerine bağlı oluşan apoptozu anlamlı ölçüde azaltmışlardır. Serbest oksijen radikallerinin etkilerini yok ederek apoptozu önlemede katalazın SOD'a oranla daha

etkili olduğu sonucuna varmışlardır (34). Hücre kültürlerinde ısı artışı uyguladıkları diğer bir grupta ise araştırmacılar, ısıya bağlı olarak apopitozun arttığını ve antioksidan tedavi ile apopitozda azalma olduğunu bulmuşlardır (34). Bu sonuçla, ısı artışına bağlı apopitozda oksidatif stresin varlığı temel mekanizmalardan biri olarak ortaya çıkmaktadır.

Varikoselde testiküler fonksiyonların korunmasında antioksidanların etkilerinin incelendiği diğer bir çalışmada, Suziki ve Sofitikis varikosel oluşturulan ratlara antioksidan olarak taurin, katalaz ve SOD uygulamış ve 8 hafta sonunda bilateral epididimal kaudal sperm içeriği, motilitesi ve fertilizasyon kapasitelerini incelemişlerdir(68). Varikosel oluşturulan grup ile varikosel sonrası antioksidan uygulanan gruplar arasında 8 hafta sonunda testiküler fonksiyonların korunması açısından anlamlı farklılıklar saptanmıştır(68). Bu nedenle, varikosel nedeni ile gelişen apopitozda da serbest oksijen radikallerinin etkili olabileceği ve apopitozu önlemede, dolayısıyla da testiküler fonksiyonları korumada antioksidanların etkili olabilecekleri öne sürülebilir. Çalışmamızda, deneysel varikosel oluşturulan erkek ratlarda sham grubu rat testisleri ve varikosel uygulanan gruptaki rat testisleri incelendiğinde grup I'de SOR'un bir göstergesi olan doku MDA düzeyleri $6,67 \pm 1.01$ nmol/gr.protein iken bu oran grup II'deki ratlarda ortalama 13.43 ± 2.25 nmol/gr.protein olarak bulunmuştur. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmiştir($p < 0.05$). Sol testis Grup III ve grup IV doku MDA düzeyleri ise sırası ile $9,5 \pm 1.76$ nmol/gr.protein ve $6,81 \pm 0.77$ nmol/gr.protein olup grup IV'de SOR açısından grup I'le anlamlı farklılık saptanmadı ($p < 0.05$). Grup III ve grup I arasında da doku MDA açısından anlamlı fark izlendi, ancak bu gruptaki ratlarda apopitozda anlamlı azalma görülmedi ($p > 0.05$).

Bu çalışmada her iki grup arasında incelenen diğer parametreler ise çeşitli antioksidan düzeyleri idi. Antioksidan defans sisteminin önemli bileşenleri olan SOD, katalaz ve Glutasyon peroksidaz düzeyleri sham ve varikozel grubu rat testis dokularında ayrı ayrı incelendi. Her üç antioksidan ajanın da varikozel grubu ratlarda anlamlı olarak azaldığı ortaya çıktı. Azalan antioksidan düzeylerinin izlendiği sol ve sağ testiküler dokuların immünohistokimyasal olarak incelenmesi ile bu grup ratlarda artmış oranda apoptoz saptandı. Dolayısı ile apoptozdaki artmanın antioksidan seviyelerindeki düşme ile ters ilişki içerisinde olduğu ortaya çıktı. Hüresel hasarda önemli etkiler oluşturan serbest oksijen radikalleri ile apoptoz arasındaki ilişkinin incelendiği bir başka çalışmada, serbest radikallerin apoptotik değişiklikler oluşturdukları bulunmuş ve artan glutasyon peroksidaz sayesinde bu etkinin biraz azaldığı bulunmuştur (43).

Çalışmamızda varikozele sekonder gelişen her iki testisteki germ hücre kayıplarını önlemedeki etkinliğini araştırmak için, son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir antioksidan ajan olan melatonin seçildi. Melatonin, pineal bezden köken alan endojen bir hormon olarak minimal yan etki ile pek çok organ sisteminde etki gösterir(29). Pek çok farklı çalışmada melatonin uygulaması ile toksik stimulanların oluşturduğu hüresel hasarlar önlenmiştir. Renal iskemi-reperfüzyon hasarında, testiküler torsiyondan korunmada, nefrotoksik ajanların meydana getirdiği böbrek hasarını önlemede ve intestinal sistem gibi ürogenital alan dışındaki farklı sistemlerin korunmasında da melatoninin oldukça güçlü antioksidan özelliklerinden faydalanılmıştır (29,38,44,57). Hem suda hem de yağda çözünme özelliğinde olan ve bu yolla vücutta bulunan kan-beyin, kan-testis gibi bariyerleri rahatlıkla geçtiği için çalışmamızda melatonin antioksidan ajan olarak uygulanmıştır. Melatonin hücre

kompartmanlarına rahatlıkla geçiş gösterebildiği gibi hücre nükleus düzeyinde de etkili bir hormondur (38,53). Tan ve arkadaşları, melatoninin hidroksil radikallerini temizlemede güçlü antioksidanlar olan glutatyon ve mannitolden daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (72). Melatonin, direkt olarak antioksidan özellikler gösterdiği gibi glutatyon peroksidaz enzimini de artırır(525). Doku hasarının biyokimyasal olarak incelenmesinde kullanılan ve lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin de farklı dozlarda melatonin uygulaması ile düştüğü bildirilmiştir(38). Değişen dozlarda melatonin etkinliğini araştırmak amacı ile mide iskemi-reperfüzyon modelinde melatonin 5, 10 ve 20 mg/kg dozunda uygulanmış, benzer bir çalışmada Kazez ve arkadaşları intestinal iskemi reperfüzyonda 10 ve 20 mg/kg gibi farklı dozlar kullanarak antioksidan etkinliğin belirlenmesini amaçlamışlardır (38). Çalışmamızda melatonin 5 ve 10 mg/kg dozunda ratlara intraperitoneal olarak uygulandı ve doku düzeyinde MDA ve antioksidan enzimlerden SOD, GSH-Px ve katalaz incelendi.

Çalışma grubundaki grup III ve IV'deki ratların bilateral testis dokusu incelemelerinde MDA varikosel grubuna göre anlamlı oranda azalırken, SOD, GSH-Px ve katalaz düzeyinde ise anlamlı artış belirlendi. İntestinal hasarın oluşturularak melatonin uygulanan bir çalışmada da yüksek doz melatoninin doku MDA düzeyini anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir(38). Ancak, yalnızca Grup IV'de her iki testiste doku MDA, SOD, GSH-Px ve katalaz düzeylerinin grup I'le anlamlı farklılık göstermediği saptandı ($p<0.05$). Apoptoz incelemesinde, çalışma grubundaki ratlarda yalnızca grup IV'de ve grup I arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p<0.05$). Sonuçlar, SOR'da oluşacak artışların engellenmesi ile apoptozdaki artışın da önüne geçilebileceğini göstermiştir. Çalışmamızda,

antioksidan enzimleri normale yakın oranda artıran melatonin dozu 10mg/kg olarak bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, melatoninin artan doz protokolleri ile antioksidan sistemi daha etkili kıldığını ortaya koymuştur. Bu da; literatürde belirtilen melatoninin genel özellikleri ile uyumlu bir bulgudur.

Çalışmada incelenen antioksidan enzim düzeylerinden sadece katalazın değişiminde bir farklılık belirlendi. İncelenen tüm gruplarda antioksidan düzeyleri sadece grup IV'deki ratlarda belirgin bir düşme göstermekte idi. Ancak, grup III katalaz düzeyindeki azalma grup II'e oranla istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$). Ancak artan katalaz düzeylerine rağmen grup III'deki rat testis dokusunda apoptoz engellenemedi. Genel olarak incelendiğinde, doku MDA düzeyleri ve doku antioksidan düzeylerindeki düzelme yalnızca grup IV'de yeterli olmakta ve varikosele sekonder gelişen apoptozu engelleyebilmektedir.

Erkek infertilitesinde hipospermatogeneze neden olan pek çok farklı patoloji mevcuttur. Bunlar arasında kriptorşidizm, testiküler ısı artışı ya da hipotermi ve varikosele önde gelen nedenler arasındadır (55,71). Apoptoz, normal spermatozoa gelişiminde gerekli bir mekanizma olmasına rağmen farklı testiküler patolojilerde artar (36). Bunlar arasında infertilite nedeni ile incelenen varikoselli hasta grubu da bulunmaktadır (36,70). Varikosele bağlı apoptoz gelişiminde testiküler hasar, germ hücre kaybı ve nükleer değişiklikler en sık saptanan patolojilerdir. Bu değişikliklerin oluşumunda ise son dönemlerde serbest oksijen radikallerinin rolü olduğu bildirilmiştir (34).

Bu çalışmada doku düzeyinde varikosele sekonder olarak artan serbest oksijen radikal düzeyi, antioksidan defans sistem bileşenlerin düzeyi incelenerek bunların apoptozu artırmada ya da engellemedeki olası etkileri incelendi. Çalışmanın pek çok

yerinde de belirtildiği gibi varikozel oluşturulan rat testis dokularında doku MDA artarken, doku antioksidanları olarak ölçülen SOD, GSH-Px ve katalazda anlamlı düşüşler saptandı. Antioksidan olarak melatoninin 10 mg/kg dozunda verildiği grupta ise hem ipsilateral hem de kontralateral testiküler dokuda apoptozu engellemede rolü olan Bcl-2 gen grubunda artış saptandı ve antioksidan düzeyleri de anlamlı olarak arttı. Bu çalışmada elde edilen verilerle varikozel olan olgularda apoptozun da arttığı ve bunun serbest oksijen radikalleri yolu ile gerçekleştiği sonucuna varıldı. Öte yandan güçlü bir antioksidan ajan olan melatonin uygulaması ile de varikozelli olgularda her iki testiste de korunma sağlandığı, apoptozun engellendiği ve spermatogenetik aktivitede belirgin azalmanın önüne geçildiği görüldü.

Sonuç olarak, varikozele sekonder gelişen apoptozda hipospermatogenezden kaçınmak için uygulanan melatoninin artan dozlarda bilateral testiküler doku düzeyinde etkili olduğu ve bu uygulamanın apoptozu engelleyerek varikozel patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasında ve uygun tedavi modelleri geliştirilmesinde yararlı olacağı sonucuna varıldı.

VII. KAYNAKLAR

1. Ahlberg NE, Bartley O, Chiedekel N. (1965). Retrograde contrast filling of the left gonadal vein. *Acta Radiol Diag.* 3: 385-389.
2. Ahlberg NE, Bartley O. (1966). Right and left gonadal veins: Anatomical and statistical study. *Acta Radiol Diag.* 4: 593-601.
3. Ayaşlıoğlu E. (2001). Apoptoz. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi.* 21: 57-62.
4. Beck EM, Schlegel PN, Goldstein M. (1992). Intraoperative varicocele anatomy: A macroscopic and microscopic study. *J Urol.* 148: 1190-1195.
5. Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW, Tycho KB., Kal HB, Rooij DG (2000). Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development.* 56: 353-359.
6. Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. (1998). Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl.* 19: 487-497.
7. Buttke TM, Sandstrom PA. (1994). Oxidative stress as mediator of apoptosis. *Immunol Today.* 15: 7-10.
8. Carson A, Ribeiro JM. (1993). Apoptosis and disease. *Lancet.* 341: 1251-1255.
9. Choi H, Kim K, Kim MK. (1990). The effect of experimental varicocele on the testis of adolescent rats. *J Urol.* 144: 499-501.
10. Cohen JJ. (1993). Overview: Mechanisms of apoptosis. *Immunol Today.* 14: 126-130.
11. Comhaire F, Kunnen M, Hahoum C. (1981). Radiological anatomy of the internal spermatic veins in 200 retrograde venograms. *Int J Androl.* 4: 379-383.

12. Consentino MJ, Takihara H, Cockett ATK. (1984). Regulation of rat caput epididymal contractility by prostaglandins. *J Androl.* 5: 216-219.
13. Coolsaet BL. (1980). The varicocele syndrome: Venography determining the optimal level for surgical management. *J Urol.* 124: 833-838.
14. Çayan S. (1997). Varikoselin cerrahi tedavisinde yüksek ligasyon ve mikrocerrahi yüksek inguinal varikosektomi sonuçlarının karşılaştırması. Uzmanlık tezi. İ.Ü. İstanbul Tıp Fak. Üroloji.
15. Davis JR, Firlit CF. (1986). The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril.* 17: 187-200.
16. Dubin L, Amelar D.(1978). Varicocele. *Urol Clin N Amer.* 5: 563-587.
17. Erenel G, Erbaş D, Akın A. (1992). Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Dergisi.* 3: 243-250.
18. Erkkila K, Hirvonen V, Wuokko E, Parvinen M, Dunkel L. (1998). N- Acetyl-L -Cysteine inhibits apoptosis in human male germ cells in vitro. *J Clin Endocr Metab.* 83: 2523-2535.
19. Farr AG, Nakane PK. (1981). Immunohistochemistry with enzyme labelled antibodies. *J Immunol Meth.* 47: 129-134.
20. Flohe I. (1988). Superoxide dismutase for therapeutic use: clinical experience. *Mol Cell Biochem.* 84: 123-131.
21. Freeman BA, Crapo JD. (1981). Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. *J Biol Chem.* 256: 1086-1092.
22. Fujisawa M, Hiramane C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. (1999). Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol.* 17: 296-300.

23. Furuchi T, Masuko K, Nishimune Y, Obinata M, Matsui Y. (1996). Inhibition of testicular germ cell apoptosis and differentiation in mice misexpressing Bcl-2 spermatogonia. *Development*. 122 : 1703-1709.
24. Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Giuseppe F, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 15: 4 830-4839.
25. Ghia P, Boussiotis VA, Schultze JL. (1998). Unbalanced expression of bcl-2 family proteins in follicular lymphoma: contribution of CD40 signaling. *J Biol Chem*. 273 (49): 32895-32900.
26. Goldstein M and Matthews GJ. (1996). Induction of spermatogenesis and pregnancy after microsurgical varicocelectomy in azoospermic men. *Proceedings of the American Urological Association*. 155: May. Supplement 446. 756-774.
27. Goluboff ET, Chang DT, Kirsch AJ, Fisch H. (1994). Incidence of external spermatic veins in patients undergoing inguinal varicocelectomy. *Urology*. 44: 6-12.
28. Grillo-Lopea AJ.(1979). Primary right varicocele. 105: 540-544.
29. Hara M, Yoshida M, Yokosuka M, Iigo M, Ohtani-Kaneko R, Hirata K. (2001). Melatonin, a pineal product with antioxidant properties, protects against cisplatin induced nephrotoxicity in rats. *J Pineal Res*. 30: 129-138.
30. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. (1996). Apoptotic Cell Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*. 40: 351-356.

31. Hikim S,Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. (2000). Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. 57: 136-141.
32. Hsu SM. (1981). Use of azvidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. J Histochem. 29: 577-562.
33. Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. (1996). Gonodal Cell Apoptosis. Recent Progress in Hormone Research. 51: 432-457.
34. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. (1999). Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. Biol Repr. 61:393-399.
35. Ito H, Fuse H, Minagawa H, Kawamura K, Murakami M, Shimazaki J. (1982). Internal spermatic vein prostaglandins in varicocele patients. Fertil Steril. 37: 218-221.
36. Jefferson KP, Persad RA, Holly MP. (2000). Apoptosis and Relevance to Urologists. Br J Urol. 86: 598-606.
37. Kadioğlu A, K6ksal T. (1998) Skrotum ve kapsamı hastalıkları. "Temel Üroloji" Anafarta K, Göğüş O, Arıkan N, Bedük Y. (Edit6rler). Güneş Kitabevi, Ankara. Sayfa 949-960.
38. Kazez A, Demirbağ A, Üstündağ B, Özercan İ, Sağlam M. (2000) The Role of melatonin in prevention of intestinal ishchemia reperfusion injury in rats. J Pediatric Surgery. 35: 1444-1448.

39. Kerr J, Wyllie AH, Currie AR. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26: 239-257.
40. Kerr JB. (1992). Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 95: 825-830.
41. Kılınç K. (1986). Kanserde Oksijen radikalleri ve süperoksit dismutaz. *Biyokimya Dergisi*. 3: 59-76.
42. Klaiber EL, Broverman DM, Pokoly TB. (1987). Interrelationships of smoking, testicular varicoceles and seminal fluid indexes. *Fertil Steril*. 47: 481-486.
43. Korsmeyer SJ. (1995) Regulators of cell death. *Reviews*. 11: 101-105.
44. Kvetnoy I, Sandvik AK, Waldum HL. (1997). The diffuse neuroendocrine system and extrapineal melatonin. *J Mol Endocrinol*. 18: 1-3.
45. Li H, Dubocg F, Jiang Y, Tiguert R, Gheiler LE, Dhabuwala CB. (1999). Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology*. 53: 1258-1262.
46. Lin WW, Lamb DJ, Lipshultz LI, Kim ED. (1999). Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int Urol Nephrol*. 31(3): 361-370.
47. Lipschultz LI, Corriere JN Jr. (1977). Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol*. 117: 175-180.
48. Marks JL, McHahon R, Lipshultz LI. (1986). Predictive parameters in successful varicocele repair. *J Urol*. 136: 609-612.

49. Mc Laren J, Prentice A, Chornock-Jones DS, Sharkey AM, Smith SK (1997) Immunolocalization of the apoptosis regulating proteins Bcl- 2 and Bax in human endometrium and isolated peritoneal fluid macrophages in endometriosis. *Human Reproduction* 12 : 146-152.
50. NeoMarkers: 2000. (2000). Research antibody Catalog. Mouse monoclonal antibodies. 20-21.
51. Palomo A. (1949). A radical cure of varicocele by a new technique. *J Urol.* 61: 604-607.
52. Pang SF, Dubocovich ML, Brown GM. (1993). Melatonin receptors in peripheral tissues: A new area of melatonin research. *Biol Signals.* 2: 177-180.
53. Pierrefiche G, Laborit H. (1995). Oxygen free radicals , melatonin and ageing. *Exp Gerontol* 30: 213-227.
54. Podesta ML, Gottlieb S, Medel R, Ropelato G. (1994). Hormonal parameters and testicular volume in children and adolescents with unilateral varicocele. *J Urol.* 152: 794-798.
55. Pryor JL, Howards SS. (1987). Varicocele. *Urol Clin N Amer.* 14: 499-554.
56. Rege N, Phadke A, Bhatt J. (1979). Serum gonadotropins and testosterone in infertile patients with varicocele. *Fertil Steril.* 31: 413-419.
57. Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Chen L, Saarela S. (1990). Melatonin as a free radical scavenger: Implications for aging and age-related diseases. *Annals New York Academy of Sciences.* 24: 3-10.
58. Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D, Chen L, Manchester LC, Guerrero JM. (1991). Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Endocrine review.* 12: 151-153.

59. Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassali P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J*, 24: 2262-2270.
60. Satoh K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chem Acta*. 90: 37-43.
61. Saypol DC. (1981). Varicocele. *J Androl*. 2: 61-67.
62. Scaffidi C, Kirchoff S, Krammer PH, Peter ME. (1999). Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 11: 277-285.
63. Schlesinger MH, Wilets IF, Nagler HM. (1994). Treatment outcome after varicocelectomy: a critical analysis. *Urol Clin N Amer*. 21: 517-529.
64. Shikone T, Billig H, Hsueh AJW. (1994). Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Repr*. 51: 865-872.
65. Siasak ME, Markey RW, Colburn RW, Zavadi AP, Kopin IJ. (1979). Identification of 6-hydroxymelatonin in normal urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Life Scie*, 25: 803-809.
66. Sigman M, Howards SS. (1998). Male Infertility. "Campbell's Urology". Walsch P, Retik A, Vaughan ED, Wein AJ(Editors). Seventh edition. WB Saunders Company, Philadelphia. 1, 43: 1287-1330.
67. Stokkan KA, Reiter RJ, Nonaka K, Lerchi A, Yu BP, Vaughan MK. (1991). Food restriction retards aging of pineal gland. *Brain Res*. 545: 66-72.
68. Suzuki N (1999). Protective effects of antioxidants on testicular function of varicocelectomized rats. *Yonago Acta Medica-abst*. 42: 1.
69. Swerdloff RS, Walsch PC. (1975). Pituitary and gonadal hormones in patients with varicocele. *Fertil steril*. 26: 1006-1011.

70. Şimşek F, Türkeri L, Çevik İ, Kamuran B, Akdaş A. (1998). Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. Arch Esp Urol . 51: 947-950.
71. Takihara H, Sakatoku J, Cockett ATK. (1991). The pathophysiology of varicocele in male infertility. Fertil Steril. 55: 861-868.
72. Tan DX, Chen L, Poeggler B, Manchester L, Reiter RJ. (1993). Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocr. 1: 57-60.
73. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW (1993). Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. Mol Endocrinol, 7: 643-650.
74. Turner TT, Lopez TJ. (2000). 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. 144: 1018-1021.
75. Van Parijs L, Abbas AK. (1996). Role of FAS mediated cell death in the regulation of immune responses. Curr Opin Immunol. 8: 355-361.
76. World Health Organization. (1985). Comparison among different methods for the diagnosis of varicocele. Fertil Steril. 43: 575-582.
77. Wyllie AH. (1997). Apoptosis: an overview. Br Med Bull, 53: 451-465.
78. Wyllie AH. (1998). A tidy death. Odyssey. 4: 47-52.
79. Yagi K.(1984). Assay of blood plasma or serum. Meth Enzymol. 105: 328-331.
80. Yamaguchi M, Sakatoku J, Takahara H. (1989). The application of intrascrotal deep body temperature measurement for the noninvasive diagnosis of varicoceles. Fertil Steril, 52: 295-301.

81. Yin Y, Hawkins KL, Dewolf WC, Morgantaler A. (1997). Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl.* 18: 159-165.
82. Zoragniotti A, MacLeod J. (1973). Studies in temperature, human sperm quality and varicoceles. *Fertil Steril.* 24: 854-863.



VIII. ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Elazığ'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi sırası ile Elazığ Namık Kemal İlkokulu ve Elazığ Anadolu Lisesinde tamamladım. 1988 yılında İstanbul Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım. 1994 yılında bu Fakülteyi bitirerek aynı yıl Tıp Doktoru olarak Elazığ Merkez Akçakiraz Sağlık Ocağında görev yapmaya başladım. 1997 Eylül TUS sınavında başarılı olarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim dalında uzmanlık eğitimine başladım. Evli ve 1 çocuk babasıyım.

