

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI**



**SIÇANLARDA DENEYSEL VARİKOSEL MODELİNDE
D VİTAMİNİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gökhan AĞTÜRK

Danışman

Prof. Dr. Cemil TÜMER

HATAY- 2017

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA DENEYSEL VARİKOSEL MODELİNDE
D VİTAMİNİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gökhan AĞTÜRK

Danışman

Prof. Dr. Cemil TÜMER

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 16562 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY- 2017

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca büyük bir ilgiyle bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, her zaman güler yüzlü ve içten samimi davranışları ile eğitim ve ileriki mesleki hayatım boyunca bana kattığı değerli bilgilerinden fayda sağlayacağım çok değerli Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve değerli tez danışman hocam sayın Prof. Dr. Cemil TÜMER'e

Hazırladığım tez projesine zaman ayırıp değerlendirdiği ve akademik olarak birçok bilgi ve tecrübe kattığı için ayrıca bir o kadar kibar, nazik ve hoşgörülü davranışlarından dolayı fizyoloji bölümünün kıymetli öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Enver Ahmet DEMİR'e teşekkürü borç bilirim.

Yine çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından bana sürekli yardımda bulunarak yol gösteren deney aşamalarının her bölümünde yanımda gördüğüm ve gelecekteki hayatlarında çok daha başarılı olacağına inandığım kıymetli Arş. Gör. Okan TUTUK ve Arş. Gör. Hatice DOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca deney aşamasında bilgi, tecrübe ve deneyimlerini bizimle paylaşan MKÜ Araştırma Hastahanesi Üroloji A.D Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Keremhan GÖZÜKARA'ya, MKÜ- DAM uzman veteriner hekimi sayın H. Suphi BAYRAKTAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deneysel çalışmamda yardımlarını esirgemeyen Özlem KUTLU İSHAKOĞLU'na da ayrıca teşekkür ederim.

Hayatım boyunca maddi ve manevi olarak hiç eksikliğini hissetmediğim, sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan anneme, babama, ablalarıma, yeğenlerime ve her zaman desteğini gördüğüm değerli abim Yüksek Ziraat Müh. Dr. Resul AĞTÜRK'e ve kıymetli eşi Sosyolog İlknur AĞTÜRK'e, teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	X
ÖZET	XI
ABSTRACT	XII
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis	3
2.1.1. Anatomi	3
2.1.2. Histoloji	4
2.1.3. Fizyoloji	5
2.2. Varikosel	5
2.3. Epidemiyoloji	6
2.4. Etiyoloji	7
2.4.1. Anatomik değişiklikler	7
2.4.2. Venöz kanın reflüsü ile sonuçlanan kompetan venöz valvlerin olmayışı	8
2.4.3. Nutcracker fenomeni	8
2.5. Fizyopatoloji	9
2.5.1. Testiküler Kan Akımı	9
2.5.2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi	9
2.5.3.Hipertermi	10

2.5.4. Venöz Basınc	11
2.5.5. Renal-Adrenal Reflü	12
2.5.6. Hormonal Disfonksiyon	12
2.5.7. Otoimmünite	12
2.5.8. Akrozom Reaksiyonu	13
2.5.9. Apoptozis	13
2.6. Serbest Oksijen Radikalleri(SOR)	13
2.7. Varikosel ve Serbest Oksijen Radikalleri	14
2.8. D Vitamini (D Vit.)	16
2.9. Transient Reseptör Potansiyel (TRP)	18
2.10. Varikoselde Gelişen Histolojik Değişiklikler	21
2.11. Varikosel Tanısı	21
2.12. Varikosel Tedavisi	22
2.13. Antioksidanlar	23
2.13.1.Enzimatik olan Antioksidanlar	24
2.13.1.1. Süperoksit Dismutaz	24
2.13.1.2. Katalaz	24
2.13.1.3. Glutatyon Peroksidaz (GPx)	24
2.13.1.4. Glutatyon Redüktaz	24
2.13.1.5. Glutatyon S-Transferazlar	24
2.13.2. Nonenzimatik Antioksidanlar	25
2.14. Total Oksidan Seviyesi(TOS)	25
2.15. Total Antioksidan Seviyesi (TAS)	25
2.16. Oksidatif Stres İndeksi(OSİ)	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Deney Kurgulanması	27

3.2. Deney Grupları	27
3.3. Deneysel Varikozel Modeli	28
3.4. Histopatolojik Preparatların Hazırlanışı	32
3.5. Johnsen Skorlaması (JS)	33
3.6. Biyokimyasal Analizler	33
3.7. TRPM Gen İfadelerinin Analizi	34
3.7.1. RNA İzolasyonu	34
3.7.2. cDNA Sentezi	35
3.8. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)	36
3.9. İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	38
4.1. Biyokimyasal Analizlerin Değerlendirilmesi	38
4.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi	38
4.3. Histopatolojik Analizlerin Değerlendirilmesi	40
4.4. Gen Analizlerinin Değerlendirilmesi	42
4.5. Testis Ağırlıklarının Karşılaştırılması	44
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	52
7. KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. Testis anatomik görüntüsü ve genital kanallar	3
Şekil 2.2. İnternal spermatik ven anatomisi	7
Şekil 2.3. Kolekalsiferol (D3 Vitamini) kimyasal yapısı	17
Şekil 2.4. TRPM2 kanallarının moleküler yapısı	20
Şekil 3.1. Ratlarda sol spermatik ven/renal ven birleşim anatomisi	30
Şekil 3.2. Varikozel modelinin gerçekleştirilmesi	30
Şekil 3.3. Dilatasyona uğramış sol spermatik ven	31
Şekil 3.4. Sol testis görüntüleri	31
Şekil 4.1. Gruplar arası TAS değerlerinin kıyaslanması	38
Şekil 4.2. Gruplar arası TOS değerlerinin kıyaslanması	39
Şekil 4.3. Gruplar arası OSİ değerlerinin kıyaslanması	40
Şekil 4.4. Gruplar arası histopatolojik değerlendirme	40
Şekil 4.5. Sıçan testis dokusunun histopatolojik görüntüsü	42
Şekil 4.6. Gruplar arası TRPM2 gen ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması	43
Şekil 4.7. Gruplar arası TRPM8 gen ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 3.1. Deney gruplarının oluşturulması	28
Çizelge 3.2. Rutin doku takibi	32
Çizelge 3.3. cDNA karışım içeriği	35
Çizelge 3.4. cDNA tepkime koşulları	35
Çizelge 3.5. Kullanılan primer dizileri	36
Çizelge 3.6. TRPM2, qRT-PCR reaksiyonu	36
Çizelge 3.7. TRPM8, qRT-PCR reaksiyonu	37
Çizelge 3.8. β -Actin, qRT-PCR reaksiyonu	37
Çizelge 4.1. Sağ ve sol testis ağırlıklarının karşılaştırılması	45

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
ADPR	: Adenozin difosfat Riboz
ADPR	: Adenozin difosfat Riboz
ASA	: Antisperm Antikor
BIO-RAD	: Thermal Cycler
CAT	: Katalaz
CoQ10	: Ubikinon
D Vit.	: D Vitamini
ER/SR	: Endoplazmik/Sarkoplazmik Retikulum
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: İndirgenmiş Glutasyon
GST	: Glutasyon S- Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H&E	: Hematoksilen-Eozin
JS	: Johnsen Skorlaması
LH	: Luteinizan Hormon
MDA	: Malonildialdehit
O₂⁻	: Süperoksit Radikali

O₂↑↓	: Singlet Oksijen
OH[•]	: Hidroksil Radikali
OSİ	: Oksidatif Stres İndeksi
PCR	: Revers Transkriptaz
RT-PCR	: Real-Time- Revers Transkriptaz
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
TOS	: Total Oksidan Seviyesi
TRP	: Transient Receptor Potential
TRPM	: Transient Receptor Potential Melastatin
TSH	: Tiroid Uyarıcı Hormon
USG	: Doppler Ultrasonografi
UV	: Ultraviyole
VDR	: Vitamin D Reseptörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Sıçanlarda Deneysel Varikosel Modelinde D vitamininin Etkisinin İncelenmesi

Varikosel erkek infertilitesinin en yaygın sebeplerinden biridir. Varikosel, spermatik kord içindeki pampiniform pleksus venlerinin anormal dilatasyonudur. Erişkin erkek nüfusunun yaklaşık olarak %20 'sinde görülen ve erkek infertilitesinin belirlenen en yoğun nedenlerinden birisidir. Varikoselin fizyopatolojisi üzerine D vitamininin etkisini gözlemek için histopatolojik, biyokimyasal ve gen ekspresyon analizlerini gerçekleştirdik.

Çalışmamızda 30 adet Wistar Albino tipi erişkin erkek sıçan kullanıldı. Her grupta 10 adet hayvan olacak şekilde 3 grup oluşturuldu. 1. grup sham, deney hayvanının sadece batin açılarak varikosel modeli oluşturulmadan tekrar kapatıldı. 2. grup varikosel grubu deneysel varikosel modeli oluşturuldu. 3. grup ise tedavi grubu, deneysel olarak varikosel modeli oluşturulduktan sonra 4 hafta boyunca her gün 500 I.U/kg intramusküler olarak D vitamini verildi. Çalışma sonunda histopatolojik analizler ve TRPM gen ekspresyon düzeyleri için testis örnekleri ve biyokimyasal analizler için kan örnekleri alındı.

Alınan testis dokuları histopatolojik olarak ışık mikroskobu ile testislerde meydana gelen değişiklikler belirlendi. Histopatolojik inceleme Johnsen Skorlamasına (JS) göre değerlendirildi. Varikosel grubunun, sham grubuna göre testis dokusundaki tübüllerde bir bozulma gözlemlendi. Tedavi grubunda gözlemlenen testis tübüllerinin sham grubuna yakın bir değer saptandı. Alınan kan örneklerinden elde edilen veriler ile varikosel grubunun sham ve tedavi grubuna oranla total antioksidan seviyesi (TAS) düzeyinde anlamlı bir azalma saptandı. Tedavi grubunun TAS seviyesinde bir değer artışı saptandı. Varikosel grubunun diğer gruplara göre total oksidan seviyesi (TOS) düzeyinde anlamlı düzeyde bir artış gözlemlendi. Gen ekspresyon seviyesinde varikosel grubundaki TRPM düzeylerinin anlamlı decede arttığı gözlemlenirken tedavi grubunda ise artan ekspresyon seviyesi üzerine bir etkisinin olmadığı belirlendi. D vit TRPM ailesi ile olan ilişkisi kapsamlı bir şekilde incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Varikosel, D vitamini, TRPM kanalları

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Vitamin D in Experimental Varicocele Model in Rats

One of the most common problems of male infertility is varicocele. Varicocele is abnormal dilatation of pampiniform plexus veins in the spermatic cord. It has been seen in approximately 20% of adult male population and is one of the most specified problems of male infertility. We performed histopathological, biochemical and gene expression analyzes to observe the effect in the physiopathology of vitamin D varicocele.

In this research, 30 adult male Wistar Albino rats are used. The rats are divided into 3 groups of 10 rats. The first group sham, experimental animals have been planned to be opened only in abdomen and closed before the varicocele model was formed. The second varicocele group, i.e the patient group has been planned to form experimental varicocele model. The third group, the treatment group have been planned to be given Vitamin D (D vit.) as 500 I.U/kg intramuscular per day during 4 weeks after experimental varicocele model is formed. At the end of study the testicle samples were taken for histopathological analysis, TRPM gene expressions and blood samples were taken for biochemical analysis.

Received the testis and the changes in testis have been observed histopathologically with help of a light microscope. The histopatgological examination has been evaluated according to Jhonsen Score (JS). There has been observed deterioration in tubules of testis tissue of varicocele group compared to sham group. Seminifer testicle tubules of experimental group has been determined as an approximate value to sham group. A significant decrease has been observed in the level of Total Antioxidan Status (TAS) of varicocele group compared sham and experimental groups. A significant increase in the level of Total Oxidant Status (TOS) of the varicocele group compared to the other groups was observed. While TRPM level of vaircocele group has been observed to increase significantly in gen expiression levely there hasn't been seen any decrease in expression level of experimental group. D vit. We think that the relationship with the TRPM family should be studied extensively.

Key words: Varicocele, Vitamin D, TRPM channels

1.GİRİŞ

Varikosel, skrotum içerisinde bulunan ve pampiniform pleksusu oluşturan spermatik venlerin dilatasyonu olarak tanımlanmaktadır. Erkeklerde infertilitenin oluşumuna neden olan durumlar arasında gösterilmektedir (Fretz PC ve Sandlow JI 2002). Varikosel ile ilişkili olan infertilitenin cerrahi endikasyonlarla düzeltilebilir bir durum olduğu belirtilmektedir (Noske ve ark. 1999). Varikosel, erkek erişkin popülasyonunun yaklaşık olarak %15-22'sini kapsamaktadır. İnfertilite sebebiyeti ile kliniklere başvuran kişilerin yaklaşık olarak %30-40'ında varikosel görüldüğü tespit edilmiştir (Ikeda ve ark. 1999). Varikosel sonucunda oluşan bozuk spermatogenez ile ilgili farklı teorilerden bahsedilmektedir. Yapılan bazı araştırmalar varikoselin germ hücre apoptozisine sebebiyet verdiğini ve bundan dolayı artan germ hücre apoptozunun, sperm konsantrasyonunu indirgeyerek infertilite oluşumuna sebebiyet verdiği ifade edilmiştir (Barqawi ve ark. 2004). Varikosel oluşumuna neden olan teoriler arasında testiküler kan akımı, testis-interstisyel sıvı ilişkisi, hipertermi, venöz basınç, renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu, oksidatif stres ve apoptozis gösterilmektedir (Varikosel 2004). Varikoselin fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber vasküler fizyopatolojiyi anlamak için birçok deneysel çalışmalar uygulanmıştır. Varikosel, oksidatif stres ile ilişkilendirildiğinde serbest radikallerin artması ile birlikte testislerde hasarlanma meydana savunulmaktadır (Ikeda ve ark. 1999).

D Vitamini (D Vit.) hem hayvansal hem de bitkisel kaynaklı steroid yapılı bir moleküldür. Antiinflamatuvar ve immün düzenleyici bir özelliğe sahip olduğu vurgulanmıştır (Hlavaty ve ark. 2015). D₂ vitamini (Ergokalsiferol) ve D₃ vitamini (kolekalsiferol) olarak İki formu mevcuttur. D₂ formu daha çok mayalar tarafından üretilmekte ve genellikle besinlere katılmaktadır. D₃ formu, D₂ formundan kimyasal olarak farklı bir yapıya sahiptir. D vit.'in hem D₂ hemde D₃ formu, besin açısından yüksek değere sahip gıdalarda bulunmaktadır. D₃ formunun D₂ formundan daha güçlü ve kararlı bir yapıya sahiptir (Houghton ve ark. 2006). D vit. bazı biyolojik işlevlerini Vitamin D Reseptörü (VDR) aracılığı ile yapmaktadır. VDR, insan doku ve hücrelerinde yaygın olarak bulunduğu ifade edilmektedir (Bouillon ve ark. 2008). VDR'nin genellikle kalsiyum düzenleyici dokularda, bağırsaklarda, iskelet sisteminde, paratroid bezlerinde, ovaryum, uterus, plasenta, testis gibi üreme organlarında mevcut olduğundan bahsedilmektedir (Özbey ve ark.

2012). VDR'nin varlığı yapılan çalışmalar neticesinde gözlemlenmiş ve dolayısı ile sadece kalsiyum ve fosfor metabolizmasında değil birçok dokuda da D vit. etkisinin olduğu ifade edilmiştir (Kursh 2011).

Transient Reseptor Potential (TRP) katyon kanalları, voltaja duyarlı katyon kanalı olarak tanımlanmaktadır. TRP kanalları doğrudan plazma zarlarındaki Ca^{+2} giriş kanalları gibi rol üstlendiğini ya da Ca^{+2} giriş kanallarının modülasyonu değiştiren sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarının değişiminde rol aldığı ifade edilmiştir (Mobasheri ve Barrett-Jolley 2011). TRP kanalları, TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloid), TRPA (anrin zengin protein), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPN (nompc) olarak yedi alt gruptan oluşmaktadır (Montell ve ark. 2002, Moran ve ark. 2004). TRPM alt grup üyelerinin biyofiziksel ve fizyolojik özellikleri oldukça birbirinden farklı 8 üyesinin olduğu ifade edilmiştir. TRPM1-3, TRPM6-7, TRPM4-5, TRPM2 ve 8 şeklinde 4 majör gruptan oluşmaktadır (Pan et al. 2011). TRPM grubunda benzer bir aminoasit diziliminin görüldüğü ifade edilmiştir (Nazıroğlu 2011). TRPM kanalının son grubunda yer alan TRPM2 kanalı adenosin di fosfat-riboz (ADPR) özellikle oksidatif stres ürünleriyle aktif olduğu bildirilmektedir (Özgül ve Nazıroğlu 2010). TRPM2 kanalları genelde beyin olmak üzere testis, dalak, karaciğer gibi birçok doku ve hücrelerde bulunmaktadır (Hecquet ve Malik 2009). Özellikle oksidatif stres ürünüyle aktif hale geçmesi TRPM2-8 kanalının önemini ve üzerine yapılan çalışmaları artırmıştır (Nilius ve ark. 2007).

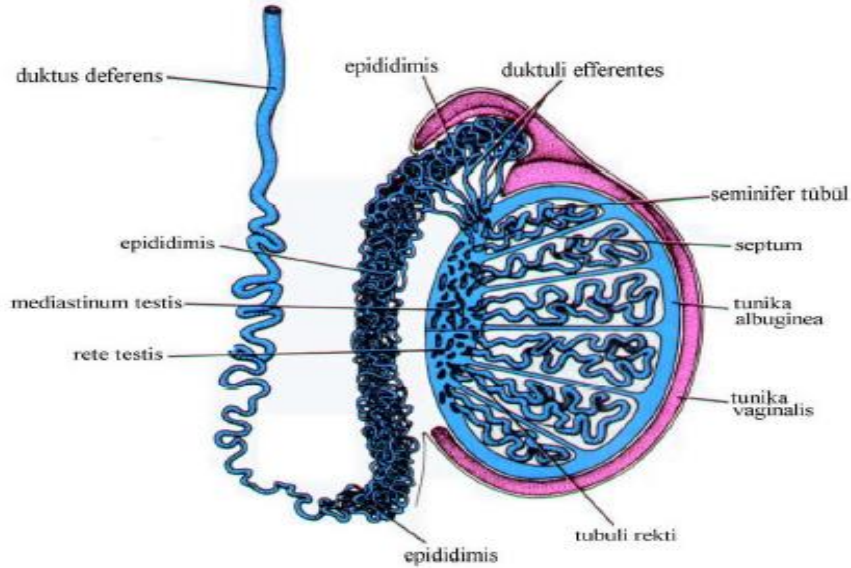
Bu bilgiler ışığında D vit.'in deneysel varikozel modelinde testislerde meydana gelen patolojik durum üzerine rolünü araştırmayı planladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. Anatomi

Testisler embriyolojik olarak abdominal kavitenin posterior duvarından köken almaktadır. Funiculus spermaticus aracılığıyla asılı duran ve birbirlerinden ayrı bir çift organdır. İki yandan basık oval bir görünümdeki testisler ortalama olarak 4,5-5 cm uzunluğunda 3-3,5 cm genişliğinde ve 2,5-2,9 cm kalınlığında bir yapıya sahiptir. Genellikle sol testis, sağ testise oranla biraz daha aşağıda olduğunu ve 10-13 gr ağırlığında bir yapıya sahip olduğu ifade edilmiştir. Tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa olarak üç fascia tabakadan oluştuğu belirtilmektedir. Tunica vaginalis testis, fascia spermatica internanın iç yüzünü ve testisin ise en dış yüzünü saran seröz bir zardır (peritoneum). Testisi örten kısma lamina visceralis (epiorchium), fascia spermatica internaya yapışan kısma ise lamina parietalis (periorchium) adı verilmektedir. Tunica vaginalis ince bir bağ dokusundan oluşmaktadır. (Shi ve ark. 2009).



Şekil 2.1. Testisin anatomik görüntüsü ve genital kanallar(neu.surgicaloncology.de)

Tunica albuginea, testisi saran açık mavimsi bir yapıya sahip kalın bir bağ dokusundan oluşmaktadır. Tunica albuginea, yapısal olarak kollajen lifler içermektedir. Yapısında düz kas lifleri bulunduran ve elastiki özelliği olmayan bir yapıdır. Lifler, arterlere eğik bir şekilde geçtiğinden dolayı kasılma ve gevşeme durumunda testisin kan dolaşımına etki yapmaktadır. (Arıncı ve Elhan 1997).

Testisin beslenmesi ile drenajı tek bir artere ve vene bağlı olmayıp, birden fazla arter ve venlerin birleşmesi sonucunda oluştuğu bildirilmektedir. Testisin kanlanmasının büyük bir çoğunluğu internal spermatic (testiküler) arter tarafından sağlanmaktadır. Spermatic artere ek olarak vazal (Deferensiyel) ve kremasterik (Eksternal) arterler kanlanmaya yardımcı olduğu ifade edilmiştir. İnternal spermatic arter anatomik olarak renal arterin hemen altında, abdominal aorta'dan çıkmakta ve spermatic venden geçerek testise ulaşmaktadır. Testisin arka tarafından her bir ven birleşerek pampiniform pleksusu meydana getirmektedir. Pampiniform pleksus ile epididim, kremasterik pleksus ve vazal ven sistemi arasında anastomozlar bulunmaktadır. Anastomozlardan dolayı testiküler ven grubunun ligasyonundan sonra testisten venöz dönüş için kollateral yolun sağlandığı bildirilmektedir (Hendry ve ark. 1973).

2.1.2. Histoloji

Gelişimsel olarak testisler periton zarının arkasından başlamakta ve testiküler kordonların uç kısımlarında asılı bir şekilde durmaktadır. Tunica vajinalis, seröz bir yapıya sahip olup mediastinum testisini oluşturan tunica albugineayı sarmaktadır. Tunica albuginea, kalın bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül şeklindedir (Shafik ve ark. 1990). Tunica albuginea ile bağlantılı olan fibröz septalar testisin derinlerine doğru giderek bezi testisküler lobüller olarak bilinen yaklaşık 250 piramidal kısma ayırmaktadır. Lobüller, gevşek bir bağ dokusuyla örtülü ve bağ dokusunda çokca kan damarları, lenf damarları ve leydig hücreleri bulunmaktadır. Seminifer tübüller spermatozoa üretiminden sorumlu olduğunu ve leydig hücrelerinin ise spermatic androjenleri salgılamaktadır (Gartner ve Hiatt 2006).

Testisteki tübüller yaklaşık olarak 250 metre uzunluğunda, başlangıçta kör uçlu ve kıvrımlı bir şekle sahiptir. Seminifer tübül epiteli, sertoli hücreleri yani destek hücreleri ile spermatogenik seri hücreleri olarak bilinen iki tip hücreden oluşmaktadır. Tübüller, tübülü rekti ismiyle kısa segmentler şeklinde devam etmektedir. Tübüller ya kör bir şekilde

sonlanmakta veya dallara ayrılmaktadır. Rete testis kanalları birleşerek, tahmini 11-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına tutunmaktadır (Ross ve Pawlina 2006).

Epididim baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölüme ayrılmaktadır. Epididim uzun bölümü olan gövde kısmı, testisin arka bölümünde bulunur ve testisin alt tarafında duktus deferense dönüşümü sağlanır. Epididimlerin asıl işlevi spermatozoaların depolanma ve hareket yeteneği kazandığı bölümdür (Gartner ve Hiatt 2006).

2.1.3. Fizyoloji

Erkek üreme işlevi hipotalamus, hipofiz ve testisler olmak üzere üç organ aracılığıyla düzenlenmektedir. Hipofiz, üreme sisteminde gerekli olan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteizan hormon (LH), adrenokortikotropik hormon (ACTH), prolaktin, büyüme hormonu ve tiroid uyarıcı hormon (TSH) salgılanmaktadır. Endokrin etmenler spermatogenezde önemli bir etkiye sahiptir ve bu etki hipofizin FSH ve LH hormonlarının spermatik hücreler üstündeki etkilerine bağlı olduğu gösterilmektedir. Testosteron salgısı, LH hormonuna bağlı ve seminifer tübül çevresinde yoğun bir şekilde bulunmaktadır. LH, ara ara belli periyotlar şeklinde salgılarını gerçekleştirdiği bildirilmektedir. Prolaktin ve LH, leydig hücreleri üzerinde doğrudan etki yaratarak testosteron salgısı üzerinde bir etkiye sahiptir. FSH, sertoli hücrelerinde etki meydana getirerek adenilat siklaz yapımını uyarmakta ve spermatogenezde esas düzenleyici görevi üstlendiği bildirilmektedir.

Yaklaşık olarak testislerin sıcaklığı 35°C olduğu bildirilmektedir. Belirtilen sıcaklık spermatogenez için önemli olup regülasyon birkaç mekanizma ile kontrolü sağlanmaktadır. Pampiniform pleksus testiküler arterin etrafını sarmakta ve sıcaklığın devamlılığı için önemli olan zıt akımı sağladığı bildirilmektedir. Testislerin sahip olduğu sıcaklığın altına düştüğü durumlarda, spermatik kordondaki eksternal kasının ve skrotum kesesinin dartos kası kasılıp ve bu kasılmadan dolayı sıcaklığı artırmak için testisleri karın boşluğuna çekerek ısı düzenlemesini ayarlayan bir mekanizma olarak gösterilmektedir (Friberg 1984).

2.2. Varikosel

Varikosel, skrotum içerisinde bulunan ve pampiniform pleksusu oluşturan spermatik venlerin dilatasyonu olarak tanımlanmaktadır. Erkeklerde infertilitenin oluşumuna neden olan durumlar arasında gösterilmektedir. Varikosel ile ilgili birçok teori olmasına rağmen fizyopatolojisi tam anlamıyla aydınlatılamamış bir durum olarak belirtilmektedir

(Noske ve Weidner 1999). Adolesan yaşlarda görülen erkek infertilitesinde rastlanan sebepleri arasında sayılmakta ve erkek infertilitesinin cerrahi olarak düzeltililebilen bir durum olarak belirtilmektedir. (Nieschlag ve ark. 1995).

2.3. Epidemiyoloji

Varikosel, ilk olarak 1843'de Curling tarafından pampiniform pleksus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu tanımlanmaktadır (Arian ve ark. 2009). Varikosel, erkek erişkin popülasyonun %15-22'sini etkileyen patolojik bir durum olarak gösterilmektedir. İnfertilite nedeniyle kliniklere başvuranların yaklaşık olarak %30-40'ında varikosel görüldüğü ifade edilmiştir. İnfertil erkeklerde anormal semen analizi değerlendirilmesinde yaklaşık olarak %25'inde varikosel tespit edilmiştir (Nieschlag ve ark. 1995).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) tarafından değerlendirilen kayıtlarda, anormal semen parametrelere sahip olan erkeklerde %25.4, normal semen parametrelere sahip erkeklerde ise yaklaşık olarak %11,7'sinde varikosel görüldüğü bildirilmektedir (Who 1992). Sekonder infertilite sebebiyle başvuru olan olgularda, varikoselin görülme sıklığı yaklaşık olarak %69-81 oranına ulaştığı ifade edilmektedir (Gorelick ve Goldstein 1993, Witt ve Lipshultz 1993, Sybol ve ark 1981). Bunu takiben, varikosel bulunan olguların %80'inde infertilitenin oluştuğu bildirilmektedir (Oster 1973).

Varikosel yaygınlığının 10-14 yaş gruplarının arasında arttığını ortaya koyan çalışmalar bulunmakla birlikte, Akbay ve ark. 2-19 yaş arası 4052 çocuk üzerinde gerçekleştirdikleri prevalans çalışmasında, hastalığın erken yaşlarda da ortaya çıkacağını göstermektedir (Akbay ve ark. 2000). Akbay ve ark. yaptığı çalışmaya göre; 2-6 yaş arasındaki çocuklarda % 0.79, 7-10 yaşları arasındaki çocuklarda ise % 0.96, 11-14 yaşları arasındakilerde ise % 7.8, 15-19 yaşları arasında % 14.1 oranında varikosel tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre varikoselin 2-10 yaş grupları arasındaki prevalan % 0.92 iken, 11-19 yaş grup arasındaki prevalan % 11 düzeyinde olduğu belirtilmiştir (Akbay ve ak. 2000). Erkeklerin birinci derece yakın akrabalıklarında varikosel görülme sıklığı yaklaşık olarak % 53 gibi gösterilirken, ırklara göre sıklık farkı belirtilmemiştir (Lipshultz ve Corriere 1977). Varikosel, sol tarafta %80-90 oranında iken %1-7 olarak sağ tarafta ve %2-20 oranında bilateral olarak görüldüğü ifade edilmiştir (Basaklar 2006). Sağ tarafta görülen varikosel situs inversus veya sağ internal spermatic venin kompresyonuna veya

obstrüksiyonuna bağlı olarak geliştiği bildirilmektedir (Kass Ej ve Belman AB. 1997). Sol tarafta varikoselin sık görülmesinde çeşitli anatomik faktörler rol oynadığı ifade edilmiştir.

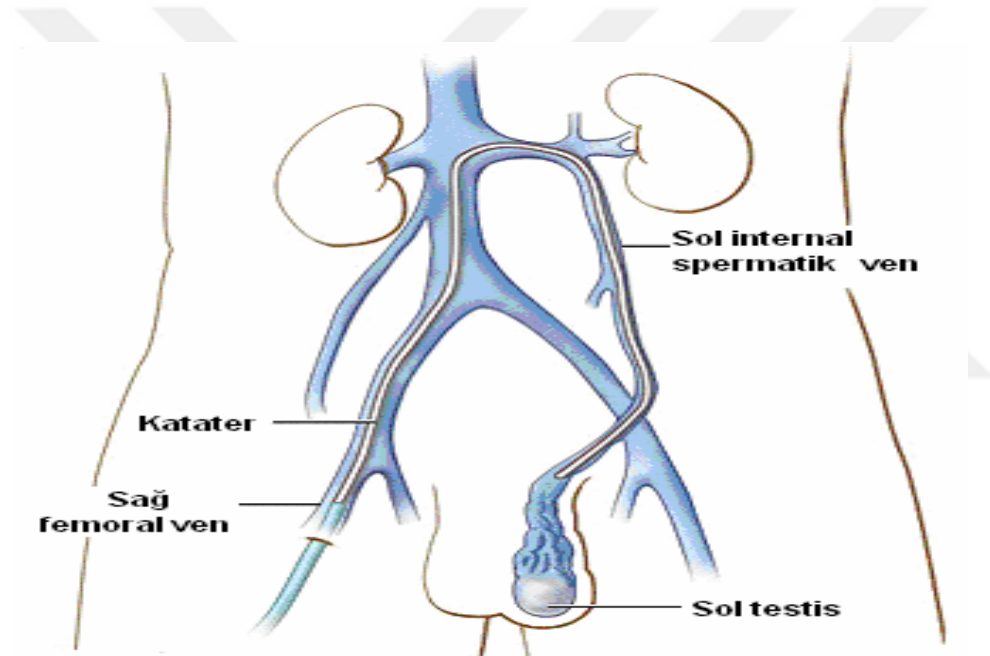
2.4. Etiyoloji

Varikosel etiyolojisinin karmaşık ve tartışmalı olmasına rağmen günümüzde kabul gören teorileri bulunmaktadır (Naughton ve ark. 2001).

Anatomik değişkenlikler

Doğumsal ve/veya edinsel valv disfonksiyonuna ikincil gelişen venöz reflü

Venöz obstrüksiyon gibi teoriler ileri sürülmektedir.



şekil 2.2. İnternal spermatic ven anatomisi (2001, John Yesko.)

2.4.1. Anatomik değişiklikler

Sol internal spermatic ven sol renal vene dik bir açıyla drene olurken sağda dar bir aı ile vena kava inferiora drene olmaktadır. Genelde internal spermatic ven, solda sağa oranla 8-10 cm daha uzun olduğu bildirilmektedir. Anatomideki bu farklılıklar, sol tarafta hidrostatik basınç artışına sebep olmakta ve sonuç olarak pampiniform pleksusa iletilen basınç venlerde dilatasyona ve tortuoziteye neden olduğu bildirilmektedir (Grillo 1979).

2.4.2. Venöz kanın reflüsü ile sonuçlanan kompetan venöz valvlerin olmayışı

Varikoselli erkeklerde yapılan anatomik diseksiyon çalışmalarında, sol renal ven ve internal spermatic ven birleşim düzeyinde valv bulunmamaktadır (Kohler 1967). Ayrıca, retrograd venografik çalışmalarla valvlerin bulunmadığı ya da yetersiz olduğu belirtilmektedir. (Ahlberg ve ark. 1966, Comhaire ve ark. 1981). Yapılan bir çalışmada, varikoseli olan 659 erkeğin venografik paternleri incelendiğinde % 73'ünde venöz valvlerin olmayışı saptanmıştır (Braedel ve ark. 1994). Yeterli valv sistemine sahip olan hastalarda, % 26.2 oranında varikosel görüldüğü tespit edilmiştir. Bazılarına göre valvlerin eksikliği varikoselin gelişmesine katkı sağladığı ifade edilmiştir, ancak altta yatan gerçek bir neden olarak gösterilmemektedir (Shafik ve ark. 1990).

2.4.3. Nutcracker fenomeni

Sol gonadal venöz sistemde hidrostatik basınç artışına neden olan mekanizma olarak tanımlanmaktadır. Nutcracker diğer bir ifadeyle findıkkıran fenomeni olarak da adlandırılmaktadır. Sol renal venin, aorta ile superior mezenterik arter arasında baskı sonucunda sol testiküler venede kısmi obstrüksiyon ve staz meydana gelmektedir. Bu duruma 'Nutcracker fenomeni' olarak adlandırılmaktadır.

İki tipe ayrılır.

- 1) Klasik tip (proksimal tip): Aortun anteriorunda ve superior mezenterik arterin posteriorunda seyreden sol renal venin kompresyona uğraması şeklinde gösterilmektedir (insidans:% 0.7).
- 2) Distal tip: Sol ana iliak arterin sol iliak vene kompresyonu ile meydana gelmektedir (insidans: % 0.5) (Braedel ve ark. 1994). Varikosel gelişiminde embriyonik faktörlerin rol oynadığı da ifade edilmektedir. Embriyonik gelişim sırasında sol taraftaki vasküler yapılar sağ taraftakilere oranla daha elastiki dokuya sahip olduğu gösterilip, sağ ve sol drene olmasındaki bu anatomik farklılık, sol tarafın, sağ tarafa oranla daha zayıf drene olmasına ve embriyogenez sırasında kollateral venlerin açık kalmasına neden olduğu ve yüksek oranda venöz anomaliye sebep olduğu belirtilmektedir (Wishahi 1991). Situs inversusta varikoselin sadece sağda görülmesi embriyolojik olayı desteklemektedir (.Hargreave 1995).

2.5. Fizyopatoloji

Varikoselin insanlarda gelişen ve zamanla artarak testis üzerinde hasara yol açmaktadır (Salama ve ark. 2003). Testiküler kan akımı, testis-interstisyel sıvı ilişkisi, hipertermi, venöz basınç renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu, oksidatif stres ve apopitoz varikozel fizyopatolojisinde olumsuz etkilerine neden olan teoriler arasında gösterilmektedir(Sigman ve Howards 1997).

2.5.1. Testiküler Kan Akımı

Varikozel, fizyopatolojisini aydınlatmak için pek çok çalışmalar bulunmaktadır. Vasküler kan akımı ve internal spermatik ısı artışından dolayı fosforilaz aktivitesi ve metabolizmasındaki artışa neden olan durumdur. (Francis ve Mark 1998). Teoriyi aydınlatmak amacıyla yapılan deneysel çalışmalar bulunmaktadır. Turner ve ark. (1993) tek taraflı varikozel varlığında her iki testiste kan akımı artışını göstermektedir, Green ve ark. (1984) yaptıkları çalışmada, erişkin ratlarda aynı bulguları saptayan ve varikozektomiye izleyen kısa ve uzun dönemlerde kan akımının normale döndüğünü göstermektedir Tek taraflı patolojinin, niçin iki taraflı etki yaptığı tam olarak bilinmemesine rağmen, nöral ya da hormonal faktörlerin rol oynadığı ifade edilmektedir. Ancak, Hurt ve ark. (1986) yaptıkları çalışmada, sol varikozel varlığında sol testisin çıkarılmasına rağmen sağdaki kan akımının halen yüksek olmasının, hormonal sinyallerle açıklanamayacağını ifade etmektedir.

Yukarıdaki verilere karşıt olarak, Li ve ark. (1999) yaptığı çalışmada, sol renal venin parsiyel ligasyonu ile oluşturdukları deneysel varikozel modelinde kan akımının azaldığı gösterilmektedir. Elde edilen farklı sonuçların, oluşturulan modelin süresine bağlı farklılıkların neden olduğu düşünülmektedir.. (Grasso ve ark. 1997).

2.5.2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi

Testiküler interstisyel sıvı spermatik hücreler, dolaşımdaki hormonal etkileşimi ve hücreler arasındaki işleyişi düzenlediği ifade edilmektedir. Varikozele bağlı olarak gelişen internal spermatik vende artan hidrostatik basınç, testiküler kapiller ve vasküler geçirgenlikte meydana gelen değişikliklerden dolayı testiküler interstisyel sıvı oluşumu esnasında değişikliğin meydana geldiği bildirilmektedir (Sharpe 1984). Yapılan deneysel bir çalışmada, oluşturulan varikozel modeli oluşumundan 30 gün sonrasında testis

içerisinde oluşan interstisyel sıvı oluşumunda bir artış olduğu gösterilmiştir (Turner ve Miller 1996).

Seminifer tübül ve interstisyel dokudaki hücreleri kuşatan bu sıvı, testis ve testis vaskülaritesi ile bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Testiküler interstisyel sıvının meydana gelmesini kontrol eden faktörler ve ortaya çıkan değişiklikler, testis işlevinde önemli bir görev aldığı ifade edilmektedir. Gösterilen faktörler arasında, testis kapillerlerinin vasküler geçirgenliği olabileceği bildirilmektedir (Kerdirci ve Miroğlu 2004).

Salama ve ark. (2003) yaptığı çalışmada, varikosel oluşturulan ratlarda kontrol grubuna oranla anlamlı oranda fazla polimorfo nükleer hücre birikiminin olduğu belirtmişler. Birikimin sol tarafta, sağa oranla daha fazla oranda meydana geldiği bildirmişler. Venöz hidrostatik basınç artışı ile meydana gelen vasküler geçirgenliğe ikincil ödeme bağlı olarak meydana geldiği ifade edilmiştir.

2.5.3. Hipertermi

Varikosele ikincil olarak gelişen testiküler işlev değişikliğinde kabul görmüş en yaygın mekanizmalar arasında gösterilmektedir. Skrotal sıcaklığı 2 termoregülatör sistem düzenlemektedir:

1- Skrotumun kendisi: İnce subkutan yağ dokusu bu bölgede bulunmadığından, dartos kası tarafından kontrol edilen yüzey alanı değişken olarak kaldığı gösterilmektedir.

2- Countercurrent (zıt akım) ısı sistemi: İlk olarak 1959'da tanımı yapılmıştır (Dahl ve Hendrick 1959). Skrotum içerisinde bulunan pampiniform pleksusu oluşturan, arteriyel ve venöz kan arasındaki zıt akımının ısı değişimini sağladığı bildirilmektedir. Testise girecek olan arteriyel kan soğutulmakta ve testisin düşük ısıyı sağlanmaktadır. Testis içerisine giren spermatik arter kan ısısının, testisten çıkan ve pampiniform pleksusu meydana getiren venöz kan tarafından soğutulduğu gösterilmiştir. (Mieusset ve Bujan 1995). Varikoselin bu mekanizmayı hasara uğrattığı düşünülmektedir. Varikosel ve intratestiküler arasındaki artan ısı ilişkisi ilk olarak 1971'de gösterilmiş ve tek taraflı lezyonun çift taraflı etki meydana getirdiği bildirilmektedir (Zorgniotli ve Macleond 1973). Dijital taşınabilir küçük bir veri kaydedici aracılığıyla skrotal sıcaklığın 24 saat aralıksız kaydettiği bir çalışmada, varikoselli infertil erkeklerin skrotal sıcaklığın fertillere kıyaslandığında çok az bir oranla yüksek olduğu ileri sürülmüştür (Sigman ve Howards 1997). Alınan bu verilere karşıt olarak, varikoseli olan ve olmayan infertil erkeklerde, skrotal sıcaklığın arasında fark

olmadığını gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (Lund ve Nielsen 1997). Artan intratestiküler ısının spermatogenezi tam olarak nasıl hangi mekanizma ile bozduğu tam anlamıyla ifade edilememiştir. Seminifer túbül ve/veya leydig hücre düzeyinde nükleer DNA ve RNA bağlayıcı proteinlerde doğrudan termal hasar sonucu spermatogenez üzerine bir etkisi olduğu düşünölmektedir (Fujisawa ve ark. 1989). Sertoli ve leydig hücreler salınmadığına göre hücrelerde gerçekleşen salınımın kısa bir süre içerisinde fonksiyonunun bozulmadığı düşünölmektedir (Nishiyama ve ark. 1998). Olası başka bir diğer mekanizma, polimeraz DNA aktivitesinin azalması olarak gösterilmektedir. Varikosel ve skrotal hipertermi arasındaki ilişki doğrudan tartışma varmış gibi söylene de hem insan modelleri hem de hayvan modellerinde oluşturulan varikosel varlığında intratestiküler sıcaklığın arttığı açık bir şekilde gösterilmektedir. Bunu destekleyen en önemli bulgu, varikoselin tamirati sonrasında intratestiküler sıcaklığın tekrar normal hale gelmesi şeklinde ifade edilmektedir (Kendirci ve Miroğlu 2004).

2.5.4. Venöz Basınç

Varikosel ve venöz basınç arasındaki değişiklikler ve ilişkisi uzun bir zamandır araştırılmaktadır. Fizyopatolojik mekanizmasını anlamak için birçok çaba harcanmıştır. Artmış olan venöz basıncın, intratestiküler onkotik ve hidrostatik basınçlarda değişikliğe neden olabileceği düşünölmektedir. Bazı önemli hormonlar için parakrin ve taşınma ortamını değiştirdiğini ve ayrıca mikrovasküler sıvı değişimini de bozduğu ifade edilmektedir. Prekapiller vazokonstriksiyon testisin beslenmesi üzerine negatif bir etki gösterdiğinden dolayı, spermatogenezde olumsuz sonuçlar meydana getirdiği ifade edilmiştir (Hsu ve ark. 1995). 60 olgu üzerinde yapılan varikoselektomi çalışmasında, olguların % 88'inde cerrahi müdahale sonrasında venöz basıncın değerlerinde bir azalma olduğu gösterilmektedir (Shafik 1983). Ayrıca varikosel onarımı ile venöz basınçta bir azalma sağlanan olgularda, sağlanmayanlara oranla sperm motilitesinde daha fazla bir düzelme meydana geldiği ifade edilmiştir. Hamsterin testisinde subkapsüler yüzeyinde bulunan mikro damarlardaki intravasküler basınçların direk ölçümü, testiküler kapiller basıncın çok düşük olduğunu ve vasküler ağın arteryel komponenti tarafınca düzenlendiği bildirilmektedir. (Hsu ve ark. 1994).

2.5.5. Renal-Adrenal Reflü

Varikoselli kişiler yaklaşık olarak %50 'sinde sol spermatik vende retrograd akım olduğu bildirilmektedir (Coolsaet BLRA 1980). Varikoselli hastalarda böbrek, adrenal katekolaminler, prostoglandin E ve F gibi metabolitlerin yüksek konsantrasyon reflüsüne neden olmaktadır. Varikosel testiküler geri akımın olduğu venlerden alınan kandaki katekolamin düzeyi, periferik venden alınan kana göre kıyaslandığında 3 kat fazla bulunurken, kontrol grubunda 1,5 kat fazla olduğu gösterilmiştir (Comhaire ve Vermeulen 1974). Venlerde artmış olan katekolamin, ısı değişim sistemi aracılığıyla pampiniform pleksus düzeyinde testiküler arterlere geçerek arterlerdeki noradrenalin seviyesinde artış meydana getirmektedir. Ayrıca arteriyollerde oluşan vazokonstriksiyon testikuler hipoksiye katkı sağladığı düşünülmektedir (Turek ve ark. 1995).

2.5.6. Hormonal Disfonksiyon

Varikoselli infertil olgularda, serum testesteron konsantrasyonunda bir azalmanın meydana geldiği ve varikoselin leydig hücre fonksiyonu bozduğunu ve buna bağlı olarak testosteron üretimi üzerinde bir azalmaya neden olduğu iddialarına yol açmıştır (Turner ve Lopez 1990).

WHO'nun varikoselin hormon parametreler üzerine etkisinin değerlendirdiği kapsamlı bir araştırmada, varikoselli 30 yaş üzerindeki erkeklerin, 30 yaş altındaki erkeklere oranla serum serbest testesteron seviyesinde anlamlı bir şekilde düşük olduğu gösterilmiştir (WHO 1992). Varikoselli hastalardaki FSH, LH, testesteron ve östradial hormon düzeylerinin normal sınırlar içerisinde kalmaktadır (Swerdloff ve Walsh 1975).

2.5.7. Otoimmünite

Antisperm antikor (ASA) üretimi testis-kan bariyerindeki bozulma ile birlikte tetikleyici bir görevi olduğu kanısı üzerine yoğunlaşmaktadır.

Etyolojiler arasındaki; testis torsiyonu, duktal obstrüksüyon, epididimit, prostatit ve testis travmasının yanında ayrıca varikoselinde bulunduğu gösterilmektedir (Jarrow ve Sanzone 1992). Yapılan deneysel varikosel modelinde, sham ve opere olmamış deney hayvanlarına oranla varikosel oluşturulan deney hayvanlarında yüksek bir oranda ASA birikiminin olduğu gösterilmiştir. Fakat varikoselin hangi mekanizma ile testis-kan

bariyerini bozmadan nasıl ASA'ları uyardığı tam anlamıyla bilinmemektedir (Turner ve ark. 1987).

2.5.8. Akrozom Reaksiyonu

Varikozel sperm morfolojisi ve sayından ziyade sperm işlevinde bir bozukluk meydana getirmektedir (Virgil ve ark. 1994). Deneysel bir çalışmaya rastlanılmamaktadır. Varikoselli hastalarda akrozom reaksiyonunu olumsuz bir şekilde etkileyen sperm plazma proteinleri ekspresyonundaki farklılıklar, nitel ve nicel gözlemsel olarak fertilité üzerinde değişken bir etki meydana getirdiği düşünölmektedir.

2.5.9. Apoptozis

İnfertilite oluşumunda varikosele bağlı olarak birçok faktör gösterilmiş olmasına rağmen infertilite oluşumuna neden olan önemli bir patoloji olarak doku hasarlanması gösterilmektedir. Apoptozis hücrenin kendi yıkımına neden olan mekanizmayı aktif ettiği ve kendine mahsus programlı bir hücre ölümü olarak bildirilmektedir. Apoptozis varikoselli kişilerdeki rolü oligosperminin ortaya çıkmasında bir görev üstlendiği sanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada toplam germ hücrenin büyüme alanı yüzdesel olarak ifade edildiğinde normal kişilerde ortalama % 2 görülürken varikoselli olgularda ise ortalama % 14 olarak gösterilmektedir (Baccetti ve ark. 1996). Varikoselli durumlarda germ ve diğer testis hücrelerinde apoptozis bir gelişim olduğunu ve testis işlevinde bir azalmanın olduğu saptanmıştır. Varikozel ile apoptozis arasındaki ilişki ısı etkisi, androjen eksikliği ve toksik uyarı olarak gösterilmektedir (Marmar 2001).

2.6. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Varikozel ve buna bağlı olarak gelişen testiküler hasarın meydana gelmesinde SOR'ların önemi ve rolü ile ilgili birçok çalışmalar bulunmaktadır. Spermatozoanın SOR üretimi, sinyal ileti mekanizmaları, sperm hiperaktivasyonu, kapasitasyonu, akrozom reaksiyonunu kolaylaştırma ve sperm-oosit birleşmesi için önemli bir medyatör olarak görev yapan normal fizyolojik bir durum olarak gösterilmektedir (Onur ve ark. 2004). Normal sağlıklı kişilerde seminal plazma, aşırı SOR üretiminin etkisini nötralize eden antioksidanları barındırmaktadır. Ancak, patolojik durumlarda SOR üretimi antioksidan

seviyeyi aştığı durumlarda oksidatif stres oluşumuna neden olduğu belirtilmektedir (De Lamirande ve Gagnon 1993). Patolojik düzeyde SOR üretimi, defektif sperm fonksiyonunda, sperm morfolojisinde ve sperm motilitesinde bir azalmanın olduğu ifade edilmiştir. Deneysel varikozel modelinde yapılan bir çalışmada, antioksidan uygulaması ile testiküler fonksiyonlarda korunma sağlanmış ve oksidan-antioksidan mekanizmanın varikozel üzerinde etkili olabileceği belirtilmiştir (Onur ve ark. 2004). SOR oluşumunu ve bunlara karşı antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasındaki dengenin korunması gerektiği ifade edilmiştir. Eğer arasındaki denge SOR'ların lehine bozulursa, hücrede aşırı SOR birikimi sonucu stres oluşmaktadır. Oluşan durum oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır (Alkan ve ark.1997).

Reaktif oksijen türleri membran yapısında var olan fosfolipidlerde lipid peroksidasyonuna sebep olduğundan ötürü, doğrudan hücreye zarar verdiği ifade edilmiştir. Lizozom ve mitokondrileri çevreleyen zarları hasara uğratarak bunlarında parçalanmasına sebep olduğu bildirilmektedir (Erenel ve ark. 1992).

Önemli serbest oksijen radikalleri;

Süperoksit radikali (O_2^-)

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidroksil radikali (OH^-)

Singlet Oksijen (O_2)

2.7. Varikozel ve Serbest Oksijen Radikalleri

SOR'ların oluşumu ve yok etme hızı bir denge içerisinde olması gerektiğini ifade edilmiştir. Oluşan bu duruma ise, oksidatif denge olarak adlandırılmaktadır. Denge durumunda, SOR'ların organizma üzerinde genel olarak bir etkisinin olmadığı belirtilmektedir. SOR oluşumunda veya ortadan kaldırılma hızı arasında bir değişim meydana geldiği durumda dengenin bozulabileceği ifade edilmiştir. Kısaca özetlemek gerekirse oksidatif stres olarak adlandırdığımız durum serbest oksijen radikallerin meydana gelmesi ve antioksidan savunma mekanizmasının arasındaki ilişki ciddi düzensizlik gösterip ve sonuç olarak doku hasarlanmasına neden olduğu bildirilmektedir (Çavdar ve Çamsarı 1997, Burçak 2004).

Erkek üreme mekanizmasındaki artan olumsuzluklar SOR'ların dengeyi bozarak oksidatif stres meydana getirmesi patolojik olarak altta yatan sebeplerden biri olarak

gösterilmekte ve araştırmaların ilgisini bu yöne çekmektedir. Varikoselde testiküler fonksiyon bozukluklarıyla ilgili olarak oksidatif stres ile arasında bir ilişkinin olması bu durumun meydana gelmesi olayını destekler niteliğindedir. Tüm dokularda da olduğu gibi testiste de fizyolojik ve biyokimyasal reaksiyonlar meydana gelmektedir. Reaksiyonların sonucunda meydana gelen yan ürünler spermatozoaya zarar verebilir ve gelişme dönemindeki spermatogenik seri hücrelerini etkileyebileceği ifade edilmektedir (Benoff ve ark. 2005).

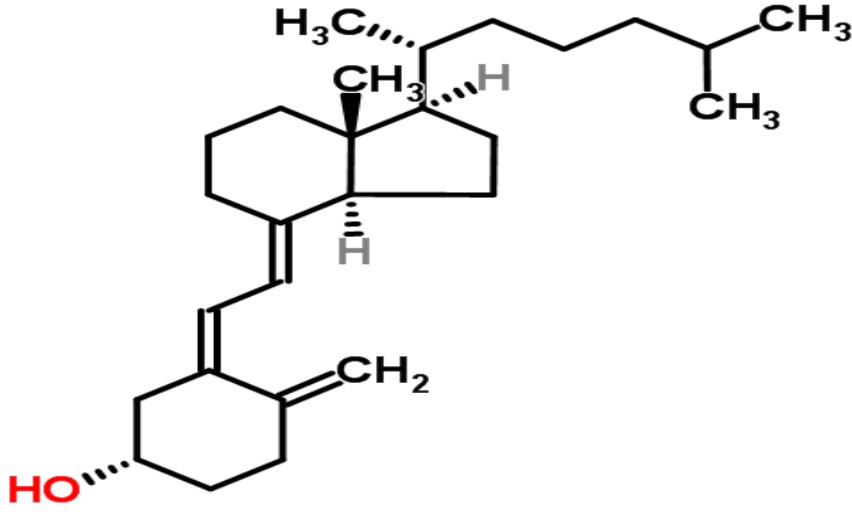
Testiste zayıf vaskülarizasyon olduğu durumlarda, dokudaki oksijen seviyesi ve miktarı düşük olduğu için rekabet oldukça şiddetli bir olaya neden olmaktadır. Testislerde, çokça doymamış yağ asitlerinin varlığından dolayı testiste oksidatif strese karşı hassas bir durum meydana getirmektedir. Gerek spermatogenezde gerek ise leydig hücrelerinde steroidogenez, oksidatif stresten dolayı zarara uğradığı bildirilmektedir (Free ve ark. 1976). Testis olumsuz durumu önlemek amacıyla; hem enzimatik hem de nonenzimatik olan antioksidanlardan oluşan sistem devreye girmektedir (Tekcan 2001). Antioksidan savunma sistemleri çokça önem arz etmekte ve peroksidatif hasar, testiküler torsiyon, diyabet ve ksenobiyotik maruziyeti gibi birçok olayda bozuk testiküler fonksiyonun tek önemli sebebiymiş gibi gösterilmektedir (Kumagai ve ark. 2002). Testis; steroidogenez ve sperm üretimini antioksidan açıdan korumaktadır. Ancak bazı endojen ve ekzojen öğeler savunma sistemini alt üst edilebileceği ve oksidan-antioksidan dengenin bozabileceği ifade edilmektedir. Bozulan dengeden dolayı oksidatif stresin oluşacağı düşünülmektedir. Spermatogenezini destekleyen testis içi mekanizmaların hasar görmesi, SOR'ların miktarında artış göstermekte ve hücre membran yapısında hasarlar oluşturacağı düşünülmektedir. Hasara uğrayanlarda ilk olarak hücre membran lipid peroksidasyonun yer aldığı ifade edilmiştir. Son orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunması serbest radikallerin ortamdaki diğer moleküllerle kolayca elektron alışverişini sağlarlar. SOR'lar membran lipid peroksidasyonunu ve membran stabilizasyonunu yok etmektedirler. Hücre membranına zarar vererek, genetik materyali tehlikeye atan ve DNA'yı kırılma ve mutasyonlara açık bir duruma getiren serbest radikaller, dengeyi bozduğunu ve oksidatif stresi indüklediği belirtilmektedir (Tekcan 2001, Çavdar ve Çamsarı 1997).

2.8. D Vitamini (D Vit.)

D vitamin 1918 yılında Mellonby ve ark. ile bebeklerde raşitizmin morino balığı karaciğer yağı ile durdurulmasını takiben, Mc Collum ve ark. yağda eriyen bu yeni birleşim ögesini D vitamini olarak adlandırmışlardır. A, K ve E yağda eriyen vitaminleri oluşturan grup içerisinde yer almaktadır (Holick, 2006a).

Çocuklarda yetersiz Ca^{+2} alımından doğan kemik gelişim hastalığı adıyla bilinen raşitizm'in tedavisi olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir (Holick, 2006a; White, 2008). D vit. hayvansal ve bitkisel kaynaklı olup fotokimyasal olarak epidermiste üretilen steroid bir molekül olduğu belirtilmektedir. D vit. kalsiyum-fosfor arasındaki dengeyi sağladığını ve kemik mineralizasyonunda aktif bir görev üstlendiği bilinmesinin yanı sıra antiinflamatuvar ve immün koruyucu özelliklerinin de olduğu belirtilmektedir (Yılmaz ve Yılmaz 2013). D vit. D_2 vitamini ve D_3 vitamini olarak iki forma sahiptir. D_2 vitamini diğer bir ifadeyle Ergokalsiferol, üretimi mayalar tarafından yapılmakta ve genellikle besinlere eklenmektedir.

D_3 vitamini yani kolekalsiferol, temel kaynağı ultraviole (UV) ışınıdır. Güneşe maruz kalma ile deride üretilmekte ve tüketim olarak hayvansal kaynaklı içeren besinler aracılığıyla tüketildiği bildirilmektedir. D vit. hem D_2 hem de D_3 formu besin açısından yüksek değere sahip gıdalar ve gıda takviyelerinde bulunmaktadır. D_3 formunun, D_2 formundan çok daha güçlü ve kararlı bir yapıda olmasının nedeni ve ayrıca güçlendirici olarak tercih edilmesine dair kanıtların bulunduğu belirtilmektedir (Houghton ve Vieth 2006).



Şekil 2.3. Kolekalsiferol (D3 Vitamini) kimyasal yapısı (Chemspider 2017).

D3 vitamini olarak adlandırılan kolekalsiferol, oksitlenme ürünü sonucunda meydana gelen 7 dehidrosikolesterolden sentezlenmektedir. İnaktif formu kolekalsiferol, ultraviyole ışınlarının deride 7- dehidrokolesterole dönüştürülmesi sonucunda sentez olayı gerçekleşmektedir. Kolekalsiferolün aktif forma dönüşmesi yani 25- dihidroksivitamin D' ye dönüşebilmesi için iki hidroksilasyon olayın gerçekleşmesi gerektiği bildirilmektedir. Öncelikle karaciğerde ki 25-hidroksilaz enzimi (CYP2R1) ile 25- hidroksilasyon dönüşümü gerçekleşmektedir. Aktif duruma geçebilmesi için böbrekteki 1-alfa-hidroksilaz enzimi (CYP27B1) aracılığı ile 1,25(OH)₂D ye yani kalsitriol dönüşümün olması gerektiği bildirilmektedir.(Posser ve Jones 2004).

D vit. genel anlamda vücutta rol aldığı mekanizmalarda, kas güçlenmesinde ve immün sistemine yardımcı olması, antiinflamatuvar bir özelliğe sahip olması, çeşitli tiplerde hücrel farklılaşma ve proliferasyonunun kontrolünde etkin rol alması, kalsiyum-fosfor homeostazisinin düzenlenmesi ve metabolizmasında rol aldığı bildirilmektedir (Faustino ve ark. 2009).

D Vit. nin bazı biyolojik işlevlerini Vitamin D Reseptörü (VDR) aracılığı ile gerçekleştirmektedir. VDR insan doku ve hücrelerinde yaygın olarak bulunduğu ifade edilmiştir (Bouillon ve ark. 2008). VDR'nin kalsiyum düzenleyici dokularda, bağırsaklarda, iskelet sisteminde, paratroid bezlerinde ve ovaryum, uterus, plasenta, testis ve hipofiz gibi üreme organlarında mevcut olduğu bildirilmektedir (Özbey ve ark. 2012). D

vit. doku üzerindeki etkisinin olması için ön şart olarak VDR' nin hedef alınan doku yada organda olması gerektiği belirtilmiştir (Aquila 2008).

Vanni ve ark. yaptıkları çalışmada, D vit. nin her iki cinsiyette üreme sisteminde pek çok fonksiyon üzerine olumlu sonuçlar olduğu gösterilmektedir (Vanni ve ark. 2014). Edinilen bilgilerle, D vit. erkek üreme sistemi üzerine nasıl bir etkiye sahip olduğu sorusunu akla getirmektedir. Çok yönlü bir sinyal molekülüne sahip olan D vit. yaptığı klasik etkilerine ilaveten erkek üreme sistemi üzerinde de bir etkiye sahiptir düşüncesini yaratmaktadır (Blomberg ve ark. 2010). D vit. enzimleri ve VDR erkek üreme sistemini döşeyen epitel hücrelerinde, spermatozoada, leydig hücrelerinde, germ hücrelerinde ve sertoli hücrelerinde bulunduğu gösterilmektedir (Aquila 2008). Testosteron, leydig hücreleri tarafından üretilmekte, birincil ve ikincil erkek üremede görevli olduğu belirtilmektedir. Testosteron konsantrasyonu; testiste serumdakine oranla yaklaşık olarak 100 kat yüksek olup ve testosteron sentezi, fetal yaşamın başlarına kadar plasenta insan koryonik gonadotropin tarafınca kontrolü sağlanmaktadır. LH, leydig hücrelerinin hücre içi kalsiyum iyonlarını (Ca^{+2}) ve siklik AMP üretimini arttırarak steroidojenezi uyarmaktadır (Costa ve ark. 2011). $1\alpha,25$ - dihidroksi vitamin D3, kalsiyuma bağımlı LH cevabını değiştirerek etkisini göstermektedir. $1\alpha,25$ -hidroksivitamin D3, insan spermatozoasında hücre içi kalsiyum konsantrasyon artışı, VDR ile uyarıldığı bildirilmektedir (Blomberg 2013).

Yapılan araştırmalar neticesinde D vit. ile ilgili yapılan birçok çalışmalar bulunmaktadır. Bilindiği üzere varikozel tedavisi cerrahi endikasyonlarla yapılmaktadır. Yapılan literatür taramalar neticesinde varikozel fizyopatolojisi üzerine D vit. ile ilgili deneysel ve klinik olarak yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamaktadır. Bilgilerden yola çıkarak oluşturduğumuz deneysel varikozel modelinde, antiinflamatuvar ve koruyucu bir etkisi olan D vit. varikozel üzerinde iyileştirici ve alternatif bir tedavi olabileceğini amaçladık.

2.9. Transient Reseptör Potansiyel (TRP)

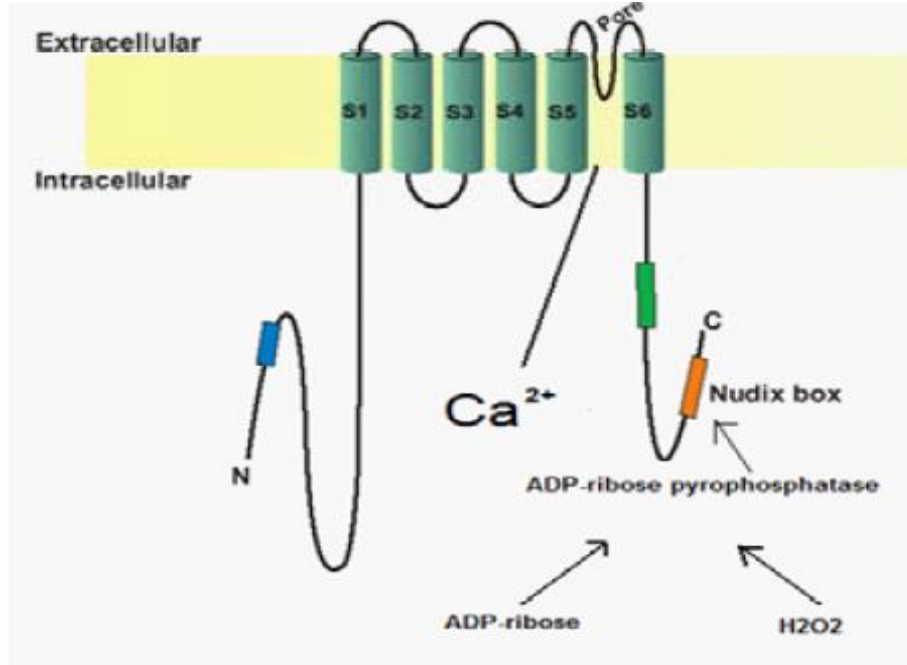
Transient Receptor Potential (TRP) kanalları ilk olarak drosophila türü olan sirke sineğinde ortaya çıktığı keşfedilmiştir. TRP gen bölgelerinde bulunan ve mutasyon taşıyan ışığa duyarlı olan fotoreseptörlerin devamlı olarak ışığa maruz kalmasıyla, aralıklı voltaj

farklılığı ortaya çıktığı bildirilmiştir (Clapham ve ark. 2001). TRP kanalları, kas kontraksiyonu, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, gen transkripsiyonu, hücre apoptozu gibi birçok temel hücresel işlevde hayati bir rol oynayan seçici olmayan katyon kanalları olarak görev yaptığı belirtilmektedir (Berridge ve Lipp 2000). TRP kanalları, TRPC (canonical), TRPM (melastatin), TRPV (vanilloid), TRPA (anykrin zengin protein), TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPN (nompc) olarak yedi alt gruptan oluşmaktadır (Montell ve ark. 2002, Moran ve ark. 2004). TRP proteinlerinin büyük bir kısmının homomultimerik bir yapıda olduğu bildirilmektedir. Sahip olunan homomultimerik yapıdan dolayı kanallar iletkenlik ve biyofiziksel bakımından farklılık gösterdiğinden bahsedilmiştir.

TRP kanalları mekanik uyarılarla karşı tepki gösteren dokunma, duyma, tat alma, görme, termal hassasiyet gibi duyuların algılanmasındaki rolü ve payı büyük bir önem arz etmektedir (Montell 2005a, 2005b, Venkatachalam and Montell 2007). Transient Reseptör Potansiyel Melastatin (TRPM) kanalları tümör baskılayıcı, oksidatif stres/ SOR ile indüklenen apoptoz, Mg^{+2} homeostazı, mekanik dokunma ozmalaritesini algılama ve non-vasküler dokulardaki termal algılama (sıcak, soğuk) işlevlerine katıldığına dair bilgiler yer almaktadır (Yang ve ark. 2006).

TRPM kanal ailesi 8 üyeden (TRPM 1-8) oluşmaktadır. TRPM katyon kanalından oluşmakta ve neredeyse her dokuda varlığına rastlanılmaktadır. Kalp ve damar sistemi dahil olmakla birlikte tüm TRPM kanalları Ca^{+2} ve Na^{+} 'a karşı geçirgen olduğu belirtilmektedir. Dolayısıyla Ca^{+2} kanalı denilmesinin yerine katyon kanalı olarak da adlandırılmaktadır (Saygın ve Nazıroğlu 2010, Miller 2006, Hucquet ve ark. 2008). TRPM alt ailesinin sekiz üyesi bulunmaktadır ve bunlar TRPM2/TRPM8, TRPM1/TRPM3, TRPM4/TRPM5, TRPM6/TRPM7 şeklinde dört majör gruptan oluşmaktadır (Nazıroglu 2007b). TRPM2 kanalı oksidatif stres ile aktif hale geçen, apoptozu sağlayan Ca^{+2} geçirgen bir kanal olarak belirtilmektedir. Oksidatif hasar oluşumunun habercisi ya da temsilcisi Adenozin di-fosfat Riboz (ADPR) ile kanalların aktive olduğu belirtilmiştir. Diğer iyon kanallarındaki gibi 6 segmentli bir geçiş bölgesi bulunmaktadır ve iyon akışı 5. ve 6. segmentler arasında oluşmaktadır. Kanal üzerinde N-terminal ve C-terminal olarak iki uç kısım yer almaktadır. Sahip olunan uç kısımlar ile kanalın geçiş bölgelerinin temel yapısını ortaya koymaktadır. TRPM2 kanalının gösterilen diğer bir önemli özelliği C-

terminal bölge üzerindeki nidux bölgesidir. Sahip olduğu bu bölge ile Na^+ , K^+ , Ca^{+2} geçirgen seçici olmayan TRPM2 kanallarının açılmasında görev üstlendiği belirtilmektedir (Clampham 2007, Nilius 2007, Saygın ve Nazıroğlu 2010).



Şekil 2.4. TRPM2 kanallarının moleküler yapısı (Nazıroğlu,2007)

Günümüzde TRPM2 kanalları, Ca^{+2} kanal inhibisyonu için kullanılan ilaçlar ile bloke olmadığı ifade edilmiştir. Oksidatif stres mekanizmasının aktif duruma gelmesini sağlayan süperoksit ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ya da SOR üretimi veya antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz olduğu durumlarla birlikte (hücre ölümüne ve hücre hasarına neden olan durumlar) aktive olduğu belirtilmektedir. Yapılan bir çalışmada H_2O_2 ile oksidatif stres oluşturulduktan sonra TRPM2 kanalının aktif hale geldiği gösterilmektedir (Heiner ve ark. 2003a, Perraud ve ark. 2003, Inamura ve ark. 2003).

TRPM8 kanallarının aktivite durumu devamlı olarak Ca^{+2} kanallarının akışı ile olduğu ifade edilmektedir. TRPM8 kanalı Ca^{+2} homeostazisinde düzenleyici ve sinir sistemi sinyalizasyonunda termal algılama ile aktive olduğu bildirilmektedir. TRPM8, soğutma ve mentol veya isilin gibi soğutma maddeleri ile aktive olduğu belirtilmektedir. TRPM8 $15\text{ }^\circ\text{C}$ ve $25\text{ }^\circ\text{C}$ aralıklarındaki sıcaklıklarda aktif bir durum gösteren ve bu durum

ile birlikte hücre içindeki Ca^{+2} seviyesinde artış meydana getirdiği bildirilmektedir (Nilius ve ark. 2007, Alexhander ve ark. 2004, Mckemy ve ark. 2002).

Dokuda oluşan hasar, var olan birçok biyokimyasal ve biyofiziksel mekanizma üzerinde etki meydana getirmektedir. Yapılan araştırmalarla birlikte oksidatif stresin mitokondri aracılığıyla ADPR üretiminde artış meydana getirmektedir. Oksidatif stres ile aktif duruma gelen kanallar dokuda hasar oluşturmaktadır. Oksidatif stresin etkili olduğu varikozel fizyopatolojisinde, TRPM2-8 kanallarının varikozel oluşumunda etkili olduğunu düşünmekteyiz.

2.10. Varikozelde Gelişen Histolojik Değişiklikler

Varikozel, testiküler dokuda histolojik olarak patognomik değişikliklerin bulunmadığı belirtilmektedir. Değişiklikler varikozel dışı etkenlerle spermatogenezin azaldığı durumlarda histolojik değişikliklere benzer durumların oluştuğu ifade edilmiştir (Wang ve ark. 1991). Genel anlamda histolojik olarak görülen değişiklikler; leydig hücre hiperplazisi, tübüldeki sertoli hücre sayısında bir azalma, spermatogenetik arrest ve germinal epiteldeki yapısal değişikliklerin görüldüğü belirtilmektedir. Seminifer tübül bazal membranında meydana gelen değişiklikler ile zamana bağlı olarak bir kalınlaşmanın olduğu gösterilmektedir (Peduch ve Skoog 2001). Varikozelli olguların spermatik venleri incelendiğinde, dilate olmuş lümenle birlikte düz kas lif sayısı, damar duvarı kalınlığının arttığı ve normalde kas tabakasında var olan sirküler tabakaya ek olarak longitudinal bir tabakanın daha oluştuğu gösterilmektedir. Varikozel düzeyi, spermatik ven duvar kalınlığı ve damar duvarındaki düz kas miktarı arasında doğrusal bir ilişkiden bahsedilmektedir (Tanji ve ark. 1999).

2.11. Varikozel Tanısı

Klinik varikozel tanısı belirlemede, hasta ayakta bekletilip iki parmak ile spermatik kord çevresindeki varikoz venlerin palpe edilerek varikozel tanısının saptandığı belirtilmiştir. Dilatasyon palpe olmadığı durumda, hastaya valsalva manevrası yaptırılır. Hasta ayakta iken uygulanan valsalva manevrası spermatik venlerin belirgin bir şekil almasını sağlamaktadır.

Genellikle düşük derece sahip varikoselli hasta teşhisinde hasta mutlaka teşhisi ayakta gerçekleştirilmelidir. Yapılan işlemlerden sonra venlerde bir dilatasyonun olup olmadığı kontrol edilebilir.

Yapılan fizik muayenelerine göre varikosel üç sınıfa ayrıldığı ifade edilmiştir (Dubin ve Ameler 1979).

1: Valsalva manevrası esnasında tespit edilebilen varikosel.

2: Valsalva manevrası yapılmadan palpasyon ile tespit edilebilen varikosel.

3: Palpasyona gerek kalmadan, uzaktan tespit edilen varikosel.

Varikosel, fizik muayene esnasında tespit edilemediği durumlarda özel test aracılığıyla tespiti yapılmaktadır. Doppler Ultrasonografi (USG) testi yapılacak olan subklinik testler arasında gösterilmektedir (Dhabuwala ve ark. 1992). Subklinik varikosel tedavisinde, seminal parametreler ve gebelik oranları üzerindeki etkisi tam olarak ispatı gerçekleşmediğinden dolayı varikoselin subklinik olarak tedavi yapılmaması gerektiği düşünülmektedir. Fizik muayenesi ile yapılan tanının yanı sıra varikoselin tanısında renkli doppler USG, radyonüklid anjiyografi, skrotal termografi, venografi de ayrıca kullanılanlar arasında gösterilmektedir (Sharlip ve ark. 2001). Varikosel teşhisinde en kıymetli yöntem olarak venografi gösterilmektedir. Yapılan bu yöntem ancak invaziv bir tetkik olduğundan dolayı rutin bir şekilde kullanılmamaktadır (Demas ve ark. 1991).

Varikosel tanısında geçerli yöntemin fizik muayenesi olduğunu ve teşhis için ayrıca bir görüntüleme yöntemine gerek olmadığı yönünde görüşler bulunmaktadır (Kadioğlu ve ark. 2004).

2.12. Varikosel Tedavisi

Varikoselin tedavisinde uygulanan en değerli ve standart yöntem açık cerrahi olarak belirtilmektedir. Varikoselde kullanılan cerrahi tedavi endikasyonları arasında gösterilenler.

- ✓ Testiküler hacim kaybı (testis hipotrofisi)
- ✓ Evre II ve III varikosel
- ✓ Anormal GnRH cevabı
- ✓ Semptomatik varikosel
- ✓ Bilateral varikosel

- ✓ Tek testis varlığı

Varikosel değişik farklı cerrahi yöntemlerle tedavi edilebilir:

- ✓ Yüksek inguinal
- ✓ Subinguinal
- ✓ Embolizan Skleroterapi.
- ✓ Perkütan embolizasyon
- ✓ Laparoskopik cerrahi yapılan uygulamalar arasında gösterilmektedir (Kadioğlu ve ark. 2004).

Tedavideki amaç, testiküler arteri, lenf damarlarını, vas deferens ve damarları koruyarak tüm internal ve eksternal spermatic ven dallarını bağlamaktır. Operasyon sonrasında testiküler venöz drenaj, vas deferensin venleri aracılığı ile meydana gelmektedir.

2.13. Antioksidanlar

Vücutta serbest oksijen radikallerinin seviyelerini kontrol altına alabilmek ve oluşturdukları hasarı engellemek amacıyla birçok savunma sistemlerinin bulunduğu ifade edilmiştir. Gelişen mekanizmalar arasında antioksidan savunma sistemi olarak bilinen bir savunma mekanizması gösterilmektedir. Savunma mekanizması oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengeyi korumak için yaşamsal bir öneme sahip olduğu düşünülmektedir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu, reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerini inhibe ederek, lipid peroksidasyonunu önlemeye çalışmaktadır. Antioksidanlar genel bir ifadeyle adlandırılırsa enzimatik ve nonenzimatik antioksidan olarak sınıflandırılmaktadır. Oluşan bu antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı yapılardan meydana gelmektedir (Mates ve ark. 1999). Enzimatik antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon S- transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz sistemlerdir. Nonenzimatik antioksidanlar; E vitamini (α -tokoferol), C vitamini (askorbat), ürat, hipotaurin, glutatyon, CoQ10 (ubikinon), melatonin, seruloplazmin enzimatik olmayan antioksidanlara verilen örnekler arasında gösterilmektedir (Akgül ve ark. 1999).

2.13.1. Enzimatik olan antioksidanlar;

2.13.1.1. Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit serbest radikalinin (O_2^{\cdot}) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü sağlayan antioksidan enzimolarak bilinmektedir (Mc Cord ve Fridovich 1969). İnsan seminal plazması prostattan sentezlenen yüksek oranda SOD aktivitesi barındırmaktadır. Genel bir ifadeyle hücrede en bol bulunan izomeri sitozolik Cu-Zn SOD olduğunu ve aktivitenin yaklaşık %75'inden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Peeker ve ark. 1997). SOD aktivitesi, oksijen kullanımı yüksek olan dokularda çokca bulunduğunu ve PO_2 artmasıyla dokuda bir artış göstermektedir. Normal metabolizma esnasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına karşın, enzim sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyleri düşük tutulduğu belirtilmektedir.

2.13.1.2. Katalaz: Genel olarak peroksizomlarda bulunmakta ve az miktarda sitozol ve mikrozomal fraksiyonda varlığı gösterilmektedir. Hidroksil serbest radikali (OH^{\cdot}) oluşumunu engellemek amacıyla hücrede oluşan H_2O_2 , katalaz aracılığıyla ortadan kaldırıldığı bildirilmektedir. H_2O_2 , su ve oksijene dönüştürülerek birikime engel olduğu belirtilmektedir (Hunt ve ark. 1998).

2.13.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPx): Normal şartlarda hücrede oluşan H_2O_2 'nin detoksifikasyonundan sorumlu selanoenzim fonksiyonu görüldüğü belirtilmektedir. GPx, H_2O_2 'i katalitik reaksiyon ile redükte etmektedir. Reaksiyon esnasında redükte glutasyon (GSH) önemli işleve sahip olduğu belirtilmektedir. Sonuç olarak okside glutasyon (GSSG) ile su oluşmaktadır. GPx, H_2O_2 için katalaz ile adeta bir yarış içerisinde ve düşük düzeyde oksidatif strese karşı önemli bir koruyucu görevi üstlendiği belirtilmektedir (Masella ve ark. 2005).

2.13.1.4. Glutasyon Redüktaz: GPx aracılığıyla hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucunda meydana gelen okside glutasyonun (GSSG), tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize olmasını sağladığı bildirilmektedir (Masella ve ark. 2005)

2.13.1.5. Glutasyon S-Transferazlar: Araşidonik asit ve lineolat hidroperoksitleri başta olmak üzere lipid peroksitlerine karşı selenyum-bağımsız GPx aktivitesini gösteren antioksidan bir savunma mekanizmasını meydana getirmektedirler (Masella ve ark. 2005).

2.13.2. Nonenzimatik Antioksidanlar

E vitamini (α -tokoferol), C vitamini (askorbat), urat, hipotaurin, glutatyon, CoQ10 (ubikinon), melatonin, seruloplazmin enzimatik olmayan antioksidanlara verilen örnekler arasında gösterilmektedir. SOR'lara karşı ilk savunma mekanizmalarını oluşturmakta ve zincir kırıcı reaksiyonlar ile serbest radikalleri uzaklaştırdığı bildirilmektedir. E vitamini (α -tokoferol) olarak bilinen antioksidan hücre zarında bulunmaktadır ve lipit peroksidasyonun zincirini kıran bir antioksidan olarak bilinmektedir. C vitamini (askorbat), radikal toplayıcı olarak görev yapmakta, E vitaminin etkisini artırmakta ve ayrıca suda erimekte olan bir antioksidan olarak bilinmektedir. Ürik asit ksantin oksidazı inhibe ederek SOR'ların meydana gelmesini engellediği bildirilmektedir (Glantzounis ve ark. 2005).

2.14.Total Oksidan Seviyesi (TOS)

SOR'ların aktif durumdaki oksijen türevleri oksidan olarak adlandırılmaktadır. Belirlediği moleküllerden elektron alma kabiliyetlerinden dolayı oksidanlar, hedef molekülün yapısını ve işlevini değişikliğe uğratarak genetik ve enzimatik olayları etkileyerek hücrelerin zarara uğrattığı bilinmektedir (Valko ve ark. 2007). Günümüzde bilinen birçok yöntemle serum veya plazmada oksidan seviyesini tek tek ölçümü yapılmaktadır. Ancak tek tek yapılan ölçümlerinin hem maliyet hem de pratiklik açısından kolaylık sağlamadığından dolayı kolaylaştırıcı bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntemle beraber tüm oksidan seviyelerini gösterecek bir metot uygulanmıştır (Erel 2005). Yapılan TOS ölçümü in vitro koşullarında gerçekleşmektedir.

2.15.Total Antioksidan Seviyesi (TAS)

Organizmalarda oluşan metabolik ve fizyolojik reaksiyonların sonucunda meydana gelen oksidatif stres ile mücadele eden bir antioksidan sistemi barındırmaktadır. Mevcut olan sistem serbest radikal olarak hücre içerisinde stres durumu oluşmaya başlarken var olan savunma mekanizma sayesinde hasarı engellediği bildirilmektedir. Antioksidan sistem endojen ve eksojen kaynaklı olabilir. İnsan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin yaklaşık olarak %85'ini albumin, ürik asit ve askorbik asit oluşturmaktadır (Vlachos ve ark. 2006).

Plazmadaki antioksidanlar birbirleriyle bir etkileşim veya bir sinerji içerisindedir. Dolayısıyla bileşenlerin, toplamsal olarak yaptığı etki, tek olarak yaptıkları etkiden çok daha fazlasını meydana getirmektedir. TAS, serumda mevcut antioksidan özelliklerine sahip enzimatik ya da enzimatik olmayan tüm antioksidan maddelerin toplam aktivitesini yansıtmaktadır ve bize daha doğru bir sonuç almamızı sağladığı bildirilmektedir. Ayrıca antioksidanların ayrı ayrı ölçümü zaman ve pahalı olduğundan dolayı yeni teknikler geliştirilmiştir. TAS ölçüm tekniği günümüzde artarak kabul görmekte ve kullanımı yaygınlaştığı ifade edilmektedir (Kusano ve Frerari 2008). Yapılan TAS ölçümü in vitro koşullarda gerçekleşmektedir.

2.16.Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Dokuda ya da hücrede meydana gelen SOR' ların seviyesindeki antioksidan kapasiteyi aşması durumu olarak ifade edilmektedir. Organizmada antioksidan ve oksidan moleküller bir denge durumundadır. Dengenin değişim durumunda, oksidatif stres oluşmaktadır (Hamidanoğlu 2011). OSİ'nin hesaplamasında, TOS değerlerinin TAS değerlerine oranının yüzde derecesi olarak bölünmesiyle elde edilmektedir.

TOS, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv. / L.

OSİ = $\frac{\text{TOS}}{\text{TAS}} \times 100$ formülü ile hesaplama yapılır.

TAS, mmol trolox Equiv. / L.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Kurgulanması

Çalışmamız Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2016/9-4 alınan kararı ile Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde (MKÜ-DAM) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızın histopatolojik ve biyokimyasal analizleri Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalındaki mevcut laboratuvarlarda gerçekleştirildi. Çalışmamızın moleküler ve genetik analizleri, Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Moleküler Genetik Anabilim Dalı'ndaki mevcut laboratuvarında yapıldı.

Çalışmamızda 300-400 gr ağırlığında Wistar Albino cinsi 30 adet sıçanı 10 adet şeklinde 3 gruba ayrılarak deney grupları oluşturuldu. Deney süresince sıçanlar devamlı olarak 12 saat gündüz ve 12 gece olmak üzere ortam sıcaklığı yaklaşık olarak 20-22 °C sıcaklıkta ve yaklaşık % 55 nemli ortama ayarlı odalarda tel kafeslerde saklandı ve sıçanların beslenmesinde ise standart rat yemi ve şebeke suyu kullanıldı. 30 gün boyunca deney aşaması gerçekleşti. 30 gün sonrasında deneklere operatif laparotomi uygulandı. Uygulama öncesinde deneklerin anestezisi 80 mg/kg ketamin ve 12 mg/kg ksilazin verilmesi şeklinde gerçekleştirildi.

3.2. Deney Grupları

1. Grup sham grubu (n:10): Batın açılarak spermatik ven etrafındaki dokulardan diseke edilerek varikozel modeli oluşturulmadan kapatıldı.
2. Grup deney grubu (n:10): Deneysel olarak varikozel modeli oluşturuldu.
3. Grup tedavi grubu (n:10): Deneysel olarak varikozel modeli oluşturulduktan sonra 4 hafta boyunca her gün 500 I.U/kg intramusküler olarak D vitamini verildi.

Çizelge3.1. Deney gruplarının oluşturulması

GRUPLAR	Denek Sayısı
Sham	10
Varikosel	10
Varikosel+ D Vitamini (Varikosel+ D vit.)	10
TOPLAM	30

3.3. Deneysel Varikosel Modeli

Cerrahi işlem öncesi deneklerin anestezisi 80 mg/kg ketamin ve 12 mg/kg ksilazin verilerek sağlanması ve gerektiğinde idame doz verildi.

Enjeksiyonundan 15 dakika sonra karın ön duvarındaki tüyler traş edilerek cerrahi alan açığa çıkarıldı ve daha sonra % 10 povidon iyodür ile alan temizliği yapıp yalnızca cerrahi alan açıkta kalacak şekilde batın steril örtülerle kapatılarak orta hattan yaklaşık 3-4 cm'lik insizyon ile laparotomi yapıldı.

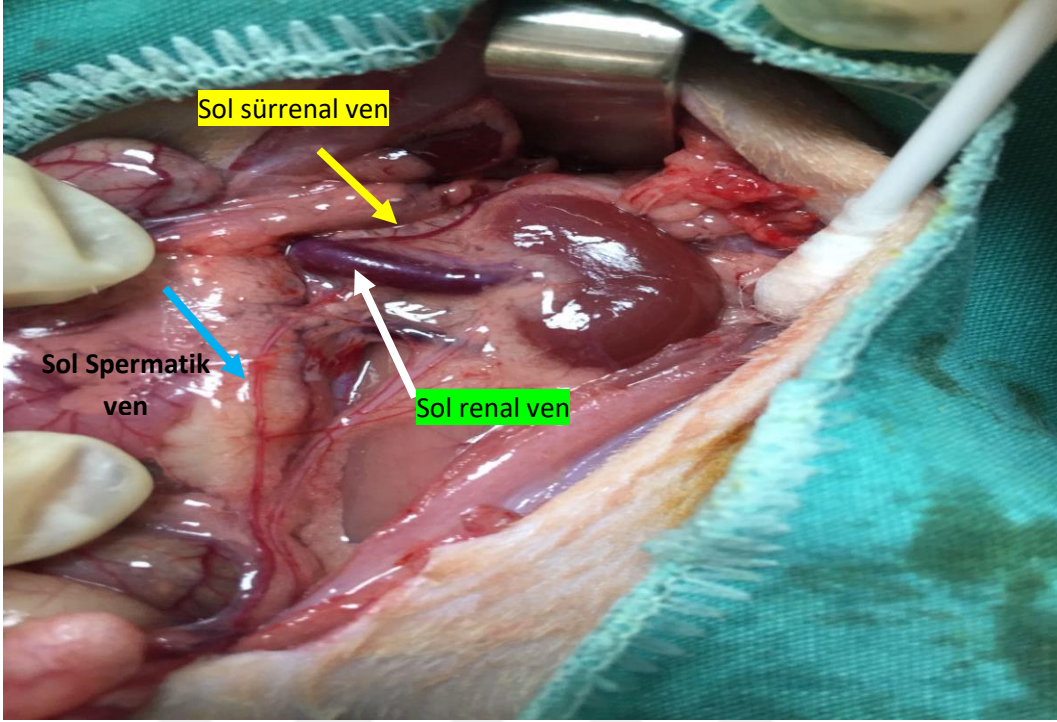
İlaç uygulamasından 15 dakika sonra karın ön duvarındaki tüyler traş edildi ve daha sonra orta hattan yaklaşık 3-4 cm lık insizyon ile laparotomi yapıldı. Organlar görünür hale geldikten sonra sham grubu dışındaki gruplarda iç organlar sağa çekilerek sol böbrek, adrenal ve renal venler ile sol spermatik venin, sol renal vene girişi görünür hale getirildi. Dikkatli bir künt diseksiyon ile spermatik ve adrenal venlerin sol renal vene girdiği medial yüz yağ ve bağ dokularından temizlenip sol renal venin arka yüzünün körleme dönülmesi sırasında oluşabilecek kanamalar bir süre yapılan basınçlı tamponlama ile durdurularak alanın kirlenmesi engellendi. Daha sonra renal ve ligasyonunun yapılacağı bölüme 4.0 ipek suture yerleştirilip 0.85 mm çaplı metal tel üzerinde daraltma işlemi gerçekleştirildi ve vendeki daraltma işleminden sonra tel çekildi. Böylece damarın dış çapının 1 mm ye düşürülmesi sağlandı. Bu daraltma işlemi darlığın lateralinde artmış damar içi basınca neden olurken, bu basıncın spermatik vene aktarılması varikosel oluşumunu gerçekleştirdi.

Bu metod ile insanda varikoselin sebeplerinden kabul edilen sol renal venin aort ve süperior mezenterik arter arasında baskıya maruz kalmasıyla oluşan 'findikkıran' fenomeni takliti olarak gerçekleştirildi. Abdominal boşluk serum fizyolojik ile yıkanarak hijyen oluşturulup, abdominal duvar ve ön abdominal kaslar 4.0 kromik katküt ile ayrı ayrı dikilerek anatomik planda kapatıldı (Arian ve ark. 2009).

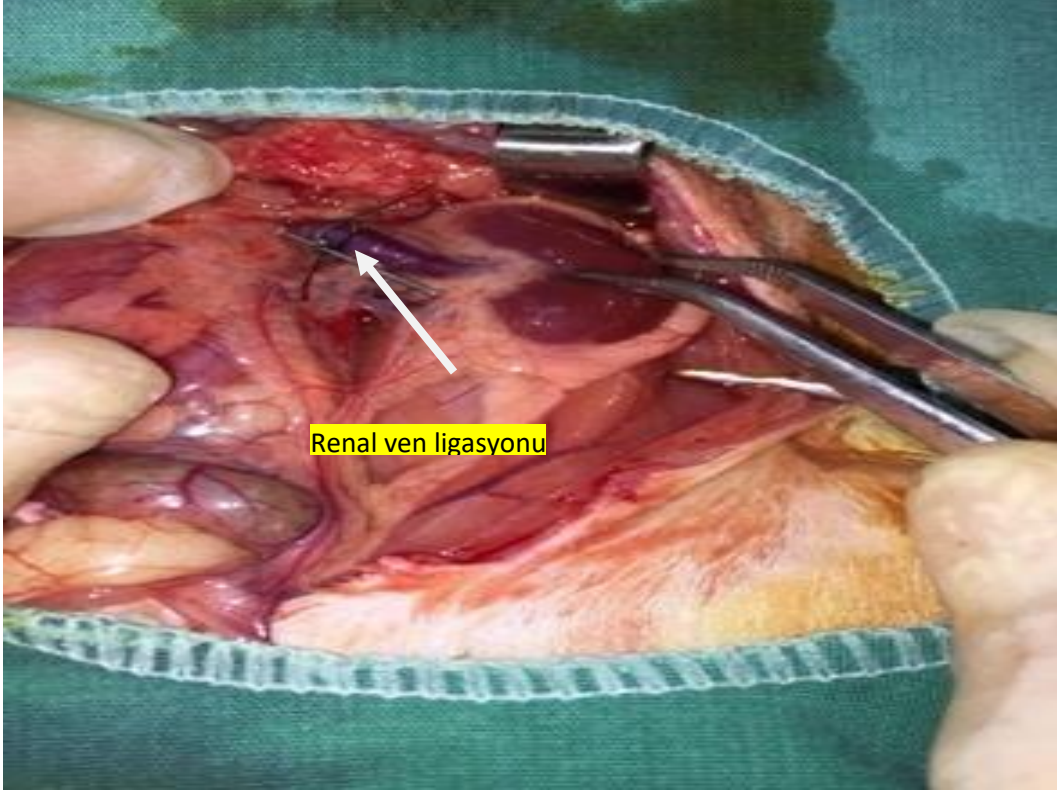
Yapılan dört hafta uygulamanın sonunda tüm ratların sakrifiye edilmesi planlandı. Ratlar, bilateral orşiektomi yapılarak testis dokuları tartılıp moleküler ve histopatolojik incelemeler lateral olarak iki eşit parçaya ayrıldı. Biyokimyasal analizler için oda sıcaklığında alınan kardiyak kan örnekleri, +4 °C de 5000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip serumlar elde edildi. Alınan dokuların yarısı histopatolojik inceleme için %10'luk formol solüsyonu içine, diğer yarısı moleküler analizleri gerçekleştirmek için çalışma yapılacağı güne kadar -80°C'de muhafaza edildi. Biyokimyasal analizler için elde edilen serum öncelikle -20°C' de saklanıp daha sonra çalışma gerçekleşeceği güne kadar -80°C muhafaza edildi. Elde edilen serum örneklerinden Total Antioksidan Seviyesi (TAS) ve Total Oksidan Seviyesi (TOS) ölçülerek oksidatif stres indeksi (OSİ) düzeylerini elde ettik.

Histopatolojik incelemeler için alınan testis doku örnekleri, inceleme sonrası Johnsen Skorlamasına (JS) dayanılarak değerlendirilmeler yapıldı.

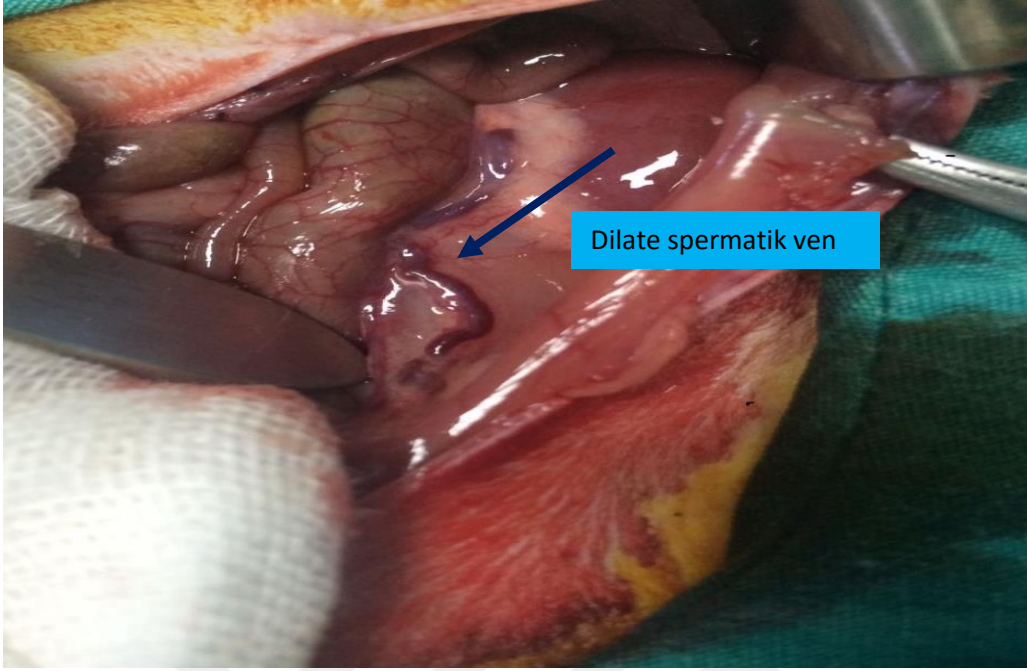
Alınan dokular ile moleküler düzeyde incelenen TRPM kanallarının analizlerini sırası ile RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR incelenmesi ile veriler elde edildi.



Şekil 3.1. Ratlarda sol spermantik ven/renal ven birleşim anatomisi.



Şekil 3.2. Varikosel modelinin gerçekleştirilmesi



Şekil 3.3. Dilatasyona uğramış sol spermatic ven



Şekil 3.4. Sol testis görüntüleri

A: Sham grubuna ait sol testis görünümü. B: Varikozel grubuna ait sol testis görünümü

3.4. Histopatolojik Preparatların Hazırlanışı

Deney gruplarından alınan 4 µm kalınlığındaki testis doku örnekleri %10'luk nötral formaldehitte 72 saat oda sıcaklığında rutin bir şekilde doku takip yöntemi gerçekleştirildi. Tespit maddesinin uzaklaştırılması için 1 gece akarsuyun altında yıkanmasının ardından 60°C de etüvde 20' şer dakika arayla %70, %80, %96 şeklinde artan etil alkol dizilerinden sırayla geçirildi ve havada kurutulmaya bırakıldı. Sonra 20' şer dakika sıra ile 60°C lik etüvde 4 defa dehidrate yapıldı. Daha sonra 30 dakika 60°C etüvde şeffaf görünüm kazanmak için xylolde bekletildi. Daha sonra 60°C de etüvde iki sıra değişim geçirerek birer saat arayla parafin ve immersiyon ile parafin bloklara gömüldü.

Çizelge 3.2. Rutin doku takibi

İşlem	Madde	Zaman
Fiksasyon	%10'luk Formaldehit	3 gün
Fiksatiften uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70' lik Alkol	20 dakika
Dehidratasyon	%80' lik Alkol	20 dakika
Dehidratasyon	%96' lik Alkol	20 dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1	20 dakika
Post Fiksasyon	Aseton 2	20 dakika
Post Fiksasyon	Aseton 3	20 dakika
Post Fiksasyon	Aseton 4	20 dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1	30 dakika
Şeffaflandırma	Xylol 2	30 dakika
	Parafirin 1	60 dakika
	Parafirin 2	60 dakika
Bloklama	Parafirin	

Bloklanan dokulardan 4 µm kalınlığında kesitler lam üzerine alındı ve lamlar deparafinizasyon işleminden sonra boya takibi işlemi başladı. Lamlardaki doku kesitleri rutin hematoksilin-eozin (H&E) ile boyama işlemi yapıldı. Boyanan lamlar lamel ile kapatıldı. Kapatıldıktan sonra hazırlanan doku örnekleri ışık mikroskopunda (Olympus CX31-Japan) incelenerek x200 lük objektifte fotoğraflama işlemi yapıldı ve JS'e göre değerlendirme yapıldı.

3.5. Johnsen Skoruması (JS)

Denek hayvanların sağ ve sol testisleri olmak üzere enine kesit alındı. 20 adet yuvarlak tübüler enine kesit, seminifer özeptelin kalitesi açısından değerlendirildi. Aşağıda ifade edildiği üzere, spermatojenik hücre tiplerinin varlığına ya da yokluğuna göre 1–10 arası skor veren Johnsen metodu kullanıldı.

Tübül kesitinde hiç hücrenin olmayışı. Sertoli hücrenin bulunması ve germ hücrenin olmayışı. Germ hücresi ise sadece spermatogonyumda bulunmayışı. Germ hücre olarak sadece spermatogonyum gözlenmesi, spermatogonyum bulunması. Randomly bir şekilde spermatositlerin bulunması ancak spermatozoa ve spermatidlerin bulunmayışı. 10'dan düşük bir şekilde spermatozoa gözlemlenir ve birçoğu olgun spermatidlerdir ve çok daha az yoğundur ve perifere yerleşmiş durumdadır. Yoğun boyamadan sonra kanca baş yapısı gözlemlenen 10dan fazla tam gelişmeyen spermatozoalar vardır ve perifer olarak yerleşmiştir. JS ile benzer özellikler bulunur fakat germinal epitelyum birkaç yerinden yarılmış olabilir ve dağınık lümen yapısı gözlenmektedir Tam olgunlaşmış spermatogenez gözlemlenir.

3.6. Biyokimyasal Analizler

Uygulamalar sonrasında biyokimyasal analiz için alınan intrakardiyak kan örnekleri biyokimya tüplere alındı. Yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4000 rpm de 10 dk süreyle +4 °C santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen serum örnekleri ependorf tüplere aktarıldı. Serum örnekleri öncelikle -20 derecede saklanıp daha sonra çalışma günü gelinceye kadar -80 derecede muhafaza edildi.

Total Oksidan Seviyesi (TOS) analizi için Erel tarafından geliştirilen spektrofotometrik bir ölçüm olan kolometrik bir yöntem uygulandı. TOS analizi değerlendirmek için TOS ticari kiti (Rel Assay Diagnostics) ve Olympus AU 400 otoanalizatör cihazında yapıldı. Total Antioksidan Seviyesi(TAS) analizi için yine spektrofotometrik olan kolometrik bir yöntem ile yapıldı. TAS ticari kiti (Rel Assay Diagnostics) ve Olympus AU 400 otoanalizatör cihazında değerler elde edildi. TAS ve TOS değerleri yüzde cinsinden kıyaslandı ve OSİ (Oksidatif Stres İndeksi) değeri hesaplandı.

3.7. TRPM Gen İfadelerinin Analizi

Çalışma sonrasında alınan örnekler çalışma gününe kadar -80 derecede saklandı. Alınan doku örneklerinde TRPM kanallarının ekspresyonlarıyla gösterilmesi için moleküler analiz işlemler yapıldı. Örneklerde mRNA ekspresyonu, RNA izolasyonu, cDNA eldesi ve Kantitatif gerçek zamanlı Revers Transkriptaz PCR ile yapıldı. PCR'dan çıkan sonuçlar birbirleri ile kıyaslanarak genin artışı ya da azalışı hakkında yorum yapmamızı sağladı.

3.7.1. RNA İzolasyonu

Varikösel deneyi sonrası sıvı azotta dondurulup -80 °C'de saklanan sıçan testis dokuları lizis solüsyonu ile parçalanıp homojenize edildi ve daha sonra Thermo Scientific Gene JET RNA Purification Kit (Katalog no: 0731) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Homojenizasyon ve RNA izolasyonu için 2 ml'lik mikro santrifüj tüpü içindeki yaklaşık 30 mg dondurulmuş testis dokusu üzerine 300 µl Lysis Buffer (içinde β-mercaptoethanol bulunan) ekleyip dokuların parçalanması (QIAGEN, TissueLyser LT, Germany) sağlandı. Lizata 600 µl seyreltilmiş Proteinaz K solüsyonu (590 µl TE tampon + 10 µl Proteinaz K) ilave edildi. Vorteks ile karıştırıldı ve 15-25 °C'de 10 dk inkübe edildi. Lizat 5 veya 10 ≥12000 g'de santrifüj edildi. Üst faz yeni bir RNase-free

mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve içine 450 µl etanol (% 96-100) eklenerek pipetle karıştırıldı.

Daha sonra bir toplama tüpüne yerleştirilmiş Gene JET RNA Purification Column'a 700 µl lizat eklendi. 1 dk, ≥ 12000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda alt faz atıldı. Örneğin geri kalanı için bir önceki adım tekrarladı. Gene JET RNA Purification Column yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi. İçine 700 µl Wash Buffer 1 (içinde etanol bulunan) eklendi. 1 dk, ≥ 12000 g'de santrifüj edildi. Alt faz atıldı. Gene JET RNA Purification Column'a 600 µl Wash Buffer 2 (içinde etanol bulunan) eklendi. 1 dk, ≥ 12000 g'de santrifüj edildi ve alt faz atıldı. Gene JET RNA Purification Column'a 250 µl Wash Buffer 2 eklendi. 2 dk, ≥ 12000 g'de santrifüj edildi ve alt faz atıldı. Gene JET RNA Purification Column yeni toplama tüpüne yerleştirildi ve filtrenin kuruması için 1 dk, max. hızda santrifüj edildi. Gene JET RNA Purification Column yeni 1,5'lik mikro santrifüj tüpe yerleştirildi. Membran üzerine 100 µl nuclease-free su eklendi. 1 dk, ≥ 1200 g'de santrifüj edildi. Elde edilen RNA'ların kalite ve miktar tayini (Thermo Scientific, Multiskan Go) yapıldı. RNA dilüsyonu gerçekleştirildi. RNA'lar -80°C ' de saklandı.

3.7.2. cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar, High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Katalog no: 0731, Applied Biosystems) ve T100, Thermal Cycler (BIO-RAD) cihazı kullanılarak reverse transkripsiyon yöntemiyle cDNA'ya dönüştürüldü. cDNA eldesi için öncelikle bir tüpte 2X RT master mix hazırlandı.

Çizelge 3.3.cDNA karışım içeriği

Karışım	Miktar
10X RT Buffer	2 µl
25X dNTP Mix (100mM)	0.8 µl
10X RT Random Primers	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Nuclease-free water	3.2 µl
Toplam	10 µl

Çizelge 3.4.cDNA tepkime koşulları

cDNA tepkimesi	Dakika
25°C	10 dk
37°C	120 dk
85°C	5 dk
4°C	∞
Toplam 20 µl olacak şekilde 10 µl	

2X RT master mix + 10 µl RNA ile birleştirilerek aşağıdaki koşullarda cDNA eldesi gerçekleştirildi. cDNA örnekleri üzerine 90 µl Nuclease-free water eklenerek sulandırıldı ve -20 °C de saklandı.

3.8. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR)

TRPM2,8 ve house keeping(ev geni) β -Actin (EllaBiotech, Deutschland) gen transkripsiyon düzeyleri kantitatif RT-PCR yöntemiyle (QIAGEN Rotor-Gene Q, GERMANY) saptandı. Kantitatif değerler normalizasyon katsayısına göre belirlendi.

Çizelge 3.5. Kullanılan primer dizileri

Gen	Primer Dizileri	Tm	Uzunluk
β -Actin Left	5'-CCC GCG AGT ACA ACC TTC T-3'	58.8	19
β -Actin Right	5'-CGT CAT CCA TGG CGA ACT-3'	56.0	18
TRPM2 Left	5'-AAT TTG CTC ATC GCC ATG TT-3'	53.2	20
TRPM2 Right	5'-GAT CTG GTC TGT GTG CTC CTG-	61.8	21
TRPM8 Left	5'-GCC CAG TGA TGT GGA CAG TA-	59.4	20
TRPM8 Right	5'-GGA CTC ATT TCC CGA GAA GG-'	59.4	20

Oluşturulan cDNA örneklerinin her birinden 5 µl PCR-strip tüplerine alındı. Oluşan her bir örnek üzerine 20 µl qRT-PCR karışımı eklendi. 25 µl olacak şekilde qRT-PCR reaksiyonu QIAGEN Rotor-Gene Q cihazında gerçekleştirildi ve Δ Ct değerleri ile sonuçların analizi saptandı.

Çizelge 3.6. TRPM2, qRT-PCR reaksiyonu

Sıcaklık	İşlem Basamakları	Zaman
95°C	Denatürasyon	15 dk
94°C	Denatürasyon	15 sn { 40 döngü }
51°C	Bağlanma (Annealing)	30 sn
72°C	Uzama (Extension)	30 sn

Çizelge 3.7.TRPM8, qRT-PCR reaksiyonu

Sıcaklık	İşlem Basamakları	Zaman
95°C	Denatürasyon	15 dk
94°C	Denatürasyon	15 sn {40 döngü}
52°C	Bağlanma (Annealing)	30 sn
72°C	Uzama (Extension)	30 sn

Çizelge 3.8.β-Actin, qRT-PCR reaksiyonu.

Sıcaklık	İşlem Basamakları	Zaman
95°C	Denatürasyon	15 dk
94°C	Denatürasyon	15 sn {40 döngü}
52°C	Bağlanma (Annealing)	30 sn
72°C	Uzama (Extension)	30 sn

3.9. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel olarak verilerin değerlendirilmesinde ‘ Graphpad Prism 7’ bilgisayar paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Paramedik dağılım gösteren verilerde One-Way ANOVA testi kullanıldı. Nonparamedik verilerde ise Kruskal-Wallis (posthoc Dunn’s) testi kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda Tukey çoklu karşılaştırılma testi kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm hesaplamalarda $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

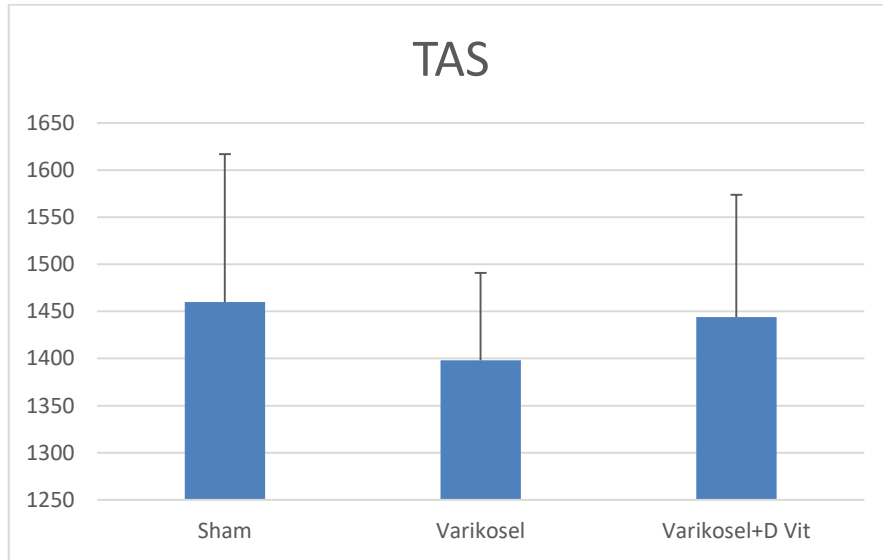
4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Analizlerin Değerlendirilmesi

Mustafa Kemal Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde yaptığımız çalışmada toplam 30 adet Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Çalışma sonrasında deney hayvanlarından aldığımız kan örneklerinden TAS ve TOS değerlerine bakılarak Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) hesaplandı ve sonuçlar alt başlıklar ile sunulmuştur.

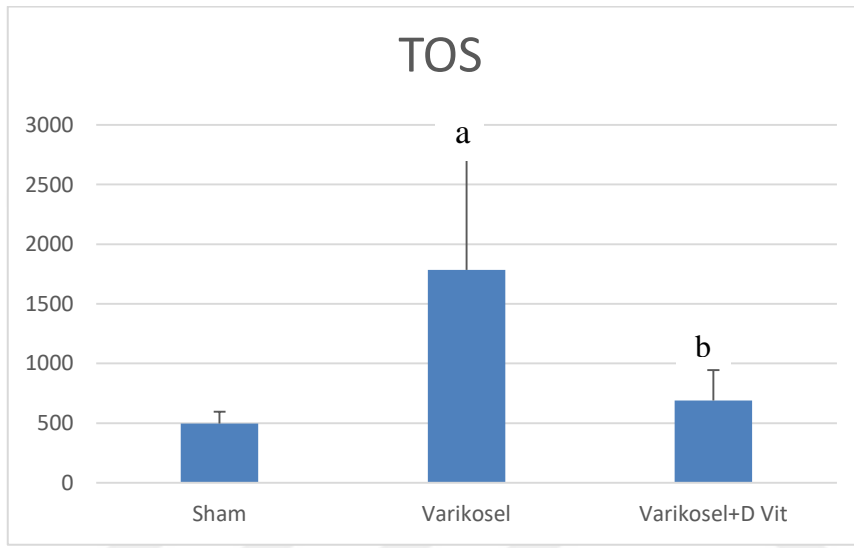
4.2. Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Aldığımız kan örneklerinden sağlanan serumlar ile oksidan ve antioksidan dengelerin totalde değerlendirilmesini sağlayan TAS ve TOS ölçümleri yapıldı. Ölçümle beraber elde edilen TOS değerlerinin yüzde cinsinden TAS değerlerine oranlayarak oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan OSİ değerleri elde edildi. İstatistiksel olarak elde edilen TAS, TOS ve OSİ değerleri şekil 4.1, şekil 4.2, şekil 4.3'deki gibi gösterilmiştir. Gruplar arası yapılan TAS değerlendirilmesinde sayısal olarak değişimler gözlemlenmede istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Gruplar arası TAS değerlerinin kıyaslanması

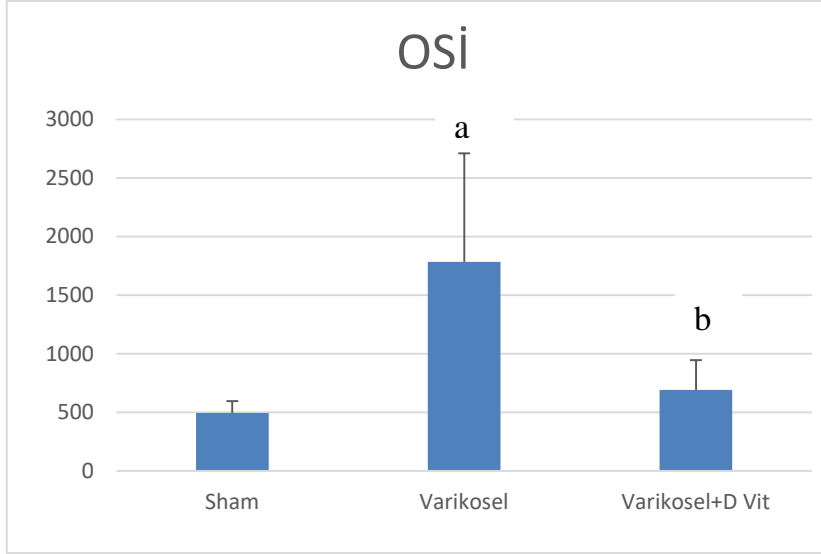
Gruplar arası yapılan TOS değerlendirilmesinde varikozel grubu, sham grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak TOS değerinde artış saptandı ($p<0,05$). Tedavi grubu, varikozel grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak TOS değerinde bir azalış belirlendi ($p<0,01$). Sham ve tedavi grubu arasında sayısal değişiklikler gözükse de istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlılık gözlemlenmedi (Şekil 4.2.)



Şekil 4.2. Gruplar arası TOS değerlerinin kıyaslanması

a: Sham vs Varikozel , $p<0,05$; b: Varikozel+D vit vs Varikozel, $p<0,01$

Ölçümü yapılan TOS değerleri yüzde cinsinden TAS değerlerine oranlama sonucu elde edilen OSİ değerlendirilmesi elde edildi. Varikozel grubu sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede OSİ değerinde bir artış saptandı ($p<0,01$). tedavi grubu, varikozel grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalış belirlendi ($p<0,05$). Sham ve tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmedi ((Şekil 4.3.)

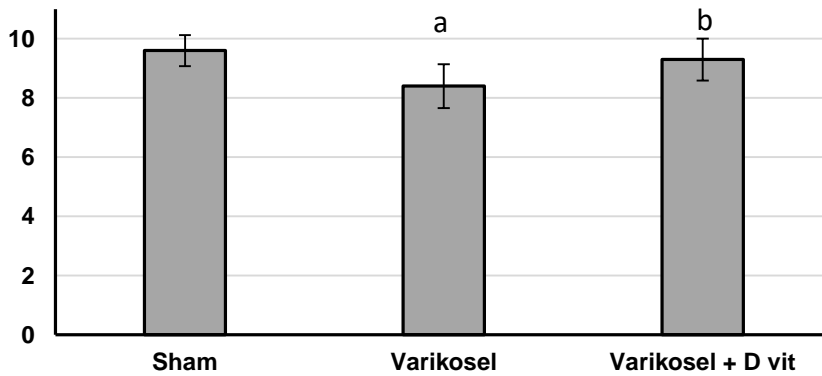


Şekil 4.3. Gruplar arası OSİ değerlerinin kıyaslanması

a: Sham vs Varikosel , $p<0,05$; b: Varikosel+D vit vs Varikosel, $p<0,01$

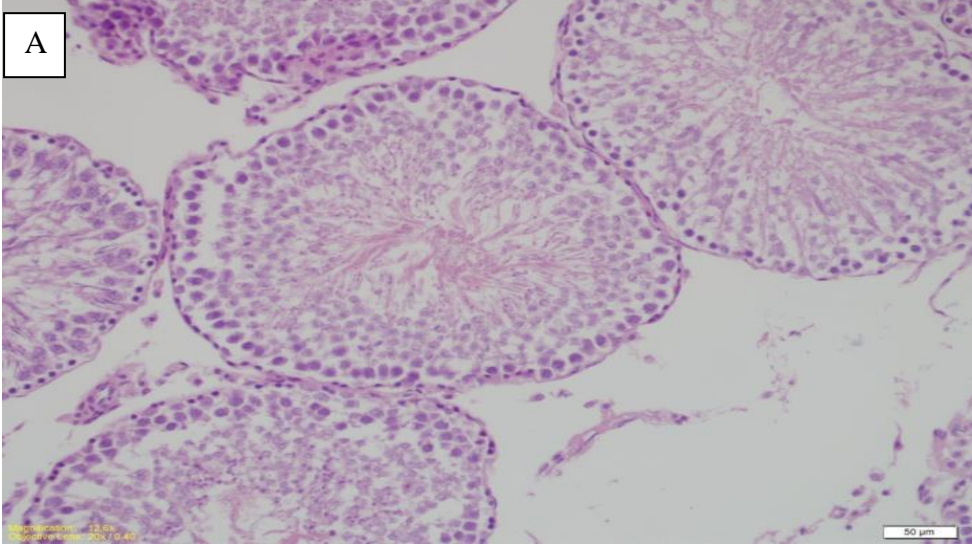
4.3. Histopatolojik Analizlerin Değerlendirilmesi

4 haftalık varikosel modeli süresi sonunda alınan testis dokusu kesitlerinin H&E ile boyanma işlemi yapıldıktan sonra gruplar arasında JS'e göre değerlendirilme yapıldı. Skorlamaya göre varikosel grubunun, sham grubuna göre istatistiksel olarak seminifer tübül elemanlarında bir azalmanın olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). Aynı şekilde varikosel grubu, tedavi grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,05$).

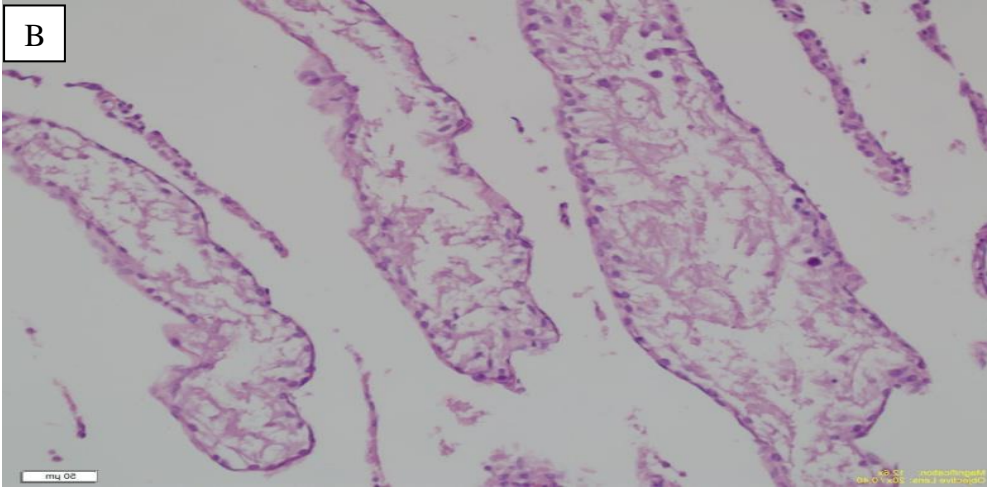


Şekil 4.4. Gruplar arası histopatolojik değerlendirme

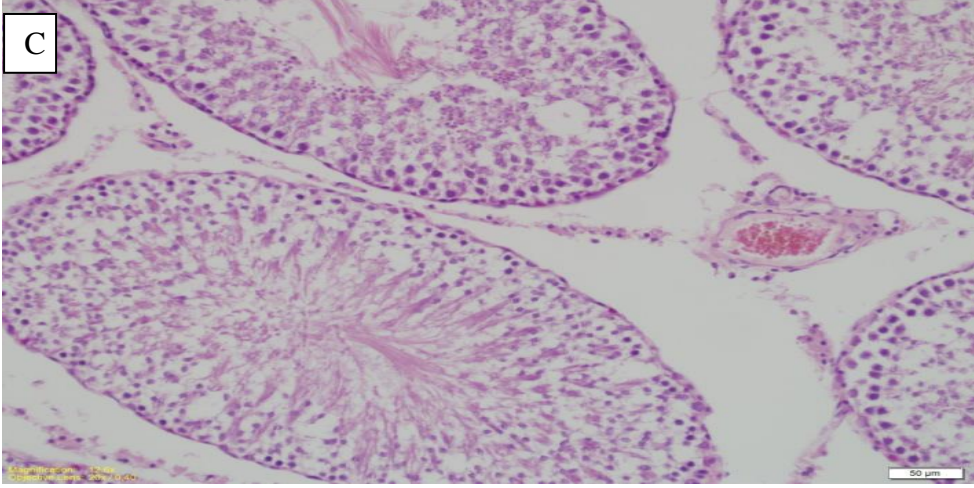
a: Sham vs Varikosel , $p<0,05$; b: Varikosel+D vit vs Varikosel, $p<0,01$



A). Kontrol grubunda görünen korunmuş testis morfolojisi (H&Ex200).



B). Varikozel modeli sonrası seminifer tübüllerde belirgin hasar oluşumu (H&Ex200).



C) D vit. uygulaması sonrası seminifer tübüllerde yapısal düzelme (H&Ex200)

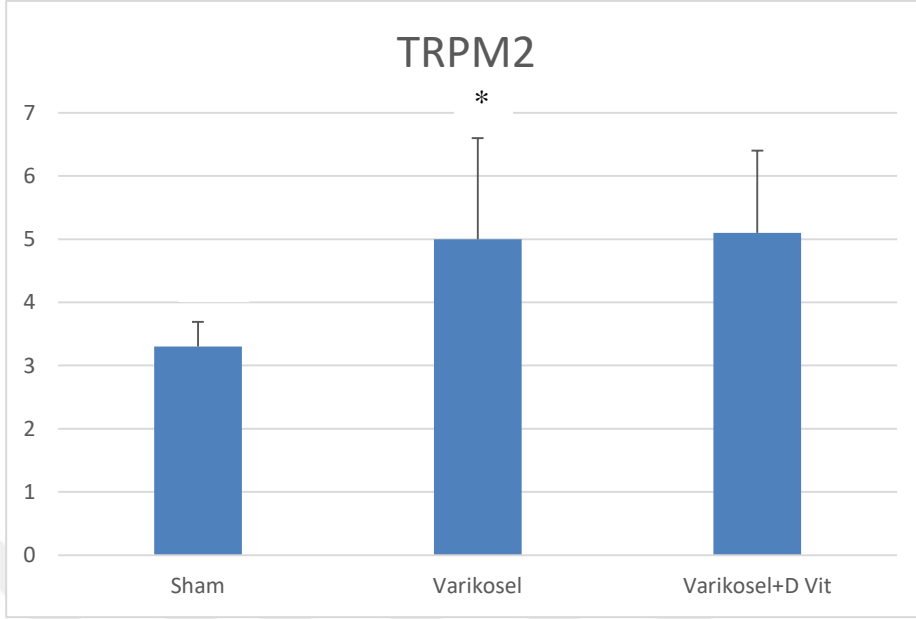
Şekil 4.5. Sıçan testis dokusunun histopatolojik görüntüsü

4.4. Gen Analizlerinin Değerlendirilmesi

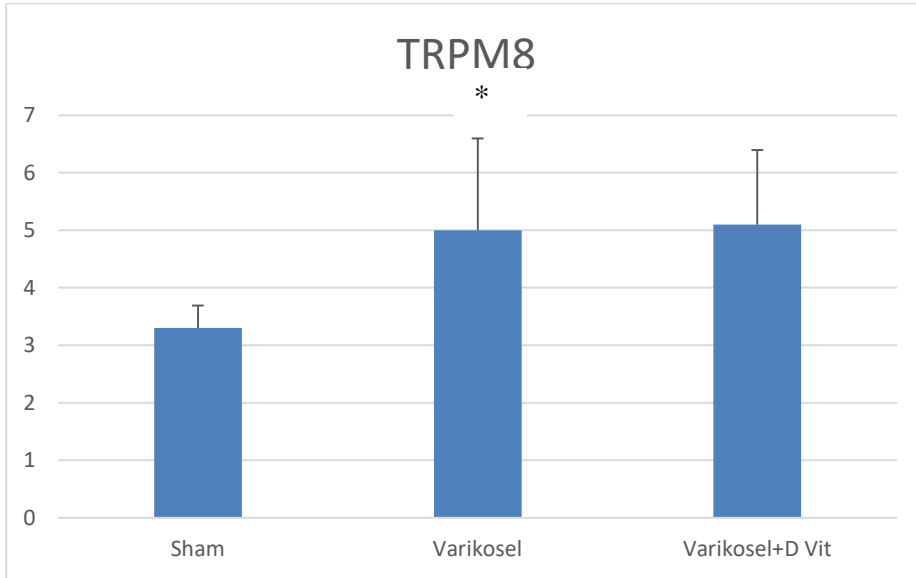
qRT-PCR ile elde edilen verilerden her bir gene ait olan sonuçların dijital ortamda yapılan ölçüm ile verilerin istatistiksel olarak değerlendirmeleri aşağıda verilen Şekil 4.6 ve Şekil 4.7 'deki gibi gösterilmiştir.

TRPM2 grubuna ait veriler incelendiğinde, varikozel grubunun, sham grubuna kıyaslandığında istatistiki düzeyde gruplar arasında bir değişim saptandı ($p<0,05$). Tedavi grubu, sham grubuna kıyaslandığında istatistiki anlamda fark saptandı. ($p<0,01$) Tedavi ve varikozel grubu arasında sayısal değişiklikler görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark gözlemlenmedi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre oksidatif stres ile artış gösteren TRPM2 kanalında, D vit. uyguladığımız grupta sayısal olarak bir azalış saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde görülmedi. (Şekil 4.6.)

TRPM8 grubuna ait veriler incelendiğinde, varikozel grubunun, sham grubuna kıyaslandığında istatistiki düzeyde gruplar arasında bir değişim saptandı ($p<0,05$). Tedavi grubu, sham grubuna kıyaslandığında istatistiki anlamda fark saptandı. ($p<0,01$) Tedavi ve varikozel grubu arasında sayısal değişiklikler görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark gözlemlenmedi. (Şekil 4.7.) Devamlı Ca^{+2} girişi ile artış gösteren TRPM8 kanalında uyguladığımız D vit. kanal üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını gözlemledik.



Şekil 4.6. Gruplar arası TRPM2 gen ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması.
*:vs sham ($p < 0,05$)



Şekil 4.7. Gruplar arası TRPM8 gen ekspresyon düzeylerinin kıyaslanması.
*:vs sham ($p < 0,05$)

4.5. Testis Ağırlıklarının Karşılaştırılması

4 haftalık varikozel modeli süresi sonunda tüm gruptaki deney hayvanlarının sağ ve sol testis dokuları hassas terazi (Pioneer, OHAUS) ile tartımı yapıldı. Grupların sağ ve sol testis karşılaştırılması, aşağıdaki çizelge 3.9. deki gibi gösterilmiştir. Gruplar arası sol testis ağırlığına göre kıyaslandığında varikozel grubunun, sham ve tedavi grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Yine aynı şekilde sol testis ağırlığı olarak kıyaslandığında tedavi grubu ile sham grubu arasında sayısal değişimler gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi. Alınan testis dokuları sağ testis olarak kıyaslandığında gruplar arasında sayısal değişimler gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi.

Çizelge 3.9. Sağ ve sol testis ağırlıklarının karşılaştırılması (Ort.±SH).

^a: vs Sham; ^b: vs Varikozel; ^c: vs Varikozel+ D vit. *:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001

	Sham	Varikozel	Varikozel+D vit
Sağ Testis	2,1 ±0,15 ^{b***}	1,6 ±0,27 ^{b**}	1,8±0,22 ^{b***}
Sol Testis	2±0,16	1,2 ±0,23 ^{a***}	1,6±0,23 ^{a**}

5. TARTIŞMA

Varikosel fizyopatolojisi tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte fizyopatolojisi üzerine birçok klinik ve deneysel çalışmalar bulunmaktadır. İmmünolojik ve antiinflamatuvar bir etkiye sahip olan D vit. varikoselin fizyopatolojisi üzerindeki etkisini incelemeyi amaçladık. Yaptığımız literatür taramaları neticesinde daha önceden varikoselin fizyopatolojisi üzerine D vit. ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmadığından, çalışmamız bu yönüyle özgün bir özelliğe sahiptir. D vit. varikoselin fizyopatolojisindeki etkisini gözlemlemek için histopatolojik, biyokimyasal ve gen ekspresyon analizlerini gerçekleştirdik.

Kandan sağlanan serum örneklerinden biyokimyasal değerler (TAS, TOS ve OSİ) bakılarak testis üzerindeki işlevlerini ve varikosel modeli arasındaki bağlantı değerlendirildi. Moleküler seviyede incelemek amacıyla aldığımız testis doku örneklerinden qRT-PCR tekniği kullanılarak TRPM2-8 gen analizleri üzerine gerçekleşen değişimleri değerlendirdik.

Varikosel, skrotum içerisindeki pampiniform pleksusu oluşturan spermatik venlerin dilatasyonu olarak belirtilmektedir. Adolesan yaşlarda görülen erkek infertilitesinde en sık rastlanan sebepleri arasında sayılmakta ve erkek infertilitesinin cerrahi olarak düzeltilebilen bir durumu olarak gösterilmektedir (Fretz ve Sandlow 2002). Varikosel, erkeklerde testiküler ve epididimal hasar nedeni ile infertiliteye neden olduğu ifade edilmektedir. Tedavi yaklaşımının bir sonucu olarak ifade edilirse, varikosel derecesi, testis boyutu, endokrin etkenler, seminal parametreler gibi birtakım klinik parametreler üzerinde etkisinin bulunduğu gösterilmektedir (Oktar ve ark. 2004).

Varikoselli kişilerinde içinde bulunduğu infertil popülasyonda SOR'ların varikosel ile arasında bir ilişkinin olduğu ifade edilmektedir (Tres ve Kierszenbaum 1999). Varikoselli kişiler incelendiğinde görülen sonuçlar oksidatif stres hasarı ile birlikte testis boyutunda anormal değişiklikler meydana geldiği ifade edilmiştir. Testis morfolojisindeki bozukluk, seminifer tübül elemanlarındaki kaybın olması ve tübülün çapında bir azalmanın meydana gelmesi olarak ifade edilen ve bunun sonucunda patolojik olarak normal olmayan semen parametreleri ve subfertilitenin oluşumunun altında yatan önemli sebepler olarak gösterilmektedir (Paduch DA 2001).

Oktar ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada ilerleyen testis hasarı sonucunda semen parametrelerinde bozulmanın sonucu olarak infertiliteye neden olan varikoselin adolesan yaş grupları arasında yaklaşık olarak 2/3 üzerinde testiküler büyüme geriliğinin olduğu ifade edilmiştir (Oktar ve ark. 2004). Varikosele sahip kişiler incelendiğinde testis hacminde büyüme ile ilgili zıt görüşlerde bulunmaktadır. Thomas ve Elder ile Zini ve ark. (2002) farklı zaman dilimlerinde yaptıkları çalışmalarda varikosele aynı tarafta testiste rölatif atrofi görüldüğünden bahsedilmiştir (Thomas ve Elder 2002).

Hans ve ark. (1991) yaptıkları çalışmanın sonucunda, sperm kalitesindeki düşüklüğün, testiküler büyüme geriliği ile birlikteliğinin net olmadığını ifade etmişlerdir (Hans ve ark. 1991). Salama ve ark. (2003) oluşturdukları varikosele modelininin oluşumunu takiben 30 günlük bir süre içerisinde gözlemledikleri yapılan çalışmaların tersi bir şekilde testis hacminde artış olduğunu tespit etmişler ve bunun sonucunda ise varikosele ile oluşan kapiller permeabilite artışından dolayı intersitisiyel ödem kanıt olarak gösterilmektedir (Salama ve Bergh 2003).

Oluşturduğumuz varikosele modelinde sol testisin hacminde küçük çaplı bir azalma meydana gelmiştir. Çalışmamıza ait veriler incelendiğinde yapılan bazı çalışmalarla benzer özellik göstermektedir. Gruplar arası sol testis ağırlığına göre kıyaslandığında varikosele grubunun, sham ve tedavi grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptandı. Yine aynı şekilde sol testis ağırlığı olarak kıyaslandığında tedavi grubu ile sham grubu arasında sayısal değişimler gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi. (sırasıyla $p<0,0001$, $p<0,01$). Alınan testis dokuları sağ testis olarak kıyaslandığında gruplar arasında sayısal değişimler gözlemlense de istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,01$). Tedavi grubunun, sham grubuna yakın olmasının nedeni D vit. testis üzerinde koruyucu bir etkisinin olduğu söylenebilir.

Son yıllarda varikosele üzerinde yoğun bir şekilde araştırma yapılan oksidatif stres, araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. 1943'te ilk olarak oksidatif stresin erkek infertilitesinde ki önemi İskoç asıllı androlog John MacLeod'un aerobik koşullarda inkubasyona maruz kalan insan spermatazoonların katalaz ilave etmesi ile hareketliliğinin arttığını bildirmesi şeklinde başladığı bildirilmektedir (Macleod 1943).

SOR'ların, fertilité üzerine semen kalitesi ve sayısı üzerinde olumsuz birçok etkisinin olduğu bildirilmiştir. Aşırı SOR üretimi ve azalan TAS düzeyi testiküler dokuda aşırı SOR birikimini meydana getirdiği ifade edilmiştir. Enzimatik ve bitkisel kaynaklı olan antioksidanlar oksitadif hasara karşı bir savunma ya da bir koruyucu etkisini araştırmak için birçok çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada, varikoselli kişilerin spermlerinde SOR'ların arttığını ve TAS seviyesinin dűřük olduğu gösterilmiştir (Mostafa ve ark. 2001, Köksal ve ark. 2003).

D vit. kalsiyum-fosfor arasındaki dengeyi sağladığı ve kemik mineralizasyonunda aktif bir görev üstlendiği bilinmesinin yanı sıra antiinflamatuvar ve immün koruyucu özelliklerinin olduğu belirtilmiştir (Cannell 2013). Yaptığımız deneysel varikozel modeli üzerinde D vit. sahip olduğu özelliklerinden yararlanarak testis fizyopatolojisi üzerine etkisini amaçladık.

Salum ve ark. (2013) alışmasında, streptozosin ile diyabet oluşturulan ratları iki gruba ayırıp, bir gruba 10 hafta boyunca 500Ü kolekalsiferol (D3 vitamin) uygulamış ve diğer gruba hiçbir madde enjekte edilmemiş. Sonuçlar değerlendirildiğinde, enjekte edilmeyen grupta karaciğer ve serumda oksidatif stres gözlemlenirken, D vit. uygulanan grupta vasküler komplikasyonlara karşı bir savunma oluştuğu gösterilmiştir (Salum ve ark. 2013).

Lin ve ark. (2005) yaptığı çalışmada ratlarda çinko ile serebral oksidatif stres oluşturulup D vit., antioksidan etkiye sahip olan melatonin, beta stradiyol ve vitamin E ile karşılaştırılmış. D vit. lipid peroksidasyonunu ve otooksidasyonu indükleyici etki gösterdiği belirtilmektedir. Karşılaştırılan antioksidanlara benzer özelliklere sahip olduğundan bahsedilmektedir (Lin ve ark. 2005).

Hamden ve ark. (2009) diyabetik sıçanlar üzerine yaptığı bir araştırmada D vit. böbrek, pankreas, karaciğer, hiperglisemi, oksidatif stres ve hücre hasarında inhibasyon gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir. (Hamden ve ark. 2009).

Garcion ve ark. (1999) yaptığı D vit., oksidatif stresi indükleyici ve koruyuculuğu üzerine yapılan çalışmada D vit. iNOS aktivitesini azalttığını ve böylece primer rat astrositlerindeki serbest radikal oluşumunu azaltarak peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidatif savunma sistemlerini harekete geçirme yoluyla oksidatif stresi azalttığı belirtilmektedir (Garcion ve ark. 1999).

Menegaz ve ark. (2009) sıçanlarda D vit., sikloheksid ile bloke edilen 11 günlük fare testisindeki amino asit birikimi üzerinde güçlü bir uyarıcı etki gösterdiği bildirmektedir. Sonuç olarak, D vit. testisin protein kinaz A tarafından tetiklenebilen genomik etkilerle ve plazma membranında Ca^{+2}/K^{+} kanallarını içeren hızlı yanıtlarla önemli bir rol oynadığı rapor ettiler (Menegaz ve ark. 2009).

Hamden ve ark. (2008) diyabetik sıçanlarda 1,25 (OH) 2D3 tedavisi, testosteron ve 17 β -östradiol seviyelerini arttırarak oksidatif stres, hücrel toksisiteden korunma, sayı ve motilitesinin korunması ile üreme sisteminde alloxan kaynaklı hasar üzerinde koruyucu bir etkisinin olduğunu bildirmektedir (Hamden ve ark. 2008).

D vit. eksikliği olan erkek sıçanlarda, başarılı çiftleşmelerde % 45 oranında bir azalmaya ve kontrole karşılaştırıldığında % 73 oranında azaltılmış toplam doğurganlık hızına sahip olduğu gösterilmiştir (Kwiecinski GG ve ark. 1989).

Erkek üreme mekanizması aşırı SOR birikmesi ile oksidatif stres meydana getirmesi ile patolojik olarak altta yatan sebeplerden biri olarak gösterilmekte ve araştırmaların ilgisini bu yöne çekmektedir.

Çalışmamız, yapılan çalışmalarla uygunluk gösterek kandan sağlanan serumlarla oksidan ve antioksidan dengelerin totalde değerlendirilmesini sağlayan TAS ve TOS ölçümleri yapıldı. Ölçümle beraber elde edilen TOS değerlerinin yüzde cinsinden TAS değerlerine oranlayarak oksidatif stresin önemli bir göstergesi olan OSİ değerleri elde edildi. Gruplar arası yapılan TAS değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlılık saptanmadı ancak sayısal olarak değişimler gözlemlendi ($p>0,05$). Gruplar arası yapılan TOS değerlendirilmesinde varikozel grubu, sham grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak TOS değerinde artış saptandı ($p<0,001$). Aynı şekilde varikozel grubu, tedavi grubu ile istatistiksel olarak kıyaslandığında TOS değerinde bir artış belirlendi ($p<0,01$). Sham ve tedavi grubu arasında sayısal değişiklikler gözükse de istatistiksel olarak değerlendirildiğinde anlamlılık gözlemlenmedi ($p>0,01$). Ölçümü yapılan TOS değerleri yüzde cinsinden TAS değerlerine oranlama sonucu elde edilen OSİ değerlendirilmesi elde edildi. Varikozel grubunun, sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede OSİ değerinde bir artış saptandı ($p<0,001$). Aynı şekilde varikozel grubu, tedavi grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış belirlendi ($p<0,05$). Sham ve tedavi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlenmedi ($p>0,01$)

TRPM grup üyesi olan TRPM2, oksidatif hasar oluşumunun habercisi ya da temsilcisi Adenozin di-fosfat Riboz (ADPR) ile aktive olmaktadır. Metodolojik problemlerin nedeni ile TRPM2 kanalının aktive durumu, NAD^+ , ADPR ve H_2O_2 sebebiyle farklı raporların ortaya çıktığı belirtilmiştir (Özgül ve Nazıroğlu 2010). Örneğin, human embryonic kidney293 (HEK293), HEK293 hücrelerinde (Hara ve ark., 2002; Wehage ve ark., 2002), Chinese hamster ovary (CHO) hücrelerinde (Nazıroğlu ve ark., 2007), GRI-GI rat insülinoma hücrelerinde (Fonfria ve ark., 2005), TRPM2 kanalı H_2O_2 tarafından aktive olduğu bildirilmektedir. Ancak insan nötrofil granülosit hücrelerinde H_2O_2 , TRPM2 kanalını aktif hale getirmediği bildirilmektedir (Heiner ve ark., 2003). Kolisek ve ark. HEK293 hücrelerinde, cADPR tarafından açılan TRPM2 kanalı bileşik tarafından uyarıldığını bildirmektedirler. Elde edilen bu sonuçlar Gasser ve ark. (2006) tarafınca onaylanıp ve Jurkat hücrelerinde TRPM2 kanalları cADPR tarafından aktif hale geldiği rapor edilmiştir (Gasser ve ark. 2006). Ancak, yapılan başka bir çalışmaya göre nötrofil granülositlerin sonuçlarını desteklemedi ve cADPR'nin uyarımıyla TRPM2 kanallarının açılmadığı belirtildi (Heiner ve ark., 2006).

Jie Zou ve ark. (2013) makrofaj hücrelerinde H_2O_2 'in biyolojik olarak uygun konsantrasyonlarına erken yanıt sırasında TRPM2'nin Ca^{+2} sinyalizasyonuna ve hücre ölümüne aracılık etmesindeki desteği ve mekanizmaların incelenmesini amaçlamışlar, sonuç olarak TRPM2 kanalının hücre ölümündeki rolünü göstermişler (Zou ve ark. 2013).

Philippe Wyrsh ve ark. (2012) TRPM2 kanalının oksidatif stres ile meydana gelen sonuçların iyileştirilmesinde görev alan enzimlerin (PARP1 ve PARP2) etkinliği sonucunda, kanalı aktif duruma getirdiği belirtilmiştir (Philippe Wyrsh ve ark. 2012).

Wang Q (2014) çalışmasında serbest radikallerin TRPM2 kanallarının aşırı Ca^{+2} akışı ile aktive olduğu durumda hücrenin apoptoz veya otofajiye doğru yönelmesine dair ipuçlarının olduğu belirtilmektedir (Wang Q 2014).

Hecquet ve ark. (2008) çalışmasında; endotelial hücrelerde, TRPM2'nin ekspres olduğunu ve endotelial geçirgenlikteki H_2O_2 'in uyarımsal bir artış ile TRPM2'nin Ca^{+2} akışını aktif duruma getirmesi olayına aracılık ettiğini saptamışlardır (Hecquet ve ark. 2008).

Yapılan çalışmalarda oksidatif stres ile birlikte hücre içi Ca^{+2} artışından kaynaklı TRPM2 kanalında artış olduğu belirtilmektedir.

TRPM2 grubuna ait veriler incelendiğinde çalışmamız uygunluk göstererek varikozel grubunun, sham grubuna kıyaslandığında istatistiki düzeyde gruplar arasında bir artış saptandı ($p<0,05$). Gruplar değerlendirildiğinde tedavi grubu, sham grubuna kıyaslandığında istatistiki anlamda fark saptandı. Ayrıca tedavi grubu, varikozel grubuna arasında sayısal bir azalış görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark gözlemlenmedi (sırası ile $p<0,05$, $p<0,01$). Elde ettiğimiz sonuçlara göre oksidatif stres ile artış gösteren varikozel grubundaki TRPM2 kanalında, D vit. uyguladığımız grupta sayısal olarak bir azalış saptandı ancak istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde görülmedi. Elde edilen verilere göre D vit. artan gen ekspresyon seviyesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığını tespit ettik

TRPM8 kanalı soğuk reseptör ile aktive olduğu bildirilmektedir. TRPM8 kanallarının aktivite durumu devamlı Ca^{+2} kanallarının akışı ile olduğu ifade edilmektedir. TRPM8, soğutma ve mentol veya isilin gibi soğutma maddeleri ile aktif hale geldiği belirtilmektedir (Nilius ve ark. 2007, Alexhander ve ark. 2004, Mckemy ve ark. 2002).

Pablo ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarında western blotting ve immunohisto ve sitokimyasal deneyler ile TRPM8 kanallarının sıçan testisinde ve spermine yerleşik olduğu bildirilmektedir (Pablo ve ark. 2011). TRPM8 testis de dahil olmak üzere sıçan genito üriner yolunda orta derecede eksprese edildiği bildirilmektedir (Stein RJ ve ark. 2004). Shilin Li ve ark. (2010) yaptığı deneysel çalışmada, alınan 5 testis dokusu üzerinde RT-PCR yaptığı çalışma sonucunda, TRPM5 ve TRPM8'in herhangi bir ifadesine rastlanmadığı belirtilmiştir (ShilinLi ve ark. 2010).

Son zamanlarda, nöropatik ve kronik ağrı sıçan modellerinde duyuşal afferentlerde TRPM8'in, ya kütanöz yada intratekal farmakolojik ajanlarla veya ılımlı soğutma ile aktivasyonunun, duyarlılaştırılmış ağrı yanıtlarının inhibisyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Proudfoot CJ ve ark. 2006).

TRPM8, prostat kanseri patofizyolojisinde de önemli bir rol aldığı ifade edilmektedir (Tsavaler L ve ark. 2001). Androjene duyarlı LNCaP hücre hattında TRPM8, endoplazmik retikulum ve plazma zarını lokalize ettiğini ve her iki lokasyonda bir Ca^{+2} 'a geçirgenlik kanalı oluşturduğu bildirilmiştir (Zhang L ve Barritt GJ, 2004). Bununla birlikte, LNCaP hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada, TRPM8'in endoplazmik

retikulum ile büyük oranda sınırlandırıldığını ve Ca^{+2} salım kanalı olarak işlev gördüğü belirtilmiştir (Thebault S ve ark. 2005).

Çalışmamız uygunluk göstererek varikozel grubunda TRPM8 seviyesinde istatistiksel olarak sham grubuna göre artış saptandı ($p<0.05$). Ancak tedavi grubumuzdaki, TRPM8 gen ekspresyonunun varikozel grubu ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı ($p<0.01$). Elde edilen verilere göre D vit. artan gen ekspresyon seviyesi üzerine önemli bir etkisinin olmadığını tespit ettik.

Varikozel oluşumu takibinde genel anlamda histolojik olarak görülen değişiklikler; Leydig hücre hiperplazisi, tübüldeki sertoli hücre sayısında bir azalma, spermato genetik arrest ve germinal epiteldeki yapısal değişiklikler, seminifer tübül bazal membranın meydana gelen değişiklikler ile zamana bağlı olarak bir kalınlaşmanın olduğu gösterilmektedir (Peduch ve Skoog 2001). Çalışmamızda histopatolojik incelemeler sonucunda JS'den elde edilen verilere göre değerlendirildiğinde varikozel grubunun, sham grubuna göre istatistiksel olarak seminifer tübül elemanlarında bir azalmanın olduğu gözlemlendi ($p<0,01$). Aynı şekilde varikozel grubu, tedavi grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0,05$).

Tedavi grubunun, hasta grubuna yakın bir değerin görülmesi D vit. varikozel sonucu oluşan testis dokusu üzerinde olumlu ve düzenleyici bir etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

6. SONUÇ

Deneysel olarak oluşturduğumuz varikosel modelinde elde ettiğimiz verilere göre, D vit. testiste oluşan oksidatif strese karşı biyokimyasal, histopatolojik ve moleküler düzeyde analizlerimizi gerçekleştirdik. Yaptığımız çalışmaların neticesinde D vit. testis üzerinde biyokimyasal ve histopatolojik olarak oluşan oksidatif stres parametrelerin azalmasına neden olduğunu belirledik. Moleküler düzeyde yapılan TRPM gen ekspresyon seviyesinin oksidatif stres ile artan parametreler ile birlikte, D vit. artan parametreler üzerinde yetersiz olduğunu tespit ettik. Çalışmamızın sonuçları klinik olarak desteklenmesi ve doğrulanması gerektiğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N et al:** Phlebography in varicocele scroti (Abstract). *Açta Radiol Diag* **1966**; 4: 517-528.
2. **Akbay E, Çayan S, Doruk E et al.** The prevalence of varicocele and varicocele-related testicular atrophy in Turkish children and adolescents. *BJU Int* **2000**; 86(4): 490-493.
3. **Akgül E, İlhan N, İlhan N, Halifeoğlu İ.** Tip II Diabetes Mellitusta lipid peroksidasyonu ve eritrosit antioksidan enzim aktiviteleri. *Türk Biyokimya Dergisi* **1999**;3:28-33.
4. **Akyol O, Ozbek E, Uz E, Koçak I. (2001)** Malondialdehid level and total superoxide dismutase activity in seminal fluid from patients with varicocele. *Clin Exp Med*; 1 (1) :67-8.
5. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptor and Ion Channels. *Br.J. Pharmacol.* 2004. 141 (suppl.1); 1-126.
6. **Alkan İ, Şimşek F, Haklar G et al.** Reactive oxygen species production by spermatozoa of patients with idiopathic infertility. *J Urol* **1997**; 157 1:140-3.
7. **Aquila S.** Human sperm anatomy: ultrastructural localization of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D receptor and its possible role in the human male gamete. *J. Anat.* **2008**; 213: 555-564..
8. **Arıncı K, Elhan A.** Anatomi. Ankara: Güneş Kitabevi, **1997**.
9. **Arian GM, Waseem S, Awan and Fowad K.** Varicocele management-a comparison of palomo versus inguinal approach. *Biomedica* 2009;25:10-3.
10. **Baccetti B, Collodel G, Piomboni P:** Apoptosis in human ejaculated cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* **1996**; Abstract 28, 587-596.
11. **Barçawi A, Caruso A, Meacham RB.** Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *J Urol* **2004**; 171: 501-3.
12. **Basaklar AC.** Skrotal Kitleler: Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları. 1. Baskı. Basaklar AC (ed) Palme Yayıncılık, Ankara **2006**, S:1765-1786
13. **Benoff S, Barcia M, Hurley IR et al:** Classification of male factor infertility relevant to in vitro fertilization insemination strategies using mannose ligands, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. *Hum Rep* **1996**; 11: 1905-1918.
14. **Benoff S, Gilbert SR.** Varicocele and male infertility: Part I Preface. *Hum Reprod Update* **2001**,7(1):47-54
15. **Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000)** The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):11- 21. doi:10.1038/35036035
16. **Blomberg Jensen M, Nielsen JE, Jorgensen A, et al.** Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. *Hum Reprod* 2010; 25: 1303 -1311..
17. **Blomberg JM.** Characterization of the testicular, epididymal and endocrine phenotypes in the Leuven Vdr-deficient mouse model: targeting estrogen signalling. *Mol. Cell Endocrinol.* 2013; 377: 93-102.
18. **Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, et al.** Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr. Rev.* 2008; 29: 726 - 776.
19. **Braedel HU, Steffens J, Ziegler M et al.** A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol* **1994**; 151: 62-66.
20. **Burçak G AG.** Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma. *Cerrahpasa Tıp Dergisi* **2004**; 35.
21. **Cannell JJ.** Autism, will vitamin D treat core symptoms? *Med Hypotheses*. **2013**;81(2): 195-8
22. **Clapham, D.E.,** 2007. Snapshot: mammalian TRP channels. *Cell.* 129, 220.
23. **Clapham, D.E., Runnels, L.W., Strubing, C.,** 2001. The TRP ion channel family. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 387-396.
24. **Comhaire F, Vermeulen A:** Varicocele sterility cortisol and catecholamines. *Fertil Steril* **1974**; 25:88-95.
25. **Coolsaet BLRA:** The varicocele syndrome: venography determining the optimal level for surgical management. *J Urol* 1980; 124: 833-926.
26. **Costa RR, Reis RI, Aguiar JF, Varanda WA.** Luteinizing hormone (LH) acts through PKA and PKC to modulate T-type calcium currents and intracellular calcium transients in mice Leydig cells. *Cell Calcium* 2011; 49: 191-199.
27. **Çavdar C SA, Çamsarı T.** Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* **1997**; 3-4: 92-95.

28. **Çayan S, Akbay E, Bozlu M, Doruk E, Acar D, Ulusoy E.** The effect of varicocele repair on testicular volume in children and adolescents with varicocele. *The Journal of Urol* **2002**;168:731-34
29. **Dahl HV, Hendrick JF:** A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg Gynecol Obstet* **1959**; 108:697-705.
30. **De Haes P, Garmyn M, Carmeliet G, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S.** Molecular pathways involved in the anti-apoptotic effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary human keratinocytes. *J Cell Biochem* **2004**; 93: 951-967.
31. **Dalgaard, M., Nellemann, C., Lam, H.R., Sorensen, I.K., Ladefoged, O., 2001.** The acute effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes of prepubertal Wistar rats. *Toxicol. Lett.*122, 69 – 79
32. **De Lamirande E, Gagnon C.** Human sperm hyperactivation in whole sperm and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril* **1993**; 59: 1291-1295
33. **Demas BE, Hricak H, McClure RD.** Varicoceles: radiologic diagnosis and treatment. *Radiol Clin N Amer* **1991**; 29 3:619-27
34. **Dhabuwala CB, Hamdi S, Moghissi KS:** Clinical versus subclinical varicocele: improvement in fertility after varicocelectomy. *Fertil Steril* **1992** Apr; 57 4: 854-7
35. **Dubin L, Amelar D.** Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril* **1970**; 21 8:606-9
36. **E, Kals J, Kampus P, Salum T, Zilmer K, Aunapuu M, et al.** Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic Wall and systemic oxidative stress in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* **2013**;100(2): 243-9.
37. **Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005 Dec;38(12):1103-11. Epub 2005 Oct 7. ((9:1-9)
38. **Erenel G, Erbaş D, Akın A.** Serbest radikaller ve antioksidan sistemler. *Gazi Tıp Dergisi.* **1992**; 3:243-50
39. **Faustino R, Perez-Lopez FR, Chedraui P, Haya J.** Vitamin D acquisition and breast cancer risk. *Reprod Sci,* 2009;16:7-19.
40. **Francis X.S, Mark F.B:** Varicocele. Abnormalities of the Testes and Scrotum and their Surgical. *CAMPBELL'S UROLOGY.* (Walsh P C, Retik A B, Vaughan E D, Wein A J, editors), Philadelphia, W.B. Saunders Company **1998.**
41. **Free MJ, Schluntz GA, Jaffe RA.** Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol Reprod* **1976**;14(4):481-8.
42. **Fretz PC, Sandlow JI:** Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Urol Clin North Am* 29: 921-937, **2002**
43. **Fonfria, E., Marshall, I.C., Boyfield, I., Skaper, S.D., Hughes, J.P., Owen, D.E., Zhang, W., Miller, B.A., Benham, C.D., McNulty,S., (2005).** Amyloid beta-peptide (1-42) and hydrogen peroxide-induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures. *J. Neurochem.* 95, 715-723.
44. **Friberg L.** Cadmium and the kidney. *Environ Health Perspect.* **1984**; 54: 1–11.
45. **Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K et al:** Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl* **1989**; 22:149-159.
46. **Garcion E, Sindji L, Leblondel G, Brachet P, Darcy F.** 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem* **1999**; 73: 859-866.
47. **Gartner PG, Hiatt JL.** *Color Text Book of Histology.* 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, **2006.**
48. **Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, Davidson BR, Seifalian AM.** The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: a review. *Liver Transpl* **2005**,11:1031-47.
49. **Gorelick JI and Goldstein M.** Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* **1993**; 59: 613 616.
50. **Gasser, A., Glassmeier, G., Fliegert, R., Langhorst, M.F., Meinke, S., Hein, D., Kruger, S., Weber, K., Heiner, I., Oppenheimer, N., Schwarz, J.R., Guse, A.H., (2006).** Activation of T cell calcium influx by the second messenger ADP-ribose. *J. Biol. Hem.* 281,2489-2496.
51. **Grasso LF, Pepe P, Panella P et al.** Volocimetric evaluation of spermatic vessels with echo color Doppler in patients with idiopathic varicocele. *Minerva Urol Nefrol* **1997**; 49: 179-182.
52. **Green KF, Turner TT and Howard SS.** Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J Urol* **1984**; 131: 1208-1211.

53. **Grillo-Lopea AJ.** Primary right varicocele, **1979**;105:540-544
54. **Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Ayadi F, Garmazi F, Mezgenni N & Elfeki A.** Inhibitory effects of 1 α , 25dihydroxyvitamin D₃ and Ajuga iva extract on oxidative stress, toxicity and hypofertility in diabetic rat testes. *Journal of Physiology and Biochemistry*(**2008**) 64 231–239. (doi:10.1007/BF03216108).
55. **Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al.** 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D₃: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **2009**; 55: 215-222.
56. **Hamidanoğlu M.** Osteomiyeliteli Hastalarda Oksidan ve Antioksidan Kapasitelerin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Şanlıurfa; 2011.
57. **Hans LCF, Laven JSE, Mail WPTM, te Velde ER, Wensing CJG.** Testis volumes, semen quality, and hormonal patterns in adolescents with and without a varicocele. *Fertil Steril* **1991**; 56: 731–6.
58. **Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K., Mori, Y., (2002).** LTRPC2 Ca²⁺-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell.* 9, 163-73.
59. **Hargreave TB.** Debate on the pros and cons of varicocele treatment-in favour of varicocele treatment. *Hum Rep* 1995; 10(Suppl 1): 151-157.
60. **Hecquet CM, Ahmmed GU, Vogel SM, Malik AB.** Role of TRPM2 channel in mediating H₂O₂-induced Ca²⁺ entry and endothelial hyperpermeability. *Circ Res* **2008** Feb 15; 102(3): 347-55.
61. **Hecquet CM, Malik AB.** Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *Thromb Haemost.* 2009;101(4):619-25.
62. **Heiner, I., Eisfeld, J., Luckhoff, A., (2003).** Role and regulation of TRP channels in neutrophil granulocytes. *Cell. Calcium.* 33, 533- 40.
63. **Heiner I, Eisfeld J, Halaszovich CR, Wehage E, Jungling E, Zitt C, et al.** Expression profile of the transient receptor potential (TRP) family in neutrophil granulocytes: evidence for currents through long TRP channel 2 induced by ADP-ribose and NAD. *Biochem J.* 2003a;371(Pt 3):1045-53.
64. **Heiner, I., Eisfeld, J., Warnstedt, M., Radukina, N., Jungling, E., Luckhoff, A., (2006).** Endogenous ADP-ribose enables calcium-regulated cation currents through TRPM2 channels in neutrophil granulocytes. *Biochem. J.* 398, 225-232.
65. **Hendry WF, Sommerville IF, Hall RR, Pugh RC.** Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol* 45: 684-692, **1973**.
66. **Hlavaty T, Krajcovicova A, Payer J.** Vitamin D Therapy in Inflammatory Bowel Diseases: Who, in What Form, and How Much?. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2015, 198–209. doi:10.1093/ecco-jcc/jju004
67. **Holick MF.** Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest.* **2006(a)**;116(8):2062–2072.
68. **Houghton LA, Vieth R.** The case against ergocalciferol (vitamin D₂) as a vitamin supplement. *American Journal of Clinical Nutrition* **2006**; 84: 694-697
69. **Hsu HS, Chang LS, Chen MT et al.** Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *Eur Urol* **1994**; 25: 71-75.
70. **Hsu HS, Wei YH and Li AF.** Defective mitochondrial oxidative phosphorylation in varicocele-bearing testicles. *Urology* **1995**; 46: 545-549..
71. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4444353.html>
72. **Hunt CR, JE. Sim, SJ Sullivan, T. Featherstone, W. Golden, Von Kapp-Herr C, et al:** Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Res* **1998**; 58 17:3986-92
73. **Hurt GS, Howards SS and Turner TT.** Repair of experimental varicoceles in the rat. Long term effects on testicular blood flow and temperature and cauda epididymal sperm concentrations and motility. *J Androl* **1986**; 7: 271-276.
74. **Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T.** Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *BioRepr.* **1999** 61: 393-399.

75. **Inamura, K., Sano, Y., Mochizuki, S., Yokoi, H., Miyake, A., Nozawa, K., Kitada, C., Matsushime, H., Furuichi, K., 2003.** Response to ADP-ribose by activation of TRPM2 in the CRI-G1 insulinoma cell line. *J. Membr. Biol.* 191, 201-207.
76. **Jarrow JP and Sanzone JJ.** Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol* **1992**; 148: 1805-1807.
77. **Kadioğlu A, Çayan S, Aydos K, Aşçı R, Alıcı B.** Türk Androloji Derneği Yayınları Varikosel Kılavuzu. İstanbul, **2004**; 1-15
78. **Kass E J, Belman A B.** Reversal of testicular growth by varicocele ligation. *J Urol*, 1997;137:145
79. **Kass EJ, Stork BR, Steinert BW.** Varicocele in adolescence induces left and right testicular volume loss. *BJU Int.* **2001**; 87: 499-501.
80. **Kass EJ.** Adolescent varicocele. *Pediatric Clinics of North America* **2001**; 48:934-940.
81. **Kendirci M, Miroğlu C.** Varikosel Patofizyolojisi: Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi (Editörler: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B ve ark.). Türk Androloji Derneği yayını, İstanbul, **2004**; 427-439.
82. **Kohler FP:** On the etiology of varicocele. *J Urol* **1967**; 97: 741-742.
83. **Köksal IT, Usta M, Orhan I, et al:** Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl.* 5: 95-99, **2003**.
84. **Kumagai A, Kodama H, Kumagai J, et al.** Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod* **2002**; 8(2):118-23.
85. **Kursh Gülcü D.** Tip 1 diabetes mellitus hastalarında D vitamini düzeyleri., T.C. sağlık bakanlığı Bakırkoy kadın doğum ve çocuk hastalıkları eğitim ve araştırma hastanesi çocuk kliniği, Uzmanlık tezi, 63 sayfa, İstanbul, **2011** (Doç. Dr. S. Erdal Adal).
86. **Kusano C, Frerari B.** Total antioxidant capacity: a biomarker in biomedical and nutritional studies. *Journal of cell and molecular biology*, 2008;7:1-15.
87. **Kwieceński GG, Petrie GI & DeLuca HF.** Vitamin D is necessary for reproductive functions of the male rat. *Journal of Nutrition* (**1989**) 119 741–744.
88. **Lewis SE, Sterling ES, Young IS, et al:** Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. *Fertil Steril.* 67: 142-7, **1997**.
89. **Li H, Dubocq F, Jiang Y et al.** Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology* **1999**; 53: 1258-1262.
90. **Lin AM, Chen KB, Chao PL.** Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann N Y Acad Sci* **2005**; 1053: 319-329.
91. **Lipschultz LI, Corriere JN.** Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *JUrol* **1977**;117:175-180.
92. **Lund L, Nielsen KT.** Varicocele, testis and testicular temperature. *Br J Urol* 1996; 78: 113-115.
93. **MacLeod J.** The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* **1943**; 138: 512–518.
94. **Marmar JL.** Varicocele and male infertility: part II. *Hum Rep Update* **2001**; 7(5):461-472.
95. **Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C.** Novel mechanism of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *J Nutr Biochem* **2005**; 16 10:577-86
96. **Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro N,** Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem* **1999**; 32 8:595–603
97. **Mc Cord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem* **1969**; 244 22:6409–55
98. **Mckemy DD,Neuhausser WM, Julius D.** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature.* 2002;416:52-58.
99. **Menegaz D, Rosso A, Royer C, Leite LD, Santos AR & Silva FR.** Role of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D3 on a-[1-(14)C]MeAIB accumulation in immature rat testis. *Steroids* (**2009**) 74 264–269. (doi:10.1016/j.steroids.2008.11.015)
100. **Mieusset R, Bujan L:** Testicular heating and its possible contribution to male infertility: a review. *Int J Androl* **1995**; 18:169-184.
101. **Miller BA.** The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol.* **2006**;209(1):31-41.
102. **Mobasheri A, Barrett-Jolley R.** Transient receptor potential channels: Emerging roles in health and disease. *Vet J.* 2011;187(2):145-6
103. **Montell C, Birnbaumer L, Flockerzi V (2002)** The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108(5):595–598. doi:10.1016/S0092-8674(02)00670-0

104. **Montell C.** The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*. **2005a**;22;2005a;(272):re3
105. **Montell C.** TRP channels in Drosophila photoreceptor cells. *J Physiol*. **2005b**;15;567(Pt 1):45-51.
106. **Moran MM, Xu H, Clapham DE (2004)** TRP ion channels in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 14(3):362–369. doi: 10.1016/j.conb.2004.05.003
107. **Mostafa T, Anis TH, El-Nashar A, et al:** Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. *Int J Androl*. 24: 261-265, **2001**.
108. **Naughton CK, Nangia AK and Agarwal A.** Varicocele and male infertility: Part II. *Hum Rep Update* **2001**; 7(5): 473-481
109. **Naziroglu, M.,** 2007b. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res*. 32, 1990-2001
110. **Naziroglu, M., Lückhoff, A., Jungling, E., 2007.** Antagonist effect of flufenamic acid on TRPM2 cation channels activated by hydrogen peroxide. *Cell. Biochem Funct*. 25, 383-387
111. **Naziroglu, M., 2011.** TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: Where are we now? *Neurochem. Res*. 36, 355-366.
112. **Nieschlag E, Hertle L, Fischedick A, Behre HM.** Treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod* **1995**; 10 (2): 347-353.
113. **Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA.** Transient Receptor Potential cation channels in disease. *Physiol Rev*. **2007**;87 ; 165-217.
114. **Nilius, B.,** 2007. TRP channels in disease. *Biochem Biophys. Acta*. 1772, 805-812.
115. **Nilius, B., Owsianik, G., Voets, T., Peters, J.A.,** 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol. Rev*. 87, 165-217.
116. **Nishiyama H, Danno S, Kaneko V et at.** Decreased expression of cold-induced RNA binding proteins (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am J Path* **1998**; 152:289-296.
117. **Ohana, L., Newell, E.W., Stanley, E.F., Schlichter, L.C.,** The Ca²⁺ release activated Ca²⁺ current (ICRAC) mediates store-operated Ca²⁺ entry in rat microglia. *Channels*. 3, 129-139./ **2009**
118. **Oktar T, Ahmedov İ, Kadioğlu A.** Varikosel Tedavisi. “Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi”. Türk Androloji Derneği Yayını, İstanbul **2004**; 37: 463-472
119. **Onur R, Semercioz A, Orhan I, Yekeler H.** The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urol Res* **2004** 32: 204-8.
120. **Oster J.** Varicoceles in children and adolescents. *Scan J Urol Nephrol* **1973**; 5: 27-32
121. **Özbey İ, Ziypak T, Adanur Ş.** Vitamin D ve üreme sistemi. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2012; 8: 134-7.
122. **Özgül C, Naziroğlu M. (2010)** Nörolojik hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri. *J. Exp. Clin. Med.*, 2010; 27:144-15.
123. **Pablo martinez-lo Pezclaudia L., Treviñ O., Jose'luis de la Vega-Beltra N., Gerardo de B., Esteban M., Carmen B., Gerardo O., Gerard M., Gibbs, moira k., Bryan O.,** TRPM8 in Mouse Sperm affects Temperature Changes and May Influence the Acrosome Reaction. *J. Cell. Physiol*. 226: 1620–1631, **2011**.
124. **Pan Z, Yang H, Reinach PS.** Transient receptor potential (TRP) gene superfamily encoding cation channels. *Hum Genomics*. 2011;5(2):108-16.
125. **Paduch DA,** Skoog Sj: Current management of adolescent varicocele. *Rev Urol* **2001**; 3 3:120-33
126. **Pecker R, Abramsson L, Marklund SL.** Superoxide dismutase isoenzymes in human seminal plasma and spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **1997**; 3 12:1061-6
127. **Perraud, A.L., Schmitz, C., Scharenberg, A.M., 2003.** TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function. Perraud, A.L., Schmitz, C., Scharenberg, A.M., 2003. TRPM2 Ca²⁺ permeable cation channels: from gene to biological function.
128. **Proudfoot CJ, Garry EM, Cottrell DF, Rosie R, Anderson H, Robertson DC, Fleetwood-Walker SM, Mitchell R.** Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr Biol* 16: 1591–1605, 2006.
129. **Prosser DE, Jones G.** Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci*. 2004; 29: 664–673.
130. **Ross MH, Pawlina W.** Histology a Text and Atlas. 5th ed. Philadelphia, Saunders, **2006**.
131. **Salama N, Bergh A Damber JE.** The changes in testicular vascular permeability during progression of the experimental varicocele. *Eur Urol* **2003**; 43: 84-91.

132. **Salum E, Kals J, Kampus P, Salum T, Zilmer K, Aunapuu M, et al.** Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic Wall and systemic oxidative stress in diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract.* **2013**;100(2): 243-9.
133. **Saygın M, Nazıroğlu M.** TRPM2 katyon kanalları aktivasyonunda rol alan moleküler mekanizmalardaki son gelişmeler. *Journal of Experimentel and Clinical Medicine.* 2010;27: 42-45
134. **Saypol DC, Howards SS, Turner TT et al.** The influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* **1981**; 68: 39-45.
135. **Stein RJ, Santos S, Nagatomi J et al** (2004) Cool (TRPM8) and hot (TRPV1) receptors in the bladder and male genital tract. *J Urol* 172(3):1175–1178. doi:10.1097/01.ju.0000134880.55119.cf
136. **Shafik A, Moftah A, Olfat S et al:** Testicular veins: anatomy and role in varicocelegenesis and other pathologic conditions. *Urology* **1990**; 35(2): 175-182.
137. **Shafik A, Moftah A, Olfat S, Mohi-el-Din M, el-Sayed A.** Testicular veins: anatomy and role in varicocelegenesis and other pathologic conditions. *Urology* 35: 175-182, 1990.
138. **Shafik A.** Venous tension patterns in cord veins II after varicocele correction. *J Urol* **1983**; 129: 749-751
139. **Sharpe RM.** Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 1984; 30(1): 29-49.
140. **Sharlip ID, Jarow JP, Bekler AM.** AUA Best practice policy. Report on varicocele and infertility. American Urological Association Inc, Baltimore, MD, USA. **2001**.
141. **Shi Y, Lafontaine C, Berube M.** Determination of Bisphenol A in Infant Formula by Automated Sample Preparation and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Thermo Fisher Scientific, Franklin, MA, USA, **2009**.
142. **Sigman M, Howards SS,** Male infertility. In: Walsh PC, Retik AB, Vaugh ED, Wein AJ, ed. *Campbell's Urology.* Saunders, **1997**: 1317-8
143. **Snydle, F.E, Cameron D.F.** Surgical induction of varicocele in the rabbit. *J.Urol* **1983**;130:1005-1009
144. **Swerdloff RS and Walsh PC.** Pituitary and gonadal hormones in patients with varicoceles. *Fertil Steril* **1975**; 26: 1006-1012.
145. **Tanji N, Fujiwara T, Kaji H, Nishio S, Yokoyama M.** Histologic evaluation of spermatic veins in men with varicoceles. *Int J Urol* **1999**; 6 7:355-60
146. **Tekcan M.** Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. *İnfertilite* **2001**;3:131-136.
147. http://www.slideshare.net/subhajithajra/histology-of-male-reproductive-system-fa2214-2f32-4c22-872d-e9ce6e6d18bb&v=qf1&b=&from_search=5
148. **Özgül C, Nazıroğlu M.** Nörolojik hücrelerde TRPM2 katyon kanallarının moleküler mekanizmalardaki rolleri. *J. Exp. Clin. Med.* 2010; 27:144-151.
149. **Thebault S, Lemonnier L, Bidaux G, Flourakis M, BavencoffeA, Gordienko D, Roudbaraki M, Delcourt P, Panchin Y, ShubaY, Skryma R, Prevarskaya N. (2005).** Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in Incaphuman prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 280: 39423–39435,
150. **Thomas JC, Elder JS.** Testicular growth arrest and adolescent varicocele: does varicocele size make a difference. *J Urol.* **2002**; 168:1689-1691
151. **Tres LL, Kierszenbaum AL.** Cell death patterns of the rat spermatogonial cell progeny induced by Sertoli cell geometric changes and Fas (CD95) agonist. *Dev Dyn* **1999**; 214:361-371.
152. **Tsavalier L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. 2001.** Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 61:3760–3769.
153. **Turek PJ, Lipshultz LI.** The Varicocele controversies : Etiology and Pathophysiology. *AUA Update Series*, 1995;14:106 – 111.
154. **Turner TT and Lopez TJ:** Testicular blood flow in peri-pubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to a unilateral lesion. *J Urol* **1990**; 144: 1018-1021.
155. **Turner TT, Brown KJ and Spann CL.** Testicular intravascular volume and microvessel mitotic activity: effect of experimental varicocele. *J Androl* **1993**; 14: 180-186.
156. **Turner TT, Jones CE and Roddy MS.** Experimental varicocele does not affect the blood-testis barrier, epididymal electrolyte concentration or testicular blood gas concentration. *Biol Reprod* **1987**; 36: 926-932.

157. **Turner TT, Miller DW.** Protein synthesis and secretion by the rat seminiferous tubule in vivo not affected by experimental varicocele. *J Urol.* **1996**; 156(5): 1881-1887.
158. **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **2007**; 39: 44-84.
159. **Vanni VS, Vignano P, Somigliana E.** Vitamin D and assisted reproduction Technologies: current concept. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2014; 12: 47.
160. **Varikosel Kılavuzu,** Türk Androloji Derneği Yayınları, **2004**: 29-35.
161. **Venkatachalam K, Montell C.** TRP channels. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:387-417.
162. **Virgil P, Wohler C, Bustos-Obregon E et al.** Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* **1994**; 26: 55-60.
163. **Vlachos GD, Bartzeliotou A, Schulpis KH, Partsinevelos GA, Lazaropoulou C, Papadima C, et al.** Maternal-neonatal serum paraoxonase 1 activity in relation to the mode of delivery. *Clin Biochem* **2006**;39: 923-8.
164. **Wang YX, Lei C, Dong SG, et al.** Study of bilateral histology and meiotic analysis in men undergoing varicocele ligation. *Fertil Steril* **1991**; 55 1:152-5
165. **Wang Q.** Mechanistic Study of the Transient Receptor Potential Melastatin 2 (TRPM2)- Ca²⁺ Signaling in ROS Induced Switch between Apoptosis and Autophagy. Ph.D Thesis The University of Hong Kong October 2014.
166. **Wehage, E., Eisfeld, J., Heiner, I., Jüngling, E., Zitt, C., Lückhoff, A., (2002).** Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J. Biol. Chem.* 277, 23150-23156.
167. **White JH.** Vitamin D Signaling, Infectious Diseases, and Regulation of Innate Immunity. *Infect Immun.* **2008**;76(9):3837-3843.
168. **WHO.** The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting infertility clinics. *Fertil Steril* **1992**; 57: 1289-1293.
169. **Wiesman H.** Vitamin D is a membrane antioxidant, ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol and tamoxifen and relevance to anticancer action *FEBS Lett.* **1993**;326(1-3): 285-8.
170. **Wishahi MM.** Detailed anatomy of the internal spermatic vein and the ovarian vein. Human cadaver study and operative spermatic venography: clinical aspects. *J Urol* **1991**;145(4):780-4.
171. **Witt MA and Lipshultz LI.** Varicocele: a progressive or static lesion? *Urology* **1993**; 42: 541-543.
172. **Wyrsh P, Blenn C, Bader J, Althaus FR.** Cell death and autophagy under oxidative stress: roles of poly(ADP Ribose) polymerases and Ca(2+). *Mol Cell Biol* 2012; 32 (17): 3541-3553.
173. **Yang XR, Lin MJ, McIntosh LS et al (2006)** Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid- related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(6):L1267– L1276. doi:10.1152/ajplung.00515.2005
174. **Yılmaz M, Yılmaz N.** D Vitamininin beyindeki rolü ve ilişkili nörolojik hastalıklar. *Journal of Clinical and Experimental Investigations. JCEI /* 2013; 4: 411-415.
175. **Zhang L, Barritt GJ. (2004).** Evidence that TRPM8 is an androgen-dependent Ca²⁺ channel required for the survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* 64: 8365–8373,
176. **Zorgniotli AW, MacLeod J:** Studies in the temperature, human semen quality and varicocele. *Fertil Steril* **1973**;24:295-301.

ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep te tamamladı. 2010 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü kazandı ve 2014 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.

