

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

VARİKOSELLİ HASTALARDA
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM
KULLANARAK SPERMLERDEKİ APOPTOZİSİN
SAPTANMASI VE APOPTOZİS İLE SPERM
PARAMETRELERİ, SERUM VE SEMİNAL
PLAZMADAKİ TAS-TOS SEVİYELERİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şükrü AKMEŞE

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mete KÖKSAL

ŞANLIURFA

2016

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

VARİKOSELLİ HASTALARDA
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM
KULLANARAK SPERMLERDEKİ APOPTOZİSİN
SAPTANMASI VE APOPTOZİS İLE SPERM
PARAMETRELERİ, SERUM VE SEMİNAL
PLAZMADAKİ TAS-TOS SEVİYELERİ ARASINDAKİ
İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şükrü AKMEŞE

DANIŞMAN

Doç. Dr. Mete KÖKSAL

Bu tez, Harran Üniversitesi Fon Saymanlığı tarafından 15161 proje numarası ile desteklenmiştir.

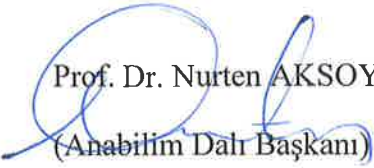
ŞANLIURFA


2016

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Şükrü AKMEŞE'nin hazırladığı “Varikoselli Hastalarda İmmünohistokimyasal Yöntem Kullanarak Spermlerdeki Apoptozisin Saptanması ve Apoptozis ile Sperm Parametreleri, Serum ve Seminal Plazmadaki Tas-Tos Seviyeleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması” konulu çalışması 06.06.2016 tarihinde jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Mete KÖKSAL (Danışman)
Harran Üniversitesi


Prof. Dr. Nurten AKSOY
(Anabilim Dalı Başkanı)
Harran Üniversitesi
ÜYE


Prof. Dr. Seyithan TAYSI
Gaziantep Üniversitesi
ÜYE


08.2016
Prof. Dr. Mustafa DENİZ
SAĞLIK BİL. ENST. MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi, deneyim ve desteklerini esirgemeyen tez danışman hocam Doç. Dr. Mete KÖKSAL'a şükranlarımı sunarım.

Örneklerimin çalışılmasında ve istatistiksel analizlerinin yapılmasında emeği geçen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, öğretim elemanlarına ve laboratuvar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Örneklerin toplanması ve saklanmasında emeği geçen Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Hastanesi yöneticileri başta olmak üzere Üroloji Polikliniği ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, değerli arkadaşlarım M. Ali AKTAŐ ve Seyithan GÜNEŞ'e teşekkür ederim.

Beni yetiőtirip bugünlere getiren çok değerli annem, babam ve kardeşlerime sevgi saygılarımı sunarım.

Şükrü AKMEŞE

2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKÜRLER.....	İ
İÇİNDEKİLER.....	İİ
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
TABLolar DİZİNİ.....	İX
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	X
ÖZET	XII
ABSTRACT	XIV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek Genital Sistemi.....	3
2.1.1. Testis.....	3
2.1.1.1. Seminifer Tübüller.....	4
2.1.1.1. Sertoli Hücreleri	5
2.1.1.2. Spermatogenez	7
2.1.1.2.1. Spermiyogenez	8
2.1.1.3. İnterstisyel Doku.....	9
2.1.2. Genital Kanallar.....	10
2.1.3. Yardımcı Genital Bezler	10
2.1.4. Penis	11
2.2. Varikosel.....	11
2.2.1. Varikosel İnsidansı	12
2.2.2. Varikosel Etiyolojisi	12
2.2.3. Varikosel Patofizyolojisi	12
2.2.3.1. Hipertermi.....	13
2.2.3.2. Venöz Basınç.....	13
2.2.3.3. Renal-Adrenal Reflü.....	14
2.2.3.4. Hormonal Disfonksiyon	14
2.2.3.5. Otoimmünite.....	14
2.2.3.6. Akrozom Reaksiyonu	15
2.2.3.7. Apoptozis.....	15
2.2.3.8. Oksidatif Stres	16

2.2.3.9. Testiküler Kan Akımı	16
2.2.3.10. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi	17
2.2.4. Varikoselde Semptom, Tanı ve Tedavi	17
2.3. Apoptozis.....	18
2.3.1. Apoptozisin Görüldüğü Hücre Çeşitleri	19
2.3.2. Apoptozisin Morfolojisi	19
2.3.3. Apoptozis ile Nekrozis Arasındaki Farklar	20
2.3.4. Apoptozis Mekanizmaları.....	21
2.3.4.1. İntrensek (mitokondriyal) Yolak	22
2.3.4.2. Ekstresek Yolak (Ölüm reseptör yolağı).....	24
2.3.5. Apoptozisin Mediatorleri.....	25
2.3.5.1. Kaspaz Ailesi.....	25
2.3.5.1.1. Kaspazların Sınıflandırılması	25
2.3.5.1.2. Kaspazların Aktivasyonu.....	27
2.3.5.1.3. Kaspaz-3	27
2.3.5.2. Kalsiyum	28
2.3.5.3. Bcl-2 Ailesi	28
2.3.5.4. p53.....	29
2.3.5.5. Sitokrom C.....	29
2.3.5.6. AIF.....	29
2.3.5.7. Endonükleaz G	29
2.3.5.8. Granzim	30
2.3.6. Apoptozu Belirleme Yöntemleri	30
2.3.6.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	30
2.3.6.1.1. Işık Mikroskobu.....	30
2.3.6.1.2. Floresan mikroskopu / Lazerli konfokal mikroskop.....	30
2.3.6.1.3. Elektron Mikroskobu	30
2.3.6.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu	31
2.3.6.2. Histokimyasal Yöntemler	31
2.3.6.2.1. Anneksin V Yöntemi	31
2.3.6.2.2. Tunel Yöntemi.....	31
2.3.6.2.3. M30 Yöntemi.....	31
2.1.6.2.4. Kaspaz-3 Yöntemi	31

2.3.6.3. Biyokimyasal Yöntemler	31
2.3.6.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi	31
2.3.6.3.2. Western Blotting	32
2.3.6.3.3. Flow Sitometri	32
2.3.6.4. İmmunolojik Yöntemler	32
2.3.6.4.1. Elisa	32
2.3.7. Spermatogenez ve Apoptozis	32
2.4. Oksidatif Stres	33
2.4.1. Serbest Radikaller	33
2.4.2. Oksijen Türevi Bileşikler	34
2.4.3. Serbest Oksijen Radikalleri	35
2.4.3.1. Hidroksil Radikali	35
2.4.3.2. Süperoksit Radikali	35
2.4.3.3. Hidrojen Peroksit Radikali	36
2.4.3.4. Singlet Oksijen	36
2.4.3.5. Peroksil Radikali	36
2.4.3.6. Nitrik Oksit	36
2.4.4. Reaktif Oksijen Radikallerinin Kaynakları	37
2.4.4.1. Endojen Kaynaklar	37
2.4.4.1.1. Elektron Transport Zinciri	37
2.4.4.1.2. Fagositoz	37
2.4.4.1.3. İskemi-reperfüzyon	38
2.4.4.1.4. Diğer	38
2.4.4.2. Ekzojen Kaynaklar	39
2.4.5. Oksijen Radikallerin Etkileri	39
2.4.5.1. Serbest Radikallerin Lipit Yapılar Üzerine Etkisi	39
2.4.5.2. Serbest Radikallerin Protein Yapılar Üzerine Etkisi	40
2.4.5.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkisi	41
2.4.5.4. Serbest radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkisi	41
2.4.6. Antioksidanlar	41
2.4.6.1. Endojen Antioksidanlar	41
2.4.6.1.1. Enzim Olan Endojen Antioksidanlar	42
2.4.6.1.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar	43

2.4.6.2. Eksojen Antioksidanlar.....	45
2.4.6.2.1. Vitamin Olarak Eksojen Antioksidanlar	45
2.4.6.2.2. İlaç Olarak Kullanılan Eksojen antioksidanlar	46
2.4.7. Antioksidanların Etki Mekanizması	46
2.4.8. Spermde ROS Oluşması	46
2.5. Sperm Analizi (Spermiyogram)	47
2.5.1. Semen (Ejakülât)	48
2.5.2. Likefaksiyon (Sıvılaşma).....	48
2.5.3. Sperm Motilitesi (Hareketlilik)	48
2.5.4. Vitalite	49
2.5.5. Hacim	49
2.5.6. Renk.....	49
2.5.7. PH	49
2.5.8. Vizkozite.....	49
2.5.9. İdeal Spermatozoonların Değerlendirilmesi	50
2.5.10. Sperm Malformasyonlarının Tipleri.....	51
2.5.11. Ejakülât Değerlendirilmesinde Terminoloji	52
3. GEREÇ VE YÖNTEM	53
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	53
3.2. Semen Örneğinin Alınması	54
3.3. Hasta ve Sağlıklı Grubun Seçimi	55
3.4. Spermiyogram	55
3.5. İmmünohistokimyasal İnceleme	55
3.5.1. Spermilerin boyamaya Hazırlanması.....	55
3.5.2. Tespit ve Permeabilizasyon	55
3.5.2.1. Metanolle ve asetonla tespit	55
3.5.2.2. Saklama	56
3.5.2.3. İmmünfluoresan Boyama	56
3.6. Boyamaların Değerlendirilmesi.....	56
3.7. İnsan Sperminde Kaspaz-3 Boyama	57
3.8. Biyokimyasal İnceleme	58
3.8.1. Serum ve Seminal Plazmanın Toplanması ve Saklanması	58
3.8.2. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü	58

3.8.3. Total Oksidatif Stres (TOS) Ölçümü.....	59
3.8.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümü.....	59
3.9. Yapılan İstatistiksel Analizler	59
4.BULGULAR	60
5. TARTIŞMA.....	68
6. SONUÇ	72
7. KAYNAKLAR.....	73
8. EKLER	88
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	88
ANAMNEZ FORMU	93
ETİK KURUL KARARI	94



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Erkek genital sistemi	3
Şekil 2. Erkek genital sisteme ait kanallar	4
Şekil 3. Çevreleyen dokuyla birlikte seminifer tübülün bir parçası	5
Şekil 4. Kan-testis bariyeri ve kompartmanların oluşumu	6
Şekil 5. Spermatogenik hücrelerin klonal özelliğini gösterimi	8
Şekil 6. Spermiyogenez süresince spermatidlerin değişimi	9
Şekil 7. Testiste varikozel görünümü	11
Şekil 8. Apoptozisde görülen morfolojik değişimler	20
Şekil 9. Apoptozom oluşumu ve aktif kaspaz-9 oluşumu	22
Şekil 10. Hücre çekirdeğindeki nükleozomların parçalara bölünüşü	23
Şekil 11. İntrensek yolak	23
Şekil 12. FADD'ın yapısı	25
Şekil 13. Kaspaz kaskadı	26
Şekil 14. İnsan kaspaz ailesi	26
Şekil 15. Prokaspaz ve aktif kaspazın yapısı	27
Şekil 16. Bcl-2 ailesinin üyeleri	28
Şekil 17. Oksidatif denge	33
Şekil 18. Oksijen molekülünün elektron sayısı ve oluşan oksidan moleküller	34
Şekil 19. Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipit peroksidasyon ürünleri.	40
Şekil 20. Normal spermin bölümleri.	50
Şekil 21. Sperm baş defektleri.....	51
Şekil 22. Sperm boyun defektleri.	51
Şekil 23. Sperm kuyruk defektleri.....	51

Şekil 24. Sperm mid-piece kısmında yoğun yeşil fluoressan görünümü (1 puan)	57
Şekil 25. Işık mikroskobu ile spermlerin görünümü (şekil 24 ile aynı alan)	58
Şekil 26. Varikoselli grup ile sağlıklı grubun İB Kaspaz-3, % boyamalarının dağılım, ortalama ve standart sapma grafiği	64
Şekil 27. Varikoselli grup ile sağlıklı grubun OSI seviyesinin dağılım, ortalama ve standart sapma grafiği	64
Şekil 28. Varikoselli grup ile sağlıklı grubun İB Kaspaz-3, % ile OSI'nin Scatter analiz.....	65
Şekil 29. Kaspaz-3'ün boyanmasının gösterimi (x100 Büyütme) (kalın ok 2, ince ok 1 puan)	65
Şekil 30. Şekil 29'daki sperm hücrelerinin DAPI ile boyanan çekirdekleri	66
Şekil 31. Anormal morfoloji gösteren sperm hücresi (2 puan)	66
Şekil 32. Şekil 31'de gösterilen sperm hücresinin DAPI İle boyanan çekirdeği (2 puan).....	67

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Apoptozis ve Nekrozis arasındaki farklar	21
Tablo 2. Semen analizi normal değerleri	47
Tablo 3. Sperm hücrelerinin boyanma yeri ve skoru.....	57
Tablo 4. Varikoselli ve sağlıklı grubun seminal plazma örneklerindeki TAS, TOS ve OSİ düzeyleri	60
Tablo 5. Varikoselli ve sağlıklı grubun serum örneklerindeki TAS, TOS ve OSİ düzeyleri ..	60
Tablo 6. Varikoselli ve sağlıklı grubun spermiyogram sonuçları ve yaşları	61
Tablo 7. Varikoselli ve sağlıklı grubun sperm örneklerinde Kaspaz-3'ün İB sonuçları	61
Tablo 8. Varikoselli grubun seminal plazmalarındaki TAS, TOS ve OSİ ile Kaspaz-3'ün korelasyonu.....	62
Tablo 9. Varikoselli grubun spermiyogram parametreleri ile Kaspaz-3'ün Korelasyonu.....	62
Tablo 10. Sağlıklı grubun seminal plazmalarındaki TAS, TOS ve OSİ ile Kaspaz-3'ün korelasyonu	63
Tablo 11. Sağlıklı grubun sperm örneklerinde spermiyogram ile Kaspaz 3'ün korelasyonu ..	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APAF-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ASA	Antisperm Antikor
CAD	Kazpazla Akif Olan DNaz
CAT	Katalaz
DD	Death Domain
DDF 40	DNA Fragmentation Factor 40
DISC	Death Inducing Signaling Complex
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ENOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
FADD	Fas-Associating Protein with Dead Domain
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone
GSH	Glutasyon
GSH-PX	Glutasyon Peroksidaz
GSH-Red	Glutasyon Redüktaz
GST	Glutation-S-Transferaz
HOCI	Hipoklorid Asit
IAP	Inhibitor of Apoptosis
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease
İB	İmmün Boyama
İHC	İmmünohistokimyasal
kDa	Kilo Dalton
LOO•	Lipit Peroksil Radikali
MDA	Malondialdehit

NO	Nitrik Oksit
NuMA	Nuclear Mitotic Apparatus
O₂	Oksijen
O₂^{·-}	Süperoksit Radikali
OH⁻	Hidroksil radikali
PARP	Poli ADP Riboz Polimeraz
PS	Fosfatidil Serin
PT	Permeability Transition Pore
PUFA	Poliansatüre Yağ Asiti
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAS	Toplam Antioksidan Seviye
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TOS	Toplam Oksidan Seviye
TUNEL	Terminal d-UTP Nick-End Labeling
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

VARİKOSELLİ HASTALARDA İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM KULLANARAK SPERMLERDEKİ APOPTOZİSİN SAPTANMASI VE APOPTOZİS İLE SPERM PARAMETRELERİ, SERUM VE SEMİNAL PLAZMADAKİ TAS-TOS SEVİYELERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI

Şükrü AKMEŞE

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Pampiniform pleksustaki testiküler venlerin anormal genişlemesi olarak tanımlanan varikozel çoğunlukla etkilenen testisin hacminde bir azalma ile ilişkilidir. Bugün varikozelin gerçekte üreme sistemine ne kadar hasar verdiği bunun oluşma mekanizması üzerine çok sayıda tartışma vardır. Varikozel erişkin erkeklerin yaklaşık %15 kadarında bulunur. Bununla birlikte, primer infertiliteli erkeklerin %35'inde ve sekonder infertiliteli erkeklerin %80'inde belirgin varikozel bulunur. Bu iki duruma göre varikozel erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden biridir ve fertilitede ilerleyen bir azalmaya sebep olur.

En sık düzeltilebilir infertilite sebebi olan varikozelde spermatogenezin hangi mekanizma ile bozulduğu tam olarak bilinmemektedir. Programlı hücre ölümü ya da apoptozis, hücrelerde fizyolojik bir oranda gerçekleşebilir ancak farklı patolojik durumlarda artan veya azalan oranlarda bulunabilir. Bu çalışmada varikozelli hastalarda apoptosiz markırı olan kaspaz-3 seviyesi ile oksidatif stres ve sperm parametreleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamıza, varikozel tanısı almış 40 hasta ve 40 sağlıklı birey dahil edildi. Alınan sperm örneklerinde immün boyama yöntemiyle kaspaz-3 varlığı değerlendirildi. Seminal plazma ve kan örneklerinde total antioksidan ve total oksidan seviyeleri spektrofotometrik yöntemle otoanalizörde ölçüldü. Her iki sonuç kullanılarak OSİ değeri hesaplandı.

Çalışmamız sonucunda, TAS seviyesi varikozelli grubunda ($0,93 \pm 0,28$) sağlıklı gruba ($1,19 \pm 0,27$) oranla düşük bulundu ($p < 0,001$). TOS seviyesi ise varikozelli grupta ($8,32 \pm 1,97$) sağlıklı gruba ($7,25 \pm 1,81$) kıyasla yüksek bulundu ($p = 0,013$). OSİ seviyesi de sağlıklı gruba ($0,63 \pm 0,22$) kıyasla varikozelli grupta ($1,01 \pm 0,48$) yüksek bulundu ($p < 0,001$). Apoptozis belirteci olan kaspaz-3, varikozelli grupta ($14,27 \pm 26,63$) kontrol

grubuna ($25,51 \pm 30,70$) oranla düşük bulundu ($p=0,028$). Spermiyogram parametrelerinden ileri hareket ($33,00 \pm 19,50$), toplam hareket ($45,50 \pm 27,0$) ve morfoloji ($7 \pm 5,0$) varikoselli grupta kontrol grubuna oranla düşük bulundu ($p<0,001$). Hareketsizlik ($54,50 \pm 27,0$) ise varikoselli grupta yüksek bulundu ($p<0,001$).

Bulgularımız ışığında varikoselli hasta grubunda artmış olan oksidatif stresin antioksidanları tüketerek total antioksidan seviyenin düşmesine neden olduğunu ve ayrıca muhtemelen apoptozisinde bu hastalarda düşük bulunmasına katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Varikosel, Apoptozis, Oksidatif stres, Spermiyogram, İmmün boyama



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN APOPTOSIS, SPERM PARAMETERS, TAS-TOS LEVELS IN SERUM AND SEMINAL PLASMA AND DETECTION OF APOPTOSIS IN SPERM USING IMMUNOHISTOCHEMICAL METHOD IN PATIENTS WITH VARICOCELE

Şükrü AKMEŞE

The Department of Biochemistry (Medical), Master Thesis

Varicocele, defined as an abnormal dilation of the testicular veins in the pampiniform plexus, is often associated with a reduction in the volume of the affected testicle. Today there is much debate about how much the varicocele actually damages the reproductive system and the mechanism through which this occurs. Varicocele is present in around 15% of the adult male population. However, 35% of men with primary infertility and 80% of men with secondary infertility present palpable varicoceles. This leads to two assumptions: varicocele is an important cause of male infertility and it causes a progressive decrease in fertility status.

Although varicocele is the most common correctable cause of infertility, it was not completely known by which mechanism the spermatogenesis is impaired in varicocele. Programmed cell death or apoptosis can occur in cells in a physiological rate, but may in an increasing or decreasing rate in different pathological situations. In the present study, we aimed to investigate the relationship between Caspase-3, which is marker of apoptosis, sperm parameters and oxidative stress.

In our study, 40 patients with a diagnosis of varicocele and 40 healthy individuals were included. By immunostaining presence of caspase-3 in the received sperm samples were evaluated. Total oxidant and Total antioxidant levels in seminal plasma and blood samples were measured by the spectrophotometric method in autoanalyzer. Using both results were calculated the OSI value.

In our study, the level of the TAS in varicocele group ($0,93 \pm 0,28$) compared to the healthy group ($1,19 \pm 0,27$) was lower ($p < 0,001$). The level of the TOS in varicocele group ($8,32 \pm 1,97$) compared to the healthy group ($7,25 \pm 1,81$) was higher ($p = 0,013$). Level of OSI compared to the healthy group ($0,63 \pm 0,22$) was higher in the group with varicocele ($1,01 \pm 0,48$) ($p < 0,001$). Caspase-3 of the apoptosis markers compared to the healthy group ($25,51 \pm$

30,70) was lower in the group with varicocele ($14,27 \pm 26,63$) ($p=0,028$). Forward movement ($33,00 \pm 19,50$), total movement ($45,50 \pm 27,0$) and morphology ($7 \pm 5,0$) of the semen parameters in varicocele group compared to the healthy group was lower ($p<0,001$). Inactivity (54.50 ± 27.0) was higher in the varicocele group ($p <0.001$).

Our findings have shown that the increased amount of oxidative stress in the patients with varicocele has caused decrease in total antioxidant level by consuming the antioxidants, also it has probably contributed to the low apoptosis level in these patients.

Key words: Varicocele, Apoptosis, Oxidative stress, Spermogram, Immunostaining



1. GİRİŞ

Varikosel, pampiniform pleksustaki testiküler venlerin patolojik dilatasyonu olarak tanımlanmıştır. Yetişkin ve ergenlik dönemindeki erkek popülasyonunun %15'inde varikosel görülmektedir. Bu popülasyon primer infertiliteli erkeklerin %35'ini, sekonder infertiliteli erkeklerin ise %80'ini kapsamaktadır.

Günümüzde varikosel ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, infertilite ve testiküler disfonksiyona neden olan varikoselin patogenetik mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla birlikte; testiküler sıcaklığın yükselmesi, hipotalamik gonadal dengenin bozulması, renal ya da adrenal kökenli toksik metabolitlerin çıkışı ve testiküler hipoksi gibi bazı mekanizmalar öne sürülmüştür.

Erkek infertilitesinde oksidatif stresin rolünü değerlendiren son çalışmalar, varikoselli infertil erkeklerin yüksek seviyede sperm-kökenli reaktif oksijen türlerine (ROS) sahip olduğunu göstermiştir. Varikoselli hastalarda yüksek düzeyde seminal oksidatif stresin varlığı, bu bireylerin semenlerinde ROS düzeylerindeki artışın ve toplam antioksidan seviyesindeki (TAS) azalmanın gösterildiği birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Böylece, sperm disfonksiyonu bulunan varikoselli hastaların spermatogenez bozukluklarının oksidatif stresle ilişkili olduğu kanısına varılmaktadır. Düşük seviyelerde ROS; kapasitasyon, hiperaktivasyon, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyonu gibi normal sperm fonksiyonlarını düzenlerken, ROS'un aşırı üretimi oksidatif strese neden olabilir ve spermatozodaki patofizyolojik değişiklikleri indükleyebilir. Spermatozodaki ROS ile ilişkili olarak; hücre membranının peroksidatif hasarı, sperm motilitesinin bozulması ve DNA'nın oksidatif harabiyeti gerçekleşmektedir.

Varikoselli testislerde oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucu gelişen oksidatif stresin, spermatogenez üzerinde önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Varikoselli hastaların testislerinde lipid peroksidasyon ürünleri düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Lipid peroksidasyonunun özgül ve stabil bir son ürünü olan 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) hücre içine geçmekte, DNA ve proteinlerle etkileşerek hücre sinyalizasyonu ve apoptoz gibi özgül hücresel stres yanıtlarının başlamasına neden olmaktadır.

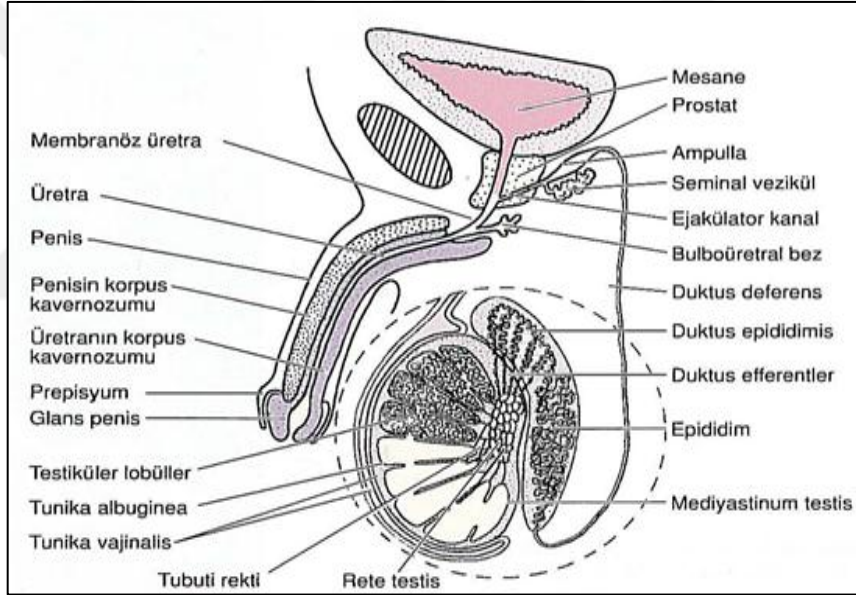
Apoptozis ya da programlı hücre ölümü; multisellüler organizmalarda hücre sayısının kontrolü, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengenin devamını sağlayan önemli bir mekanizmadır. Genellikle yaşlı hücrelerin programlı ölümleri farklı stimulanlar ve stres faktörlerine bağlı olarak kontrol dışı ya da beklenen zaman dışında gerçekleşebilir. Testiküler homeostazda, germ hücre devamlılığında ve spermatogenezde bozulmaya yol açan varikoselde, ortaya çıkan ısı artışının bu dokuda apoptozisi indükleyici rolü olduğu bildirilmiştir. Ancak literatürde varikoselli bireylerde apoptozisin azaldığı sonucu da ileri sürülmektedir.

Varikoselli hastalarda immünohistokimyasal yöntem kullanarak spermlerdeki apoptozisin saptanması ve apoptozis ile sperm parametreleri, serum ve seminal plazmadaki TAS-TOS seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sistemi

Erkek genital sistemi testisler, genital boşaltım yolları, aksesuar bezler ve penisten oluşmaktadır. Testisin temel olarak iki görevi spermatozoon ve hormon üretmektir. Genital boşaltım yolları ve aksesuar bezler, spermatozoonları dışarıya doğru sürükleyen ve aynı zamanda spermatozoonlara gerekli besinleri sağlayan salgılar üretir. Penis semeni dışı üreme sistemine bırakır (1).



Şekil 1. Erkek genital sistemi (1).

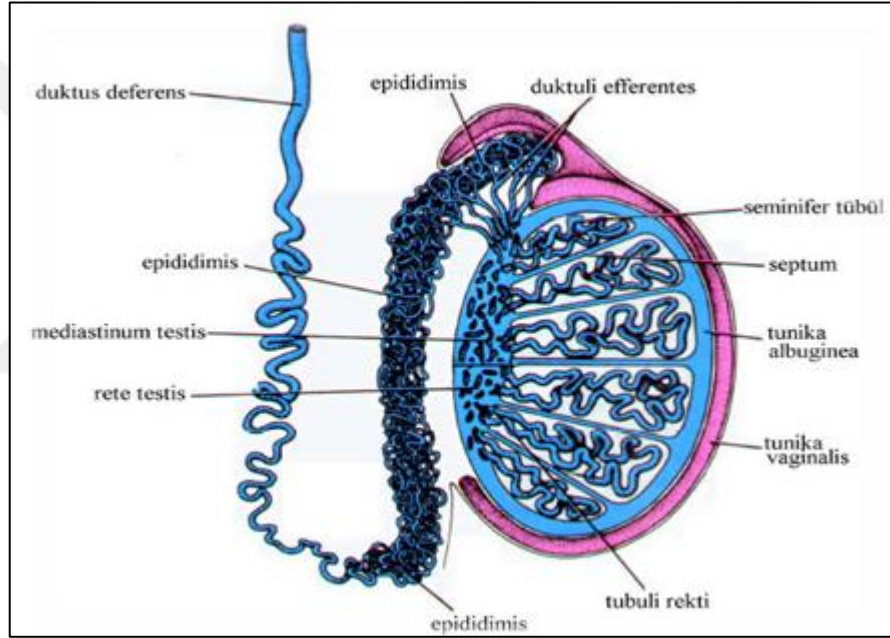
2.1.1. Testis

Septum skroti ile ayrılan bir çift bileşik bez olan testisler, funikulus spermatikus ile skrotum içinde asılı durur. Her bir testis 4-5 cm uzunluğunda, 2-2,5 cm kalınlığında ve 2,5-3,5 cm genişliğindedir (2).

Testisler, yoğun bağ dokusundan oluşan tunika albuginea adı verilen kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Fibröz uzantılar buradan bezin içine girerek bezi testiküler lobüller denilen yaklaşık

250 adet piramidal bölmeye ayırırlar. Testiküler lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusu sinirler, leydig hücreleri ve bol miktarda kan ve lenf damarları içerir (1).

Testisler, retroperitoneal olarak karın boşluğunun arka duvarında gelişirler. Fetüsün gelişimi sırasında skrotuma doğru hareket ederler ve bu hareket nedeniyle her testis peritondan gelişmiş olan tunika vajinalis adı verilen seröz bir kese taşırlar. Tunika vajinalis içte viseral, dışta paryetal bir katmandan meydana gelir ve testisin ön ve yan bölümlerinde tunika albugineaı sarar. Testislerin bu şekilde lokalize olmaları vücut ısısından 2-3 °C düşük bir ısıda olmalarını sağlar (1, 3).



Şekil 2. Erkek genital sisteme ait kanallar (9).

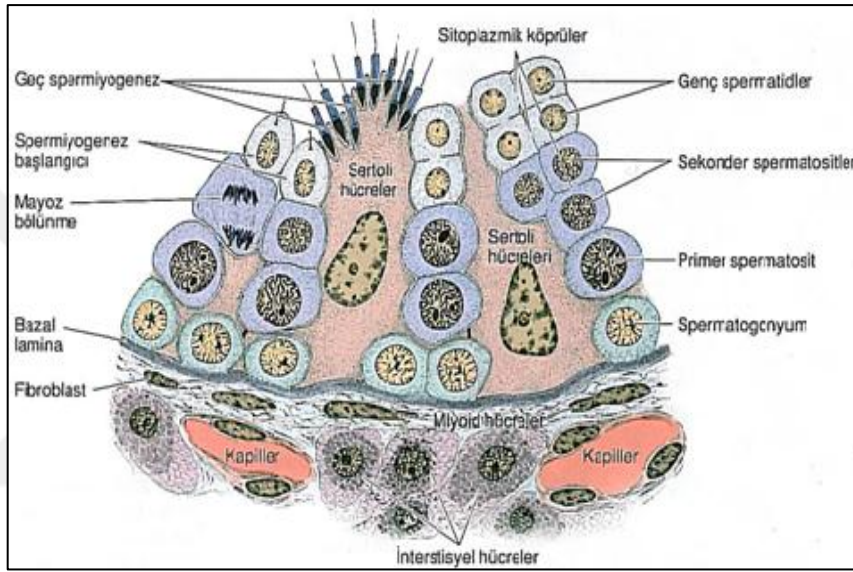
2.1.1.1. Seminifer Tübüller

Her bir seminifer tübül 30-70 cm uzunluğunda ve yaklaşık olarak 150-250 µm çapındadır. Her iki testiste yaklaşık olarak 1000 kadar seminifer tübül bulunur. İnce bir bağ dokusu olan lamina propriya ve ince çok katlı seminifer epitel, seminifer tübülünün duvarını oluşturur. Bazal lamina, lamina propriya ve seminifer epiteli birbirinden ayırır (4).

Başlangıçta kör uçlu olan tübüller sonlanırken lümen daralır ve tubuli rekti olarak adlandırılan kısa segmentler halinde devam eder. Seminifer tübüllerin rete testise

bağlanmasını tubuli rekti sağlar. Rete testis kanalları epididimisin baş kısmına yaklaşık 10-20 kadar duktuli efferentes ile bağlanmıştır (1).

Seminifer tübüllerin epiteli 4-8 katlı karmaşık bir epitelidir. Epitelde ,spermatogenik ve sertoli hücreleri olarak bilinen destek hücreleri bulunur. Spermatogenik hücreler bazaldan lümeneye doğru çoğalarak hareket eder ve farklılaşarak spermatozoonlara dönüşürler. Seminifer tübül lümeninin düzensiz olmasında spermatogenik hücrelerin biçimlerinin farklı olması rol oynar (5).



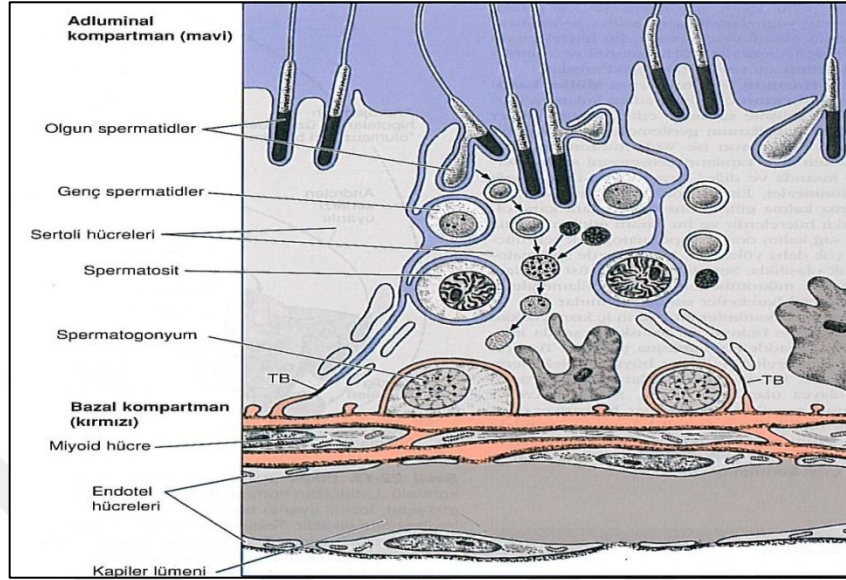
Şekil 3. Çevreleyen dokuyla birlikte seminifer tübülün bir parçası (1).

2.1.1.1.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, bazal laminadan lümeneye doğru uzanan çok yönlü hücrelerdir ve spermatogenik hücrelere uyum sağlaması amacıyla yan yüzleri girintili çıkıntılıdır. Eozinofilik sitoplazmaları, bazale yerleşmiş oval çekirdekleri ve belirgin çekirdekçikleri vardır (2, 6). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerde iyi gelişmiş golgi kompleksi, çok sayıda düz endoplazmik retikulum, az granüllü endoplazmik retikulum ve çok sayıda mitokondri ile lizozom içerdiği gösterilmiştir (1).

Yan yana bulunan sertoli hücrelerinin uzantıları engelleyici sıkı bağlantılarla birbirlerine bağlanarak kan-testis bariyerini oluşturmaktadır. Bu bariyerin oluşumu epitel tabakayı bölmelere (kompartman) ayırır. Bariyerin altında bulunan kompartmana bazal kompartman adı verilir. Spermatogonyumlar bazal kompartmana yerleşmişlerdir.

Spermatogenez esnasında, spermatogonyumların bölünmesiyle oluşan bazı hücreler bu bağlantı noktalarından geçerek bariyerin üstünde yer alan kompartmana ulaşır. Bu kompartmana da adluminal kompartman denir (1, 2).



Şekil 4. Kan-testis bariyeri ve kompartmanların oluşumu (1).

Sertoli hücrelerinin çeşitli işlevleri vardır;

- **Gelişmekte olan spermatozoonların korunması, desteklenmesi ve beslenmesinin düzenlenmesi.** Spermatogenez hücreleri birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmışlardır. Bu hücre ağı, sertoli hücreleri tarafından sitoplazmik dallanmaları ile fiziksel olarak desteklenir. Kan-testis bariyeri ile kan akımından izole edilen spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar, metabolitler ve besin maddelerinin alınıp verilmesinde sertoli hücrelerine gereksinim duyar. Sertoli hücre bariyeri, olgunlaşmış sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan korur (1).
- **Fagositoz.** Spermogenez esnasında artan spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde uzaklaştırılırlar. Bu cisimcikler sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir (1)
- **Sekresyon.** Seminifer tübüllere spermaların taşınmasında kullanılan sıvıyı sertoli hücreleri salgılar. Androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimini, Anti-Müllerian hormonu ve inhibin salgılanması ve üretiminde sertoli hücreleri görev alır (5).

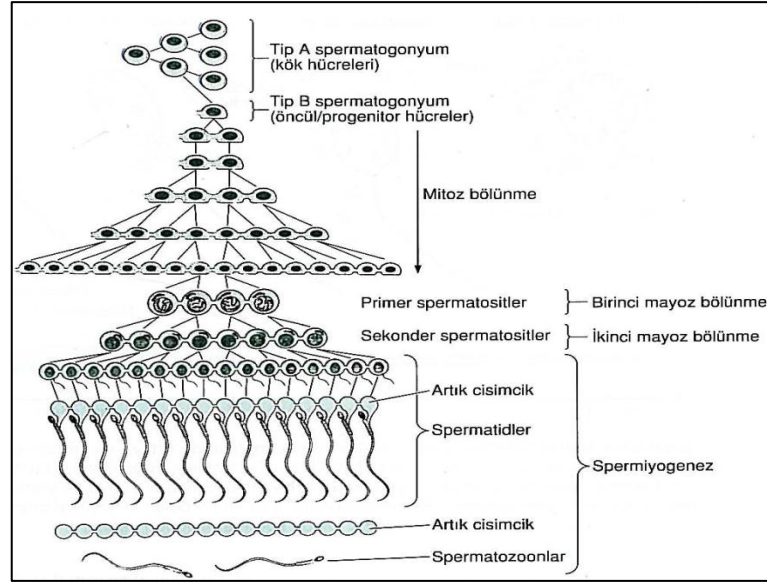
- **Kan-testis bariyeri.** Testiküler sıvıda kandan gelen madde miktarının azalmasında, seminifer tübüllerin iç kısmıyla kan arasında bir bariyerin bulunması katkı sağlar. Testiküler kapillerler büyük moleküllerin geçişine izin verir. Spermatogonyumlar kapillerdeki kana kolayca ulaşabilir. Ancak, sertoli hücreleri arasındaki engelleyici bağlantılar, büyük moleküllerin sertoli hücreleri arasındaki boşluklara girişiminin engellenmesi bariyer oluşumuyla sağlanır. Bariyer oluşumu sayesinde spermatogenezin ilerleyen aşamalarındaki germ hücreleri, kandaki zararlı maddelere karşı korunmuş olur (1).

2.1.1.2. Spermatogenez

Seminifer tübül epitelinde büyük oranda spermatogenik hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler belirli bir farklılaşma ve olgunlaşma evrelerine göre sıralanır. Spermatogonyum ile başlayan sıralanma primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon ile sonlanır. Spermatogonyumdan spermatozoon oluşumuna kadar geçen süreç spermatogenez olarak adlandırılır (1, 7).

Bazal laminanın üstünde yer alan spermatogonyumlar yaklaşık 12 mikron çapındadır. Spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme ile çoğalırlar. Çoğalma sonucu oluşan yeni hücreler ya A tipi spermatogonyum olarak isimlendirilen kök hücreler olarak bölünmeye devam edebilir ya da mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluştururlar. Primer spermatositler, B tipi spermatogonyumların farklılaşmasıyla oluşur. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) ve 4N DNA (N haploid kromozom sayısını ya da DNA miktarını gösterir) içerir. Primer spermatositler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler ve bu aşama yaklaşık 22 gün sürer. Spermatogenik hücreler arasında en büyük hücreler primer spermatositlerdir (1).

Primer spermatositlerin birinci mayoz bölünmeyi geçirmesiyle sekonder spermatositler oluşur. Sekonder spermatositler 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içerir ve DNA miktarı 2N'dir. Testis kesitlerinde bu hücrelerin gözlenmesi zordur. Çünkü bunlar kısa bir interfazı takiben ikinci mayoz bölünmeye giren ömürleri az hücrelerdir. İkinci mayoz bölünme sonu bu hücreler spermatidleri oluşturmaktadır (1, 5).



Şekil 5. Spermatogenez hücrelerinin klonal özelliğini gösterimi (1).

2.1.1.2.1. Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatidlerin spermatozoona dönüşme sürecidir. Hücre bölünmesi bu esnada gerçekleşmez. Akrozom oluşumunu, sitoplazmanın büyük oranda kaybolması, flagellum gelişmesini ve nükleus yoğunlaşmasını ve uzamasını içeren karmaşık bir süreçtir. Süreç sonunda seminifer tübül lümenine salınan olgun spermatozoon oluşur. Spermiyogenez üç faza ayrılabilir (1).

Golgi Fazı

Spermatid sitoplazması nükleus, golgi kompleksi, mitokondri, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum tübüllerini içerir. Proakrozomal granüller golgi kompleksinde paketlenir ve daha sonra bu granüller birbirleriyle birleşerek membranla sınırlı bir akrozomal vezikülü oluştururlar. Sentriyoller akrozom vezikülün zıt kutbuna göç ederler. Aynı zamanda flagellar aksonem oluşmaya başlar (1, 8).

Akrozomal Faz

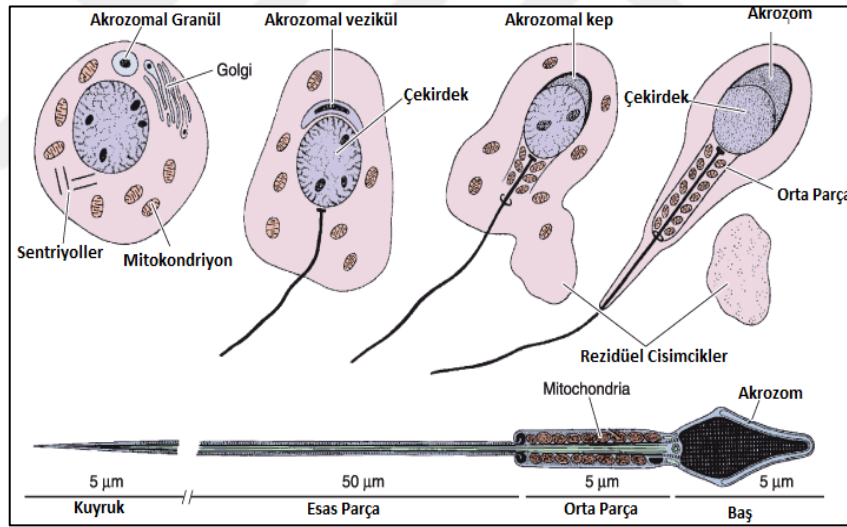
Akrozomal granül ve vezikül, nükleusun ön tarafını örtecek şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom olarak isimlendirilir. Akrozom etkisi tripsine benzer bir proteaz, hiyaluronidaz, nöraminidaz ve asit fosfataz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler oositleri saran

korona radyata hücrelerini birbirlerinden ayırmada ve zona pellusidayı sindirmede görev alır (1).

Spermiyogenezin bu fazında nükleus uzar ve yoğun bir hal alır. Aynı zamanda, sentriyollerden biri flagellum oluşumunu sağlar. Flagellumun proksimal kısmı etrafında toplanan mitokondriler orta parça adı verilen bölgeyi oluşturur. Spermatozoonun hareket enerjisi bu bölgedeki mitokondriler tarafından sağlanır (1, 8).

Matürasyon (Olgunlaşma) Fazı

Artık sitoplazma parçaları sertoli hücreleri sayesinde fagosite olur ve spermatozoonlar seminifer tübülün lümenine salınırlar. Bu salınma işlemine spermiyasyon denir. Spermiyasyondan sonra 2-4 haftalık bir evreden geçen spermatozoon epididime ulaşır. Bu süreçte daha ileri bir olgunlaşmaya uğrayan spermatozoon hareketlilik yeteneği kazanır (8).



Şekil 6. Spermiyogenez süresince spermatidlerin değişimi (1).

2.1.1.3. İnterstisyel Doku

Androjen üretimi açısından testisin interstisyel dokusu önemlidir. Testiküler kapillerler gözeneklidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin geçişine izin verirler. Bağ dokusu çeşitli hücre tiplerini içerir; bunlar arasında mast hücreleri, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, fibroblastlar ve makrofajlar bulunur. Puberte döneminde poligonal ya da yuvarlak şekilli, eozinofilik bir sitoplazmaya sahip ve merkezi bir nükleusu bulunan hücre tipi olan

leydig ya da interstisyel hücreler işlevsel olarak belirgin hale gelir. Bu hücreler ikincil seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu olan testosteronu üretirler (1, 2).

2.1.2. Genital Kanallar

Seminifer tübüller rete testise tubuli rekti olarak adlandırılan tübüllere bağlanırlar. Rete testis tunika albugineanın kalınlaşması ile oluşmuş mediastinum içinde labirent şekilli kanallar halinde gözlenmektedir. Tubuli rekti rete testisin içine boşalır. Rete testisten 10-20 kadar duktuli efferentes çıkar. Duktuli efferentes epididimise taraf hareket sağlayan silyalı ve silyasız kübik hücre gruplarından meydana gelen epitele sahiptir (1, 2).

Testislerde üretilen spermatozoonları penise taşıyan duktus epididimis, duktus deferens ve uretra kanallarıdır. Duktus epididimis yaklaşık olarak 4-6 m uzunluğunda oldukça kıvrıntılı bir kanaldır. Baş, gövde ve kuyruk bölümlerinden oluşur ve testisin arka kısmına yerleşik bulunmaktadır. Duktus epididimis, duktus deferensle devam etmektedir. Spermatozoonların geliştiği ve depolandığı bölümdür (1, 2).

Duktus deferens, spermatik kordonun bir parçasını oluşturmaktadır bu kordon testiküler arteri, sinirleri ve pampiniform pleksus içerir. Duktus deferens prostata girmeden önce genişler ve ampulla kısmını oluşturur. Duktus deferens prostata girdikten sonra uretraya açılır (1, 2).

2.1.3. Yardımcı Genital Bezler

Seminal veziküller, uzunlukları 15 cm olan çok kıvrımlı bir çift bezdir. Bu bez insan ejakulatının %70'lik kısmını oluşturmaktadır. Spermatozoonların besin kaynağı olan fruktozu bol miktarda içermektedir (9).

Prostat, 30-50 adet dallanmış tübüloalveoler bezden oluşur ve erkek üreme sisteminin en büyük bezidir. Bu bezin kanalları prostatik uretraya boşalır. Prostat salgısı lipidler, fosfataz, fibrinolizm, proteolitik enzim ve sitrik asit içermektedir (1, 2).

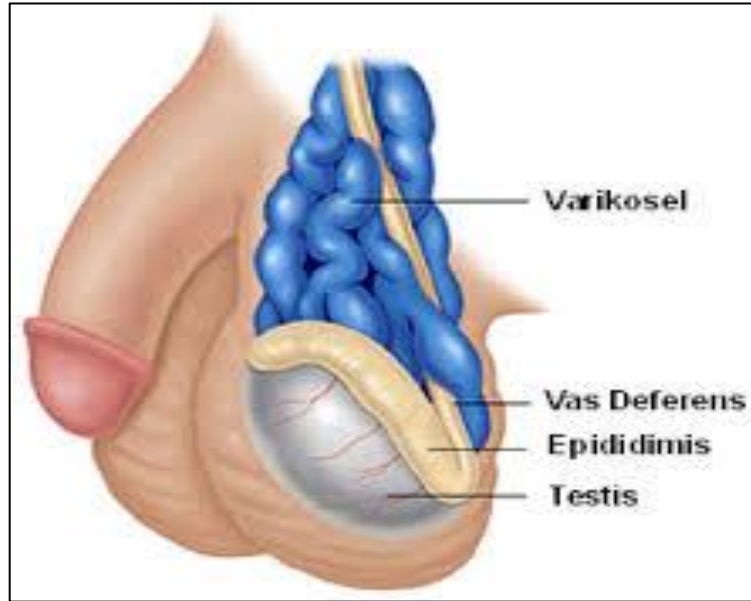
Bulboüretal bezler, çapları 3-5 mm olan üretranın membranöz kısmının proksimalinde yerleşerek buraya salgısını boşaltan bezlerdir. Bu bez berrak ve kayganlaştırıcı mukus salgılar (1).

2.1.4. Penis

Penis üç silindirik erektil doku kitlesi ve üretrayı bulundurur. Bu silindirlerin ikisi penisin korpus kavernozumları olarak isimlendirilir ve dorsal olarak yerleşmiştir. Korpus spongiyozum olarak adlandırılan üçüncü silindirik yapı ventral olarak yerleşmiştir ve üretrayı çevreler. Bu yapı sonunda genişleyerek glans penisi oluşturur. Bezlerin salgısı ve spermatozoonlar penis yoluyla dışı genital sistemine bırakılır (1).

2.2. Varikosel

Varikosel, pampiniform pleksus venlerinin dilatasyonudur. Varikosel terimi 1843'de Curling tarafında pampiniform plexus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu olarak tanımlanmıştır (10). Varikoselin fizyopatolojisi ve onun erkek infertilitesi ile ilişkisi son 50 yıldır tartışılmasına rağmen infertiliteye yol açan mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (11).



Şekil 7. Testiste varikosel görünümü (59).

2.2.1. Varikosel İnsidansı

Klinik varikosel genel olarak erkek popülasyonun %15'inde gözlenirken primer infertil erkeklerin yaklaşık olarak %35'inde ve sekonder infertil erkeklerin yaklaşık olarak %80'inde gözlenmektedir (12). Varikoselin sol testiste görülme oranı %78-93, bileteral görülme oranı %2-20, sağ tarafta görülme oranı %1-7 'dir (13). Normal semen analizi gözlenen erkekler arasında Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre varikosel görülme oranı %11,7 olarak, anormal semen analizine sahip olan erkeklerde bu oran %25,4 olduğu açıklanmıştır. Varikosel, erkek infertilitesinin cerrahi yöntemler kullanarak düzeltilebilen en yaygın nedeni olarak gösterilmektedir (12).

2.2.2. Varikosel Etiyolojisi

Varikoselin etiyolojisi hakkında çeşitli teoriler ileri sürülmüştür. Venöz obstrüksiyon, venöz reflü ve anatomik değişkenlikler bu teorilerden bazılarıdır. Varikoselin etiyolojisi hakkında kabul görmüş 3 teori mevcuttur (14).

Birincisi, sol ve sağ testiküler venlerin anatomik farklılıkları: Vena cava inferiora sağ testiküler venine oblik olarak, diğer taraftan sol renal vene sol testiküler venin doğrudan açılması neticesinde sol taraftaki hidrostatik basınçta artış meydana gelir. Pampiniform pleksusa iletilen basıncın artışından dolayı venlerde kıvrılma ve genişleme gözlenir. İkincisi, kompetan venöz kapakçıkların yokluğu: Varikoseli olan 659 erkeğin katıldığı bir çalışmada, erkeklerin venografik paternleri araştırıldığında %73'ünde venöz kapakçıkların olmayışı gözlenmiştir. Üçüncüsü, aorta ve superior mezenterik arter arasında sol renal venin sıkışması nedeniyle testiküler venin kısmi obstrüksiyonu: Testiküler venöz drenajın baskılanması olarak ifade edilmiştir (15).

2.2.3. Varikosel Patofizyolojisi

Testiküler fonksiyon üzerinde varikoselin etkisini açıklamak için birçok farklı teori olmasına rağmen insan spermatogenezi ve erkek infertilitesi üzerine varikoselin etkilerini hiçbiri tam olarak açıklayamamıştır. Teoriler arasında; hipertermi, venöz basınç, renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu, apoptoz, oksidatif stres, testiküler kan akımı ve testis-interstisyel sıvı ilişkisi bulunmaktadır (11).

2.2.3.1. Hipertermi

Azalan sperm parametreleri ilgili olarak, artan sıcaklık ve varikosel arasındaki ilişki 1960'lardan beridir araştırılmaktadır. Scrotal sıcaklık hem fizyolojik ve anatomik olarak hemde ters akım sistemi ile vücut sıcaklığından daha az olması sağlanır. İlk olarak 1959'da tanımlanan ters akım sistemi, pampiniform pleksusu oluşturan venöz kan testise giren spermatik arter kanının sıcaklığını düşürmektedir. Varikoselli hastalarda bu sistemin bozulduğu düşünülmektedir (16).

Dijital veri kaydedici sayesinde 24 saat skrotal ısının kaydedildiği bir çalışmada, varikoseli olan infertil erkekler ile normal fertil erkeklerin skrotal ısısı kıyaslandığında düşük derecede daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür. Bir diğer çalışmada, varikoselli infertil erkeklerin anestezi altında prop kullanarak skrotumun ısısı değerlendirilmiştir. Varikoselli erkeklerin kontrol grubuna göre skrotal sıcaklığın yaklaşık 2-3 °C daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. Varikosel ile intraskrotal ısı artışı arasındaki ilişki deney hayvanlarında araştırılmıştır. Varikoselin ortadan kaldırılması ile tavşanların ve ratların testiküler ısısı normal derecelerine düşmüştür (17, 18, 19, 20).

Skrotal hipertermi ve varikosel arasındaki ilişki hem hayvan hem de insan çalışmalarında varikosel oluşumunun intratestiküler ısının yükselişine katkı sağladığı gösterilmiştir. Bu görüşü destekleyen bulgu, intratestiküler ısının varikoselin onarımı sonrasında normale gerilemesidir (21).

2.2.3.2. Venöz Basınç

Venöz basınç değişiklikleri ile varikosel arasındaki ilişki uzun zamandır tartışılmaktadır. Venöz basınç yükselişi testis kan akımını etkileyebilmektedir (22, 23). Hamster ile yapılan çalışmada, testisin subkapsüler yüzeyinde bulunan mikrodamarlarındaki basıncın ölçümü ile testiküler kapiller basıncın düşük olduğunu ve düzenlenmesinde vasküler ağın arteriyel bölümü etkili olduğu ileri sürülmüştür. Yüksek venöz basınç intratestiküler hidrostatik ve onkotik basınçların değişmesine, hormonlar için taşınma ve parakrin ortamın değişmesine ve mikrovasküler sıvı değişiminin bozulmasına neden olabilir (23, 24).

İnsanlar üzerinde yapılan çalışmada, manometre bağlanmış iğne ile pampiniform pleksusa girilerek istirahat halinde spermatik venlerdeki basınç ölçülmüştür. Pampiniform pleksus venöz basınç değeri varikozel olanların olmayanlara oranla istirahat halinde ortalama 19,7 mmHg, valsalva ile ortalama 22 mmHg daha yüksek olduğu belirlenmiştir (25).

2.2.3.3. Renal-Adrenal Reflü

Sol spermatik venede retrograd akım varikozelli erkeklerin yaklaşık %50'sinde olduğu bildirilmektedir (26). Ayrıca, venöz reflüdeki yükseliş venografik çalışmalarla gösterilmektedir. Bu çalışmaya göre, böbrekten ve adrenal bezden kaynaklanan metabolit ürünlerin reflüsü varikozelli erkeklerde daha yüksektir. Bu da başlangıçta kronik testiküler vazokonstriksiyona daha sonra testiküler fonksiyonun toksik etkili çalışmasına neden olabilir (27).

Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde yukarıdaki çalışma doğrulanmamıştır. Varikozel oluşturulan hayvanlarda işaretlenmiş mikrosferler sol renal vene verilmiştir. Ancak, ne sol ne de sağ testiste gösterilememiştir (28).

2.2.3.4. Hormonal Disfonksiyon

Varikozeli olan infertil hastalarda, varikozelin leydig hücre disfonksiyonuna ve nihayetinde azalmış testosteron üretimine neden olduğu varsayımlar bulunmaktadır. Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, intratestiküler testosteron konsantrasyonu sol varikozel sonrasında bilateral olarak azaldığı bildirilmiştir. Başka bir rat modelinde, tek taraflı varikozelin testosteron biyosentezinden sorumlu olan 17,20-dezmozolaz ve 17 α -hidroksilaz enzimlerinin seviyesinde azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, varikozel oluşturulmuş hayvanlarda testosteron seviyesindeki azalmanın testosteron sentezindeki bozukluktan kaynaklandığını düşündürmektedir (21).

2.2.3.5. Otoimmünite

Antisperm antikor (ASA) üretimini tetiklenmesinde kan-testis bariyerinin bozulmasının etkili olduğu düşünülmektedir. Etiyolojiler arasında; duktal obstrüksiyon, testis torsiyonu, prostatit, testis travması ve epididimitin yanı sıra varikozelde bulunmaktadır (29).

Varikoselin ne çeşit bir mekanizmayla kan-testis bariyerine zarar vermeden ASA'larını nasıl uyardığı bilinmemektedir. Deneysel olarak oluşturulan varikosel ile hayvanlarda yapılan çalışmada, sham ve non-opere ratlara göre varikoselli ratlarda daha yüksek seviyede ASA birikimi olduğu ileri sürülmüştür (30).

2.2.3.6. Akrozom Reaksiyonu

Varikosel ile ilgili bazı araştırmacılar, sperm morfoloji ve sayısından daha çok sperm fonksiyonunda bir bozulma olduğunu ve bunun neticesinde zona pellusidaya birleşme esnasında meydana gelen akrozom reaksiyonu defekti olduğunu düşünürler (31, 32).

İnsanlar üzerindeki çalışmalarda, varikoseli olan ve fertil bireylerde mannoz ligand reseptörleri eşdeğer ekspresyon göstermektedir. Ancak, mannoz tedavisi ile spermatozoa akrozom reaksiyonu gerçekleşmemekte ve zona pellusidaya penetre olamamaktadır (33).

2.2.3.7. Apoptozis

Spermatogonya, spermatozoid ve spermatid germ hücreleri apoptozis tarafından olumsuz şekilde etkilenmektedir (34). Ratların kullanıldığı bir çalışmada, normal spermatogenez esnasında tüm preleptoten spermatozoidlerin %75'i apoptozis ile ortadan kaldırıldığı ileri sürülmektedir (35). Endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) normal hücrelerde bulunmamaktadır. Ancak, apoptotik germ hücrelerinde bulunduğu bildirilmektedir ve bunun sonucunda varikoseldeki germ hücre apoptozisinde eNOS ve nitrik oksit'in (NO) rolü olabileceği öne sürülmüştür (36).

Son dönemlerde, varikoseli olan insanlarda oligospermin oluşmasında apoptozisin önemli rol oynadığı bildirilmiştir. Deneysel oluşturulan varikosel ile ratlarda, artmış germ hücre apoptozisi Terminal d-UTP Nick-End Labeling (TUNNEL) metodu kullanılarak gösterilmiştir (37). Bu deneyde, seminifer tübül başına düşen apoptotik hücre oranı varikoselli grupta 0.27 iken, kontrol grubunda bu oran 0.14 olduğu belirtilmiştir (38). Bir diğer çalışmada, varikoseli olan hastaların spermleri değerlendirildi ve sonucunda varikoselli grupta sperm hücrelerinin %10'a yakını apoptotik iken, kontrol grubunda yaklaşık %0.1 olduğu bulunmuştur (39).

Apoptozis ve varikosel arasındaki ilişki 3 unsur nedeniyle birliktelik gösterebilmektedir: ısı stresi, toksik uyaran ve androjen yoksunluğu (40). Varikoseldeki apoptoz ile ısı artışı arasındaki ilişki çeşitli deneylerde araştırılmıştır. Bir çalışmada, varikoselin sebep olduğu ısı artışının, hücreye ve evreye özgü olarak apoptozisin oluşmasına neden olduğu bildirilmiştir (41). Androjen yoksunluğu ile ilgili yapılan çalışmada, ratlara uygulanan hipofizektomiden 4 gün sonra immatür ratlarda görülen apoptozis indüklenmesi, matür ratlarda sadece GnRH antagonistleriyle görülmektedir (36, 42). Toksik ajanlarla ilgili yapılan çalışmada, etilen, eter, 2-metoksi etanol ve glikol gibi toksik maddelerin hayvan çalışmalarında apoptozise neden olarak spermatoisitlerin ölümüne sebep olduğu ileri sürülmüştür (43, 44, 45).

2.2.3.8. Oksidatif Stres

Süperoksit anyonları, nitröz oksit, hidroksil radikalleri, hipokloröz asit ve hidrojen peroksit reaktif oksijen türleri (ROS) arasında bulunmaktadır. Spermatozoanın ROS üretimi, akrozom reaksiyonunu kolaylaştırmasında, sperm hiperaktivasyonu ve kapasitasyonunda, sinyal ileti mekanizmalarında ve spermatozoon-oosit birleşmesinde görev alan önemli bir fizyolojik süreçtir (46, 47).

Sağlıklı insanlarda seminal plazma, ROS üretiminin aşırı etkisini nötralize etmek için doğal süpürücü veya antioksidanlar içermektedir. Patolojik durumlarda ROS üretiminin antioksidan kapasiteyi aşması sonucu oksidatif strese neden olmaktadır (46). ROS'lar spermdeki çoklu-doymamış yağ asitlerinin lipid perosidasyonu sonucunda sperm fonksiyonunu bozabilir ve bunun sonucunda sperm motilitesinde azalmaya, sperm morfolojisinin değişmesine ve yetersiz sperm-oosit birleşmesine neden olabilir. Bunların yanı sıra, sperm DNA hasarına da sebep olmaktadır (48).

2.2.3.9. Testiküler Kan Akımı

Varikoseli patofizyolojisinin net olarak açıklanması için testiküler damarlar yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Hayvan çalışmalarında, testiküler kan akımı ve varikosel arasında birbirleriyle çelişkili sonuçlar ileri sürülmüştür. Tek taraflı varikosel varlığında iki taraflı testiküler kan akımının yükseldiği bulunmuştur (49). Ratlar üzerinde yapılan bir diğer

çalışmada, varikoselektomiden sonra testiküler kan akımlarının normale döndüğü görülmüştür (19).

Literatürde varikoselin testiküler kan akımının azalmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Deneysel varikozel oluşumu ile yapılan çalışmada, kan akımının azaldığı bulunmuştur (50). Primatlarda yapılan çalışmada ise, benzer bulgular bulunmuş ve iki yılın sonunda testiküler kan akımının normale döndüğü gözlenmiştir (51).

2.2.3.10. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi

İnterstisyel sıvı, testiküler hücreler ve dolaşım arasındaki parakrin mekanizması ve endokrin etkileşimini düzenler. Testiküler kapillerlerin kan akımı ve geçirgenliği bu sıvının oluşumunu sağlar. Varikoselin oluşumu ile internal spermatik vende oluşan hidrostatik basınç artışı, kapiller ve vasküler geçirgenlikte değişime neden olur ve dolayısıyla interstisyel sıvı oluşumunda değişikliği yol açar. Yapılan çalışmada, varikozeli oluşumundan sonra interstisyel sıvının arttığı bulunmuştur (52).

2.2.4. Varikozelde Semptom, Tanı ve Tedavi

Genellikle asemptomatik olan varikozel, infertilite şikayetiyle tetkik edilen hastada rutin muayene esnasında tespit edilir. Testislerde ağrı ve çekilme hissi olabilir. Hastaların bir kısmında skrotumda dilate venler belirgin olarak görülür (53).

Varikozel tanısı için esas doğru fizik muayenedir. Fizik muayene ile genellikle dilate venler kolaylıkla tespit edilirken dilatasyonun fazla olmadığı durumlarda fizik muayene yetersiz kalmaktadır. Fizik muayene ayakta oda ısısında spermatik kordon iki parmak arasında palpasyonu ile yapılır. Dilatasyonun fazla olmadığı durumlarda dilate venlerin belirgin hale gelmesi için hastaya derin bir nefes aldırılıp ıkındırılır (Valsalva manevrası). Varikozel fizik muayene bulgularına göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır (53).

Subklinik: Fizik muayene ile tespit edilemezdir.

Grade 1: Palpasyonla tespit etmek güçtür, ancak ayakta Valsalva manevrası ile tespit edilebilir.

Grade 2: Valsalva manevrası yapılmaksızın kolayca palpe edilir.

Grade 3: Ven paketleri skrotumda gözle görülür.

Testis volümleri varikozel muayenesi yapılan her olguda ölçülmelidir (54). Spermatogenezin etkilendiği varikoselli olguların önemli bir kısmında, testis volümünde azalma söz konusudur. En sık olarak görülen bulgu astenozoospermidir. Bu durum hastaların yaklaşık % 90'ında tespit edilir. Hastaların yaklaşık %65'inde sperm konsantrasyonu 20 milyon /ml altındadır (oligozoospermi) .Bunlara ek olarak morfolojik anomalilerde yaygındır (53, 55).

Lipshultz ve Corriere varikoseli olan subfertil hastaların, varikoseli olmayan subfertil hastalardan belirgin derecede daha küçük testislere sahip olduğunu bildirmişlerdir (54). Testis boyutunda küçülme ve düşük total motil sperm sayısının, yüksek dereceli varikoselle beraberliğinin sık olduğu gösterilmiştir (56).

Fizik muayenede kararsız kalınıyorsa veya varikoselin nüksünden şüpheleniliyorsa görüntüleme yöntemleri kullanılabilir. Skrotal Ultrasonografi (SU), RDU, Spermatik Venografi (SV), Radyonüklid Anjiyografi (RA) ve Manyetik Rezonans Anjiyografi (MRA) gibi yöntemler varikozel tanısında kullanılabilir. Günümüzde en sık ve yaygın olarak kullanılan görüntüleme yöntemi RDU'dur (57).

En etkili tedavi cerrahi ligasyondur. Çeşitli cerrahi yaklaşımlar vardır. Retroperitonel yaklaşımla internal spermatik ven ligasyonu yapılabilirken, inguinal ve subinguinal yaklaşımla ek olarak eksternal spermatik ven ligasyonu da yapılabilir. (53, 58).

2.3. Apoptozis

Apoptozis, hücre ölümünün farklı bir morfolojisi olarak ilk defa 1972'de J.F.K.Kerr tarafından tanımlanmıştır. Apoptozis, gelişmiş biyolojik sistemlerde hücrelerarası ilişkilerin gereği olarak hasar görmüş, gereksinim duyulmayan ya da virüs ile enfekte olmuş hücrelerin kendi kendilerini yok etmesidir. Bundan dolayı apoptozis hücre intiharı olarak da tanımlanmaktadır. Köken olarak "apo (ayrılan)-ptosis (düşen)" den gelen ve Yunancada "ağaçtan dökülen yapraklar" anlamına gelmektedir (60).

2.3.1. Apoptozisin Görüldüğü Hücre Çeşitleri

Apoptozis, fizyolojik bir işlemdir. Metamorfoz ve embriyogenez gibi organizmanın gelişim dönemlerinde de oldukça önemli role sahiptir. Apoptozis tarafından ölen hücrelerin yerine yeni hücreler yapılmaktadır. Böylece yeniden yapım (mitozis) ve ölüm (apoptozis) doku homeostazisini sağlamak üzere dinamik bir denge halinde süregelir (61, 62).

Kurbağaların metamorfozisi sırasında erişkin forma geçerken kuyruklarının kaybolması apoptozisle gerçekleşir. İnsan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin buradaki hücrelerin apoptozisle ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir (63).

2.3.2. Apoptozisin Morfolojisi

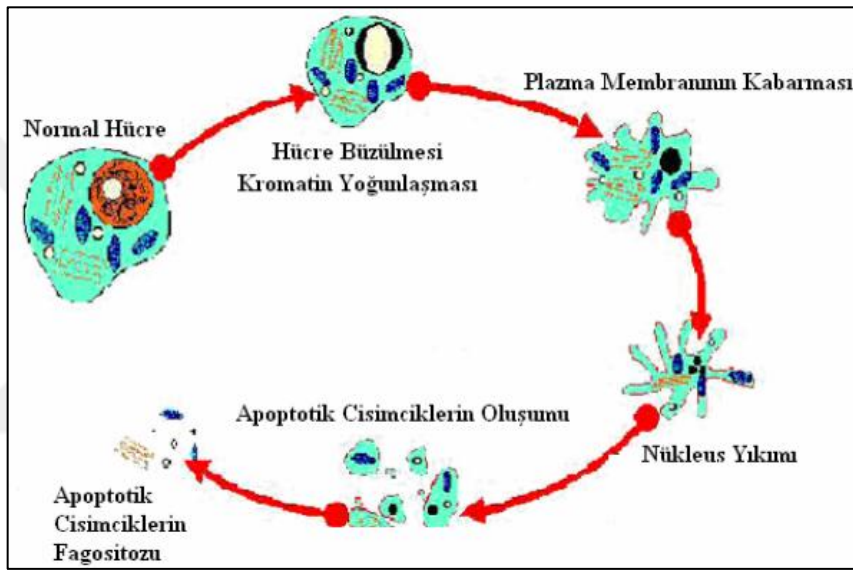
Hücrenin sitoplazma, plazma zarı ve nükleus gibi organellerinde apoptozise özgü morfolojiler, apoptozis sırasında ve sonrasında meydana gelen sitolojik ve biyokimyasal değişimler sonucunda oluşmaktadır (64). Apoptotik morfoloji; kromatin yoğunlaşması, hücre büzülmesi, çekirdeğin parçalara ayrılması, apoptotik cisimcik oluşması ve makrofajlar tarafından apoptotik cisimciklerin fagosite edilmesi olaylarını içermektedir (65).

Apoptozisin erken döneminde, plazma zarı aracılığıyla diğer hücreler ve hücrenin ekstrasellüler matriks ile olan bağlantıları ayrılır. Hücre büzülerek komşu hücrelerle olan fiziksel bağlantısını kaybeder. Sitoplazmada sisternalar vezikül ve vakuolleri oluşturmak üzere kabarır ve endoplazmik retikulum genişler (66). Kabaran sisternalar hücre zarı ile birleşerek tomurcuklanmalar oluştururlar. Bunların ayrılması ile sitoplazma ve çekirdek değişik boyutlarda “apoptotik cisimcikler” oluşturur. Bu cisimler komşu normal parankimal hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilir (67).

Kromatin yoğunlaşmasını takiben çekirdek, zar bütünlüğünü hasara uğratmadan karyoreksis olarak isimlendirilen bir olay ile yapıdan ayrılır (68). Bu morfolojik değişiklikler kaspazlar tarafından bazı proteinlerin kırılması ile başlatılabilir. Lamin A ve NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus) gibi proteinler çekirdeğin yapısal bütünlüğünün korumaktadır. Aktif kaspaz 3 ve 6 bu proteinleri kırarlar. DNA'nın (Deoksiribo nükleik asit) 108-200 baz çifti uzunluğunda parçalara bölünmesi apoptozisin en önemli özelliklerinden biridir. Kaspazla aktif

olan DNaz (Caspase-aktivated DNase, CAD) ve DNA'yı parçalayan faktör 40 (DNA fragmentation factor, DFF 40) bu parçalanmadan sorumlu proteinlerdir (69).

Oluşan apoptotik cisimcikler, plazma zarındaki değişiklikler sayesinde fagositik hücreler tarafından tanınabilmektedir. Bu değişikliklerden en önemlisi fosfatidil serinin (PS) lokalizasyonudur. Normal şartlarda PS, plazma zarının iç yüzeyinde bulunur. Ancak, apoptozisin erken evresinde zarın dış yüzeyine lokalize olur. Bu değişim sayesinde komşu hücreler ve makrofajlar, PS'nin hücrenin dış yüzeyine çıkması ile hücreyi tanır ve apoptotik cisimciklerin fagositozunu gerçekleştirir (66).



Şekil 8. Apoptoziste görülen morfolojik değişimler (39).

2.3.3. Apoptozis ile Nekrozis Arasındaki Farklar

Hücre ölümünün apoptozis ve nekrozis olmak üzere iki tipi vardır. Morfolojik ve biyokimyasal olarak farklılıklar göstermesine rağmen her iki hücre ölümünde düzenli olarak birbirini izleyen olaylar bulunmaktadır (70).

Her iki hücre ölümünün başlatıcı etkenleri farklıdır. Apoptozisin oluşması için hücre içi ATP'nin (adenin) yüksek seviyelerde olması gerekirken nekrozisin gerçekleşmesi için yüksek enerjiye gereksinim duyulmamaktadır. Hücre içi ATP seviyesi, hücrenin nekrozis ya da apoptozis ile öleceğine karar verir. Nekroziste başlatıcı etkenler arasında toksinler, hipoksi ve ATP eksikliği gibi faktörler bulunmaktadır. Apoptoziste ATP seviyesine neden olmayan patolojik ve fizyolojik uyarıların oluşması gerekir (71).

Nekrozise giden hücreye aşırı sıvı girmesiyle hücre şişerken, apoptozise giden hücre ise tam tersine büzülür. Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerken apoptotik hücrede kromatin nükleus membranının çevresinde toplanır ve kondanse olur. Nekrotik hücre lizise uğrar ama apoptoza uğrayan hücre apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerir ve membranla kaplıdır. Nekrozisde plazma zar bütünlüğünün bozulmasından dolayı hücre materyallerinin dış ortama salınması gerçekleşir ve inflamasyon uyarılmaktadır. Apoptozisde apoptotik cisimcikler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden dolayı inflamasyon oluşmaz (72, 73).

Tablo 1. Apoptozis ve Nekrozis arasındaki farklar (72).

Özellikler	Apoptozis	Nekrozis
Yol açan nedenler	Büyüme faktörü eksikliği, Hücre yaşlanması, HIV, Kanser ilaçları, Radyasyon, Sitotoksik T lenfositler,	İskemi, Hipertermi, Hipoksi, Toksik maddeler, Ağır metaller, Şiddetli oksidatif stres,
Morfolojik Özellikleri	Hücre membranı sağlamdır. Hücre küçülür. Blebler oluşur. Kromatin kondensasyonu gerçekleşir. Organeller sağlamdır. Apoptotik cisimcikler oluşur. PS translokasyonu gözlenir.	Hücre membran bütünlüğü kaybolur. Hücre şişer. Büyük vakuoller oluşur. Organeller parçalanır. Hücre lizisi gerçekleşir. PS translokasyonu yoktur.
Biyokimyasal özellikleri	ATP gerektirir. DNA kırıkları merdiven şeklini alır.	ATP gerekmez. DNA rastgele parçalanır.
Diğer özellikleri	Fizyolojik ve patolojik şartlarda gerçekleşebilir. Makrofajlar tarafından fagosite edilirler. İnflamasyon görülmez.	Patolojik şartlarda gerçekleşir. Lizozomal enzimler salınır. İnflamasyona neden olur.

2.3.4. Apoptozis Mekanizmaları

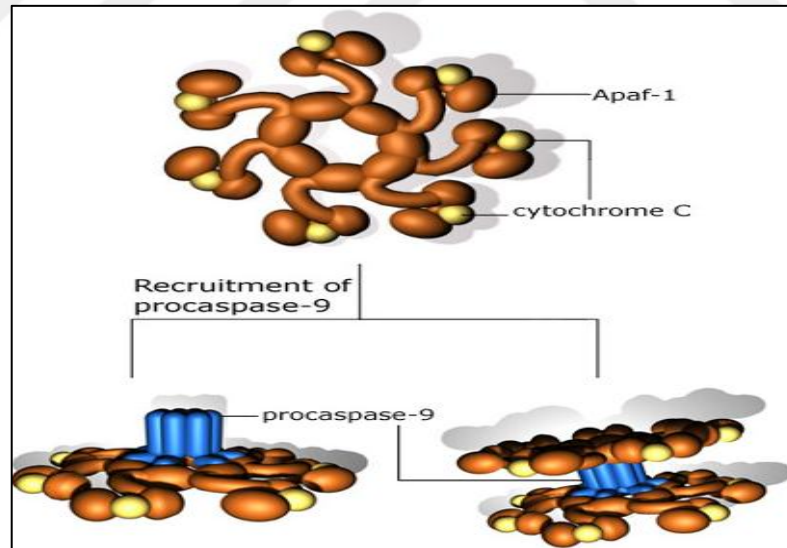
Apoptozis mekanizması tam olarak bilinmese de çeşitli hücre dışı ve hücre içi sinyallerle başlamaktadır (74). Kaynağına bağlı olarak intrinsek (mitokondriyal) ya da ekstrinsek (ölüm reseptör yolağı) yolak olmak üzere ikiye ayrılır. Ölüm uyarısı hücrenin içinden geliyorsa intrinsek yolak, hücrenin dışındaki kaynaktan geliyorsa ekstrinsek yolak

seçilir. Bu yolların işlev gören proteinleri ve başlangıç noktaları farklı olmasına rağmen apoptozisin özgün patobiyojisinin ortaya çıkması noktasında birleşmektedirler (61).

2.3.4.1. İntrensek (mitokondriyal) Yolak

İntrensek yolak, hücre içi uyarılar sonucu ve mitokondrinin de eşliğiyle gerçekleşen apoptozis mekanizmalarından biridir. Apoptozise giden hücrede, mitokondri dış zarında transmembran potansiyelin düşmesi sonucunda “permeability transition pore (PT)” olarak adlandırılan por oluşumu gözlenir ve normalde mitokondrinin membranlar arası bölgesinde bulunan iki protein grubunun sitozole salınmasına neden olur (75, 61).

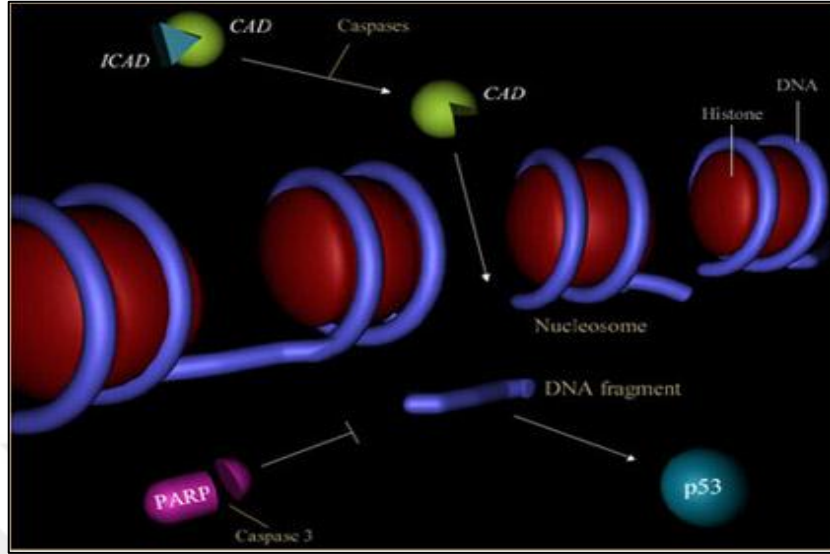
Bu gruplardan ilki, sitokrom c, serin proteaz HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO’dur. Sitokrom c, Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) olarak isimlendirilen proteine bağlanarak apoptozom oluşumunda ve Apaf-1 ile birlikte kaspaz-9’un aktif hale gelmesinde rol alır. HtrA2/Omi ve Smac/DIABLO, apoptozisin inhibitörleri olan IAP’lerin fonksiyonlarını engelleyerek apoptozisi düzenler (61).



Şekil 9. Apoptozom oluşumu ve aktif kaspaz-9 oluşumu (35).

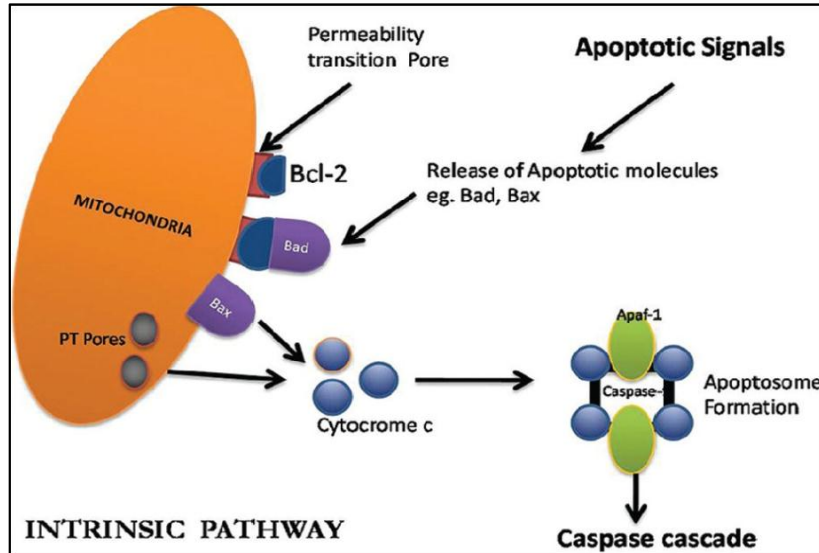
İkinci grup proteinler, endonükleaz G, AIF ve CAD’dır. Bu proteinler de apoptozis sırasında mitokondriden salınırlar. Hücre ölümünün kesinleşmesiyle bu proteinler salınırlar. Nükleusu hedef alan AIF, DNA’yı 50-300 kilobazlık parçalara bölünmesini sağlar. Bunun neticesinde kromatin nükleus çevresinde yoğunlaşır. Diğer protein endonükleaz G’de nükleusa geçerek DNA’yı parçalara böler. Endonükleaz G ve AIF kaspaz-bağımsız olarak

fonksiyon gösterirler. CAD, kaspaz-3 tarafından aktifleşerek nükleozomlar arasından DNA'yı keser (61).



Şekil 10. Hücre çekirdeğindeki nükleozomların parçalara bölünüşü (35).

Bcl-2 ailesi üyeleri, apoptozisi düzenler ve kontrol eder. Apoptozis üzerine pozitif ve negatif etki gösteren iki üyesi vardır. Bunlar, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerdir. Bcl-2 ailesinin apoptozis üzerine olan temel etkisi, mitokondri membran geçirgenliğinin değişmesini sağlayarak sitokrom c'nin salınmasına neden olduğu düşünülür. Bu üyeler arasındaki denge, bir hücrenin apoptozise gidip gitmemesini belirler (61, 64).



Şekil 11. İntrensek yolak (75).

2.3.4.2. Ekstresek Yolak (Ölüm reseptör yolağı)

Ekstresek yolağı, ölüm reseptörleri aracılık eder. Bu reseptörler apoptozisde çok önemli rol oynarlar ve ligandlar ile saniyeler içinde bağlanarak kaspaz kaskadının aktifleşmesini sağlarlar. Bu nedenle apoptozisin bu yolağı çok hızlı gerçekleşmektedir (75).

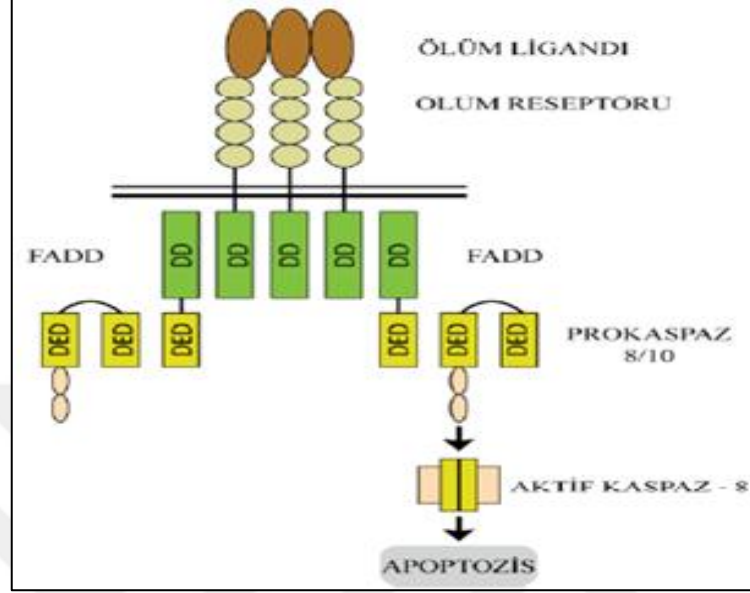
Hücre zarının dış yüzeyinde yerleşmiş bulunan reseptörlere hücre dışından gelen ölüm uyarısı bağlanır. Reseptörlerin sitoplazmada kalan kısımları bir araya gelir ve hücre ölümü için aracı proteinlere bağlanırlar. Pro-kaspazların proteolitik fonksiyonlarını kısıtlayan bölgeleri kesilerek aktif kaspazlara dönüşürler (61, 64).

Hücre yüzeyinde yerleşik bulunan reseptörler TNF (tümör nekroz faktörleri) süper gen ailesi üyesidirler. Bu gen ailesi üyelerinde, sistince zengin hücre dışı domain ve sitoplazmada da ölüm domaini (Death domain; DD) olarak isimlendirilen kısım bulunur. Bu ölüm domainleri hücre dışarısından gelen ölüm uyarısının hücre içerisine iletilmesi için önemlidir. TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) DR4, DR5, CAR1, Fas, CAR1, P75, TNF-R1 ve TRAIL, TNF reseptör ailesi üyelerindedir. Şimdiye kadar en iyi tanımlanmış ölüm reseptörleri ve reseptörlere bağlanan ligandları; TNF- α /TNFR1, FasL/FasR, Apo2L/DR4, Apo2L/DR5 ve Apo3L/DR3 şeklindedir. Bu yoloкта en iyi çalışılmış reseptörler TNF reseptörü-1 ve Fas reseptörü olmuştur (61, 64).

Fas uyarı mekanizmasında FasL hücre dışından gelen uyarandır ve Fas reseptörüne bağlanır. T hücrelerinin uyarılmasıyla FasL bu hücrelerce ifade edilir ve Fas reseptörü bulunan hücrelere bağlanarak apoptozisi başlatır. Membrana bağlı TNF'nin metalloproteinaz tarafından kesilmesi sonucunda ekstrasellüler kısmı ayrılır ve çözülmüş TNF üretilmiş olur. Benzer şekilde FasL'nin ekstrasellüler kısmı kesilerek çözülmüş FasL elde edilir. Çözülmüş FasL ve TNF üçlü yapıda bulunur (61, 64).

Reseptörlerin bu üçlü birleşimi, sitoplazmada bulunan DD bölgelerinin de bir araya gelmesine sebep olur ve apoptozisde rol alan FADD (Fas-associating protein with dead domain) aracı proteini de DD bölgesiyle birleşime katılır. Fas, FasL ve FADD'nin oluşturdukları bileşik DISC (Death Inducing Signaling Complex) olarak isimlendirilir. Kaspaz-8 veya kaspaz-10 DISC bileşimine bağlanır. Kaspaz-8'in N-ucunda iki tane DED bölgesi bulunmaktadır ve FADD'nin DED bölgesine öncül kaspaz-8'lerin DED bölgesi

bağlanır. DISC bileşimi içindeki Öncül kaspaz-8'ler birbirlerine yaklaşıp kendilerini aktive ederler. Aktif hale gelen kaspaz-8 direk olarak kaspaz-3'ü veya başka efektör kaspazları keserek lamin ve aktin ve rho-GDI gibi hücresel elemanların fraksiyonunu sağlar (76).



Şekil 3. FADD'ın yapısı (36).

2.3.5. Apoptozisin Mediatorleri

Apoptozisi düzenleyen protein, iyon ve gen gibi birçok mediator bulunmaktadır. Mediatorler apoptotik stimulusun çeşidine ve hücre tipine göre farklılık gösterebilir (62).

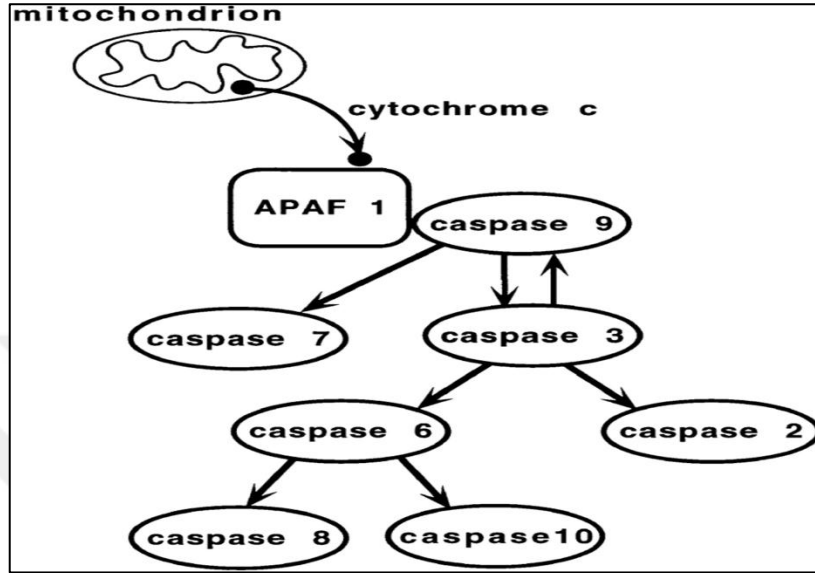
2.3.5.1. Kaspaz Ailesi

Omurgalılarda kaspazlar apoptotik yolda etkili proteinlerdir ve enzim olarak görev yaparlar. İnsanlarda 15 farklı kaspaz belirlenmiştir (77). Öncül yapıdaki kaspazlar 3 bölgeye sahiptir ve tek zincirli bir polipeptid olarak sentezlenir. 17-22 kDa ağırlığında internal bölge (p20), 10-13 kDa ağırlığında küçük katalitik alt ünite olarak isimlendirilen C terminal bölge (p10), merkezinde katalitik aktif bölge ve 3-24 kDa ağırlığında DD olarak adlandırılan NH₂ terminal bölgelerini içermektedirler (78).

2.3.5.1.1. Kaspazların Sınıflandırılması

Kaspaz aile üyeleri fonksiyonlarına göre üç grup altında toplanabilirler

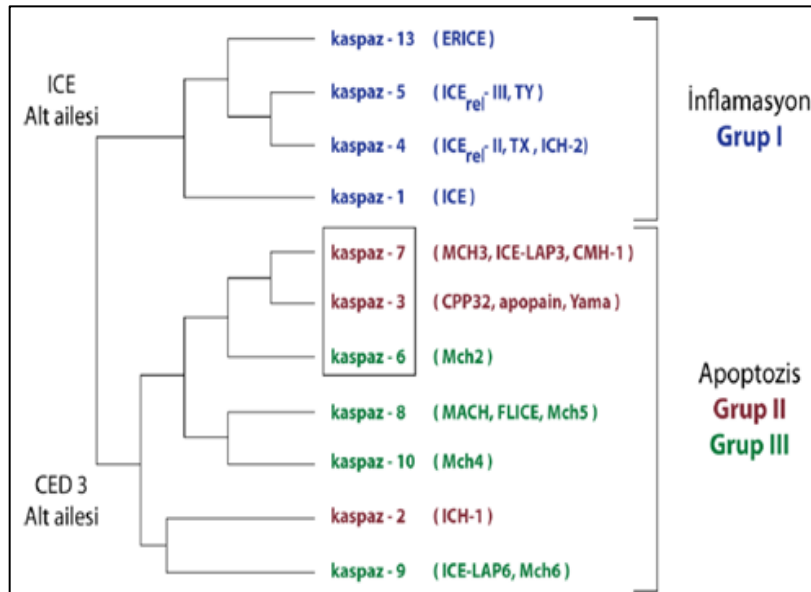
1. Başlatıcı kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9 ve 10 bu gruba dahildir ve bu kaspazlar pro-apoptotik kaspazlar olarak diğer kaspazların aktive olmasını sağlarlar. Başlatıcı kaspazlar 110 aminoasitten oluşur ve transmembran reseptörleri ile etkileşerek aktif hale gelirler (79).



Şekil 13. Kaspaz kaskadı (37).

2. Efektör kaspazlar: Kaspaz 3, 6 ve 7 bu gruba dahildir. Çeşitli hücre içi proteinleri bu kaspazlar enzimatik reaksiyonlarla parçalarlar (62).

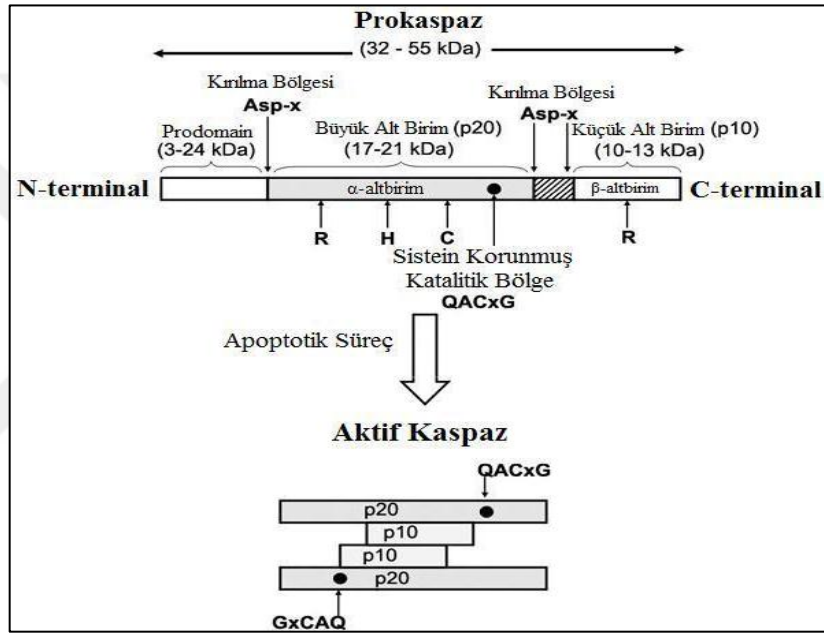
3. Sitokinleri aktive eden kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5 ve 13 bu gruptadırlar (62).



Şekil 4. İnsan kaspaz ailesi (36).

2.3.5.1.2. Kaspazların Aktivasyonu

Öncül kaspazın yapısında bulunan öncül-bölge yapıdan ayrılır ve heterodimer bir yapı geride kalır. Bu şekilde oluşan iki heterodimer yapı birleşip iki aktif bölgeyi bulandıran tetramer aktif kaspazı oluşturur. Prokaspaz-3, 6 ve 7'nin aktivasyonlarında olduğu gibi bütün kaspazlar kaspaz kaskatı oluşturulmasıyla aktif hale gelir. Prokaspazın aktif kaspaz formuna dönüşebilmesi için düzenleyici bir alt ünitenin aktifleştirmesiyle gerçekleşir. Örneğin; prokaspaz-9'un aktif hale gelebilmesi için Apaf-1'in sitokrom c ile birleşmesi ve sonra prokaspaz-9'un bu birleşmeyle etkileşerek aktif yapıya geçebilmektedir (61, 79).



Şekil 15. Prokaspaz ve aktif kaspazın yapısı (36).

2.3.5.1.3. Kaspaz-3

Efektör kaspazlardan biri olan kaspaz-3, apoptozis esnasında kırılan poli ADP Riboz Polimeraz (PARP), nükleer enzim gibi birçok proteinin proteolitik olarak kırılmasından sorumludur. Kaspaz-1 ve Ced-3'ün aktif bölgelerini kodlayan DNA dizilerinden yararlanılarak yapısı aydınlatılmış ve CPP32 olarak isimlendirilmiştir. 32 kDa ağırlığında ve insan kromozomunu 4q33-q35.1 bölgesinde yer alan bir sistein proteazdır. PARP'in kırılma bölgesinin (DEVD↓G) aydınlatılmasına dayanarak, Ac-DEVD-AMC modeli substrat olarak, Ac-DEVD.CHO da spesifik inhibitörü olarak sentezlenmiştir. Apoptozis süresince kaspaz-3, Asp-Xaa-Xaa-Asp (DXXD) motiflerini içeren substratın proteolitik kırılmasından sorumludur (80, 81).

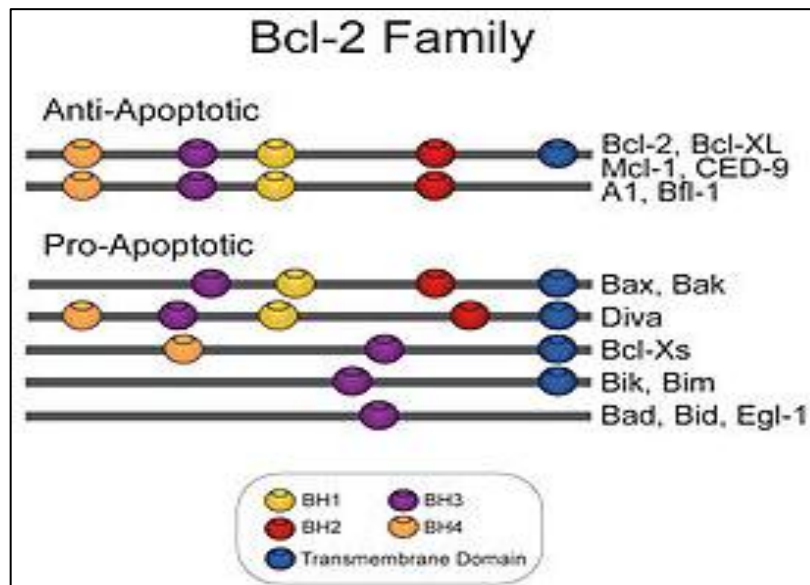
2.3.5.2. Kalsiyum

Apoptozise giden hücreye devamlı kalsiyum girişi olur. Endonükleaz aktivasyonunda, hücre iskeleti organizasyonunda, transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda ve proteazların aktivasyonunda kalsiyum görev alabilir. Tek başına hücre içine kalsiyum girişi apoptozisin başlaması ve devam etmesi için esansiyel değildir (62).

2.3.5.3. Bcl-2 Ailesi

Bir hücrenin apoptozise eğilimi Bcl-2 ailesi genlerinin homodimer ya da heterodimer formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyeler olmak üzere birbirine zıt 2 gruptan oluşur (73).

Bir hücrede proapoptotik proteinler fazla oranda bulunuyorsa hücre apoptozise gitme eğilimi fazladır. Ancak, antiapoptotik proteinler fazla bulunuyorsa hücrenin apoptozise olan eğilimi daha azdır. Proapoptotik üyeler, sitokrom c ve AIF'in salınımını artırarak apoptozisi indüklerler. Proapoptotik üyeler sitozolde bulunmaktadır. Antiapoptotik üyeler mitokondrinin dış membranında, çekirdek zarında ve endoplazmik retikulumda bulunur ve por oluşumunu sağlayarak iyon transportunu düzenlerler. Ayrıca, sitokrom c ve AIF'in salınımını engelleyerek apoptozisi inhibe ederler (73).



Şekil 16. Bcl-2 ailesinin üyeleri (38).

2.3.5.4. p53

p53, hücrede DNA hasarı meydana geldiğinde, eğer hasar onarılabılır düzeyde olduğunda hücre siklusunu G1 fazında durdurarak hücreye DNA'sını onarması için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı onarılamayacak düzeyde ise p53 apoptozisi indükler. p53, Bax'ın ekspresyonunu artırarak Bcl-2/Bax oranını değiştirir. Bunun sonucunda apoptozisi indüklenmesini sağlar (62).

2.3.5.5. Sitokrom C

Elektron transport zincirinin bir proteini olan sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunur. Eğer sitokrom c, mitokondriden sitoplazmaya salınmış ise hücre apoptozise gittiği ve irreversible bir döneme girildiğini işaret etmektedir (62).

Sitokrom c, mekanizması tam olarak bilinmemiş bir şekilde AIF ile birlikte mitokondriden sitoplazmaya salınır. Sitoplazmik bir protein olan Apaf-1'e bağlanan sitokrom c onu aktive eder, daha sonra ATP'nin de eşliğiyle apoptozom olarak adlandırılan bir kompleks oluşturur. Apoptozom, inaktif olan prokaspaz-9'u aktif kaspaz-9'a dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9, prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3'e dönüştürür. Aktif kaspaz-3, ICAD'ı (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir ve ICAD'ın bağladığı CAD'ı serbestleştirir. Serbest hale gelen CAD, kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (61, 62).

2.3.5.6. AIF

AIF, mitokondride görev yapan bir flavoproteindir. Apoptotik sinyaller sonucu mitokondriden salınarak nükleusa geçer. DNA'nın parçacklara ayrılmasında ve kromatin yoğunlaşmasında neden olarak apoptozisde görev alır (63).

2.3.5.7. Endonükleaz G

Kuvvetli bir nükleaz etki gösteren endonükleaz G mitokondride bulunur. Apoptotik sinyaller sonucu mitokondriden salınan endonükleaz G nükleusa geçer ve burada DNA'nın parçacıklara ayrılmasına neden olur ve hücre apoptozise gider (63).

2.3.5.8. Granzim

Granzimler, tümör hücrelerinin ve enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasında görev alırlar. Natural killer (NK) hücrelerinin ve sitotoksik lenfositlerin (CTL) sitoplazmik granüllerinde bulunan granzimler ve perforinler, hedef hücreye bağlanmanın sonucunda salgılanırlar. Sonuçta hedef hücrenin membranında porlar oluştururlar. Porlar aracılığıyla hücreye giren granzimler, prokaspaz-8'in aktif hale gelmesini sağlar ve kaspaz kaskadı başlar. Bu da hücreyi apoptozise götürür (62).

2.3.6. Apoptozu Belirleme Yöntemleri

Apoptotik indeks, apoptozise giden hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranını ifade etmektedir. İndeksin belirlenmesi için apoptotik hücrelerin görünür hale getirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla birçok morfolojik ve biyokimyasal metotlar geliştirilmiştir (82).

2.3.6.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

2.3.6.1.1. Işık Mikroskobu

Hematoksilen-eozin boyama (HE): hücre kromatinini boyadığından dolayı apoptotik hücreler belirlenebilir. Kromatinin kondense olması, hücre küçülmesi ve nükleusun parçalara bölünmesi gözlenebilir (82).

2.3.6.1.2. Floresan mikroskopu / Lazerli konfokal mikroskop

Floresan maddelerin (örn. DAPI) kullanılmasıyla gerçekleştirilen bir boyama yöntemidir. DNA'ya bağlanabilen floresan boyalar nükleusu görünür hale getirir. Ölü ve canlı hücre ayrımı yapabilmek için, sadece ölü hücreleri boyayabilen bir boya ile (Örneğin; propidium iyodür) canlı veya ölü hücreleri boyayabilen bir boya beraber kullanılır (82).

2.3.6.1.3. Elektron Mikroskopu

Apoptozisi belirlemede en değerli yöntemdir. Apoptozisde oluşan morfolojik değişimler çok net bir şekilde gözlenir (62).

2.3.6.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu

Bu tür mikroskop hücrelerin kültür ortamında, plate veya flask'larda büyütüldüğü çalışmalarda kullanılır ve apoptotik hücrelerde gelişen cepçikler gözlenebilir (62).

2.3.6.2. Histokimyasal Yöntemler

2.3.6.2.1. Anneksin V Yöntemi

Apoptozise giden hücrede normal şartlarda hücre zarının iç yüzeyinde bulunan PS hücre zarının dış yüzeyine geçer. Dış yüzeydeki PS'ler floresan madde kullanarak işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilebilir (82).

2.3.6.2.2. Tunel Yöntemi

DNA kırıklarının gözlenmesini sağlayan yöntemdir. Donmuş kesitler, parafin bloklar ve lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu yöntemle gözlenebilir (82).

2.3.6.2.3. M30 Yöntemi

Sitokeratin 18, apoptozise giden hücre kaspazların etkisiyle kırılır ve ortaya yeni bir antijenik bölge çıkar. M30 yöntemi, bu bölgenin immünohistokimyasal (İHC) metodla boyanması prensibine dayanır (62).

2.1.6.2.4.Kaspaz-3 Yöntemi

Apoptotik hücrelerde meydana gelen aktif kaspaz-3'ün belirlendiği yöntemdir (62).

2.3.6.3.Biyokimyasal Yöntemler

2.3.6.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Apoptotik hücrede DNA, internükleozomal bölgelerden kırıldığından dolayı merdiven görüntüsü (ladder pattern) meydana gelir. DNA'nın bu kırılması apoptozise özgüdür ve

nekrozisde oluşmaz. Bu yüzden, apoptozisi nekrozisden ayırmak için kullanılan değerli bir yöntemdir (62).

2.3.6.3.2. Western Blotting

Apoptozise özgü olan bazı proteinlerin (örn. Bcl-2, Kaspaz-3) eksprese olup olmadıkları ya da kırılıp kırılmadıklarını belirlemede kullanılan yöntemdir (62).

2.3.6.3.3. Flow Sitometri

Floresan madde ile belirlenmiş antikor kullanılarak apoptozise özgü eksprese olan hücre yüzey proteinlerinin saptanmasında kullanılan yöntemdir (62).

2.3.6.4. İmmunolojik Yöntemler

2.3.6.4.1. Elısa

İnsan plazmasında ya da kültürü yapılmış hücrede DNA fragmentasyonunu belirlemede kullanılan yöntemdir (62).

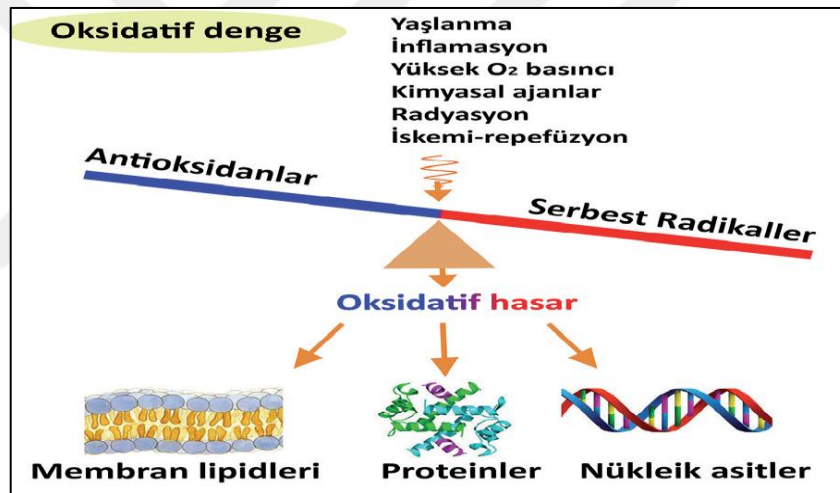
2.3.7. Spermatogenez ve Apoptozis

Doku canlılığında ve canlılığın devam etmesinde, normal fizyolojik şartların korunmasında etkin olan apoptozis, testiküler dokuda da sürekli saptanan bir olaydır. Bilindiği üzere spermatogenez, spermatogonyumun mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu ve hücre farklılaşmaları ile olgun sperm oluşma sürecidir. Ayrıca, germinal hücre ölümleri de görülür ve bu durum sperm oluşumunda önemli bir rol oynar. Apoptozis, genellikle spermatogonyumların ve spermatositlerin ölümüne neden olur. Yapılan bir çalışmada, testiste apoptozisin devamlı gerçekleştiği ve defektif germinal hücrelerin ortadan kaldırılmasında yönelik bu olaya erkek germinal hücrelerinin %25-75'nin maruz kaldığı ileri sürülmüştür. Spermatogonyumların gelişim evresinde ortaya çıkan apoptozis, sertoli hücreleri ile olgunlaşmakta olan germinal hücreleri arasındaki uygun sayısal oranı sürdürmeye yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmaktadır. Azoospermik ya da oligospermik durumlarda, androjen eksikliğinde ve ısı artışının olduğu durumlarda testiste meydana apoptoziste artış

gözlenebilir. Testiküler fizyolojiyi bozan stimulanlar varlığında apoptozis artışı gözlenir ve spermatogenezde bozulma ve infertilite meydana gelir (83).

2.4. Oksidatif Stres

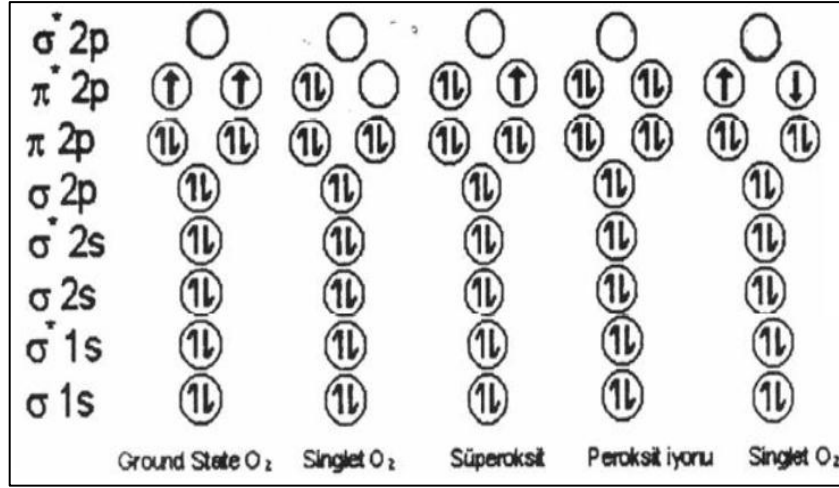
Biyolojik sistemlerde serbest radikaller ile antioksidanlar belirli bir denge halindedir. Bu dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Yüksek reaktiviteye sahip reaktif oksijen türleri, mitokondriyum başta olmak üzere çeşitli hücre organellerinin normal metabolizması sonucu üretilirler. Ayrıca, yaşlanma, inflamasyon, kimyasal ajanlara maruziyet, radyasyon ve iskemi-reperfüzyon gibi nedenlere bağlı olarak da üretilebilir. Diyabet, kanser, ateroskleroz ve kardiyovasküler gibi çeşitli hastalıkların patogenezinin sorumludur (84).



Şekil 17. Oksidatif denge (84).

2.4.1. Serbest Radikaller

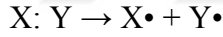
Atom yapısı, bir çekirdek ve çevresinde bulunan değişik sayıda elektronlardan oluşmaktadır. Enerji düzeylerine göre belirli bir düzende yerleşen elektronlar, orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedirler. Her orbitalde yerleşik iki elektron, birbirine zıt yönde kendi eksenini etrafında dönmektedir. Orbitallerden birine veya ikisine ters dönüşlü bir veya ters dönüşlü iki elektron yerleştirilmesi ile radikal elde edilmektedir (85).



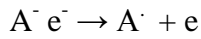
Şekil 18. Oksijen molekülünün elektron sayısı ve oluşan oksidan moleküller (85).

Reaktif oksijen türleri, serbest radikaller veya oksidan moleküller, moleküler veya atomik yapılarında eşlenmemiş elektron taşıyan moleküllerdir. Serbest radikallerin başlıca 3 yolla meydana geldiği ileri sürülmektedir (86).

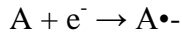
- Kovalent bağlı bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi.



- Normal bir molekülün bir elektronun kaybına uğraması



- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi



2.4.2. Oksijen Türevi Bileşikler

Normal şartlarda oksijen tatsız, renksiz, kokusuz, kararlı, sudaki çözünürlüğü sınırlıdır. İnsan hayatı için hem toksik hem de gerekli olan bir moleküldür. Biyolojik sistemlerde en önemli serbest radikaller oksijenden oluşurlardır. Moleküler oksijenin (O_2), iki tane eşlenmemiş elektronu bulunduğundan dolayı kendisi aynı zamanda bir radikaldir. Bu

özelliik oksijenin diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girmesini sağlarken serbest radikal olmayan maddelerle daha yavaş reaksiyona girmesini sağlar. Organizmada oksijenin kısmi redüksiyonuyla, çok sayıda ve yüksek derecede reaktif ürünler oluşur. Oksijen, hücre içinde çeşitli reaksiyonlardan sonra en son H₂O'ya indirgenir (87, 88).

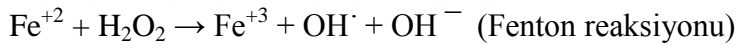
2.4.3. Serbest Oksijen Radikalleri

2.4.3.1. Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali (OH[•]) neredeyse bütün biyomoleküllerle reaksiyona girebilen serbest radikaller arasında en kuvvetli oksidan etkiye sahip olan radikaldir. Suyun yüksek enerjili radyasyona maruz kalması OH[•] radikalini oluşturur (88).

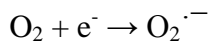


Aynı zamanda hidrojen peroksitten endojen olarak Fenton ve Haber-Weis reaksiyonları ile hidroksil radikali meydana gelir (89).



2.4.3.2. Süperoksit Radikali

Süperoksit radikal anyonu bütün aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir (90).

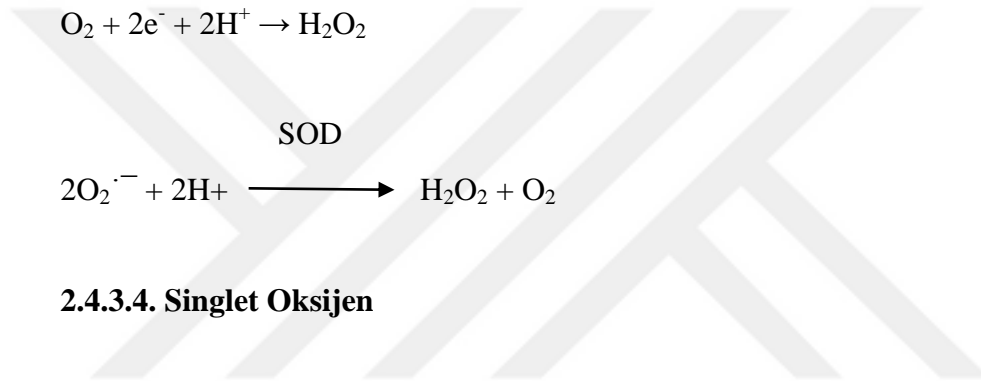


Mitokondri kristası endojen olarak süperoksitin en yoğun oluşum yeridir. Aynı zamanda ksantin oksidaz, lipooksijenaz, siklooksijenaz enzimleri süperoksit radikalini oluşturan diğer endojen kaynaklardır. Süperoksit radikali zayıf oksitleyici ancak güçlü indirgeyici bir ajandır. Hidrojen peroksitin oluşmasını ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olduğu için zararlı etkilere neden olmaktadır (91).

2.4.3.3. Hidrojen Peroksit Radikali

Hidrojen peroksit, bütün elektronları çiftleştirdiğinden radikal değildir ancak biyolojik membranlara nüfuz edebilmesi ve daha reaktif oksijen türlerinin yapım aşamasında rol aldığı için önemlidir (88).

Hidrojen peroksit oksijen molekülünün iki elektron alması sonucu ve süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile süperoksitten oluşur. Aynı zamanda, d-aminoasit oksidaz, glukoz oksidaz, urat oksidaz gibi enzimler oksijene iki elektron transfer ederek hidrojen peroksit oluşturur (92).



2.4.3.4. Singlet Oksijen

Ortaklanmamış elektronu bulunmadığından gerçek serbest radikali değildir. DNA, RNA, proteinler ve lipitleri kapsayan birçok biyomolekülle reaksiyona girerek organizmaya zarar verir (93).

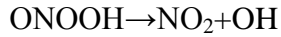
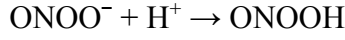
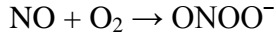
2.4.3.5. Peroksil Radikali

Hidroksil radikali ile yağ asitleri, nükleik asitler, karbonhidratlar ve proteinler gibi çeşitli moleküllerden bir proton çıkmasıyla karbon merkezli radikaller (alkil radikali: R•) oluşur. Oluşan bu radikaller hızlı bir şekilde oksijen ile reaksiyona girerek peroksil radikalini (ROO•) meydana getirirler. Peroksil radikali, lipid peroksidasyonunda zincir devam ettirici radikaldir (94).

2.4.3.6. Nitrik Oksit

Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz enzimi ile L-arjininden sentezlenir. Nitrik oksit, oluşmuş olan ROS'ları ile reaksiyon vererek oksidan olan peroksinitrit oluşturmaktadır.

Daha sonrasında ileri dekompozisyon ile hidroksil radikali oluşumuna yol açmaktadır (95).



2.4.4. Reaktif Oksijen Radikallerinin Kaynakları

Reaktif oksijen radikallerinin kaynakları endojen ve ekzojen olmak üzere ikiye ayrılabilir.

2.4.4.1. Endojen Kaynaklar

2.4.4.1.1. Elektron Transport Zinciri

Normal koşullarda mitokondri, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Elektron transport zincirinde yer alan pek çok bileşik (NAD⁺, FAD, koenzim Q) oksijen ile süperoksit salınımına neden olmaktadır. Oksijen kaçağı olarak tanımlanan bu olaya neden olan faktörler bilinmemektedir. Normal koşullarda hücrenin savunma sistemleri ile yok edilebilen bu kaçak, oksidan stres durumunda savunma sistemlerinin yetersiz kalması sonucu mitokondride hasar oluşmaktadır. Oluşan hasar hücrenin enerji sistemini etkilemekte, ATP kullanımındaki artış ve ATP sentezindeki azalma sonucu hücrede ATP düzeyi hızla düşmektedir. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenazın iki SH grubunu kaybetmesi sonucu NAD⁺ bağlanamadığı veya ATP sentaz aktivitesi inhibe olduğu için ATP sentezi azalmaktadır. Mitokondriyal elektron transport sistemi serbest radikal kaynaklarının en önemli kısmını oluşturmaktadır (85, 96).

2.4.4.1.2. Fagositoz

Polimorfonükleer lökosit (PMN) ve makrofajlar, fagosite ettiği bakterileri öldürmek ve nekrotik dokuları temizlemek için proteazlarla birlikte oksijen radikallerini kullanır. PMN'nin

aktif olmuş komplemanla aktivasyonu bir respiratuar patlama enzimini uyarır. Bu durumda PMN'nin oksijen tüketimi seksen kat kadar artar ve bu oksijen özellikle kısa ömürlü (O_2^- , H_2O_2 , HO^{\cdot}) ve uzun ömürlü (HCIO) olmak üzere reaktif oksijen türleri üretiminde kullanılır. Bu mekanizma enfeksiyon hastalıklarında, inflamatuvar hastalıklarda, lokal inflamasyonda (Artrit, Adult Respiratory Dystress Syndrome), normal yara iyileşmesinde ve sekonder olarak iskemi-reperfüzyon durumlarında etkilidir (89).

2.4.4.1.3. İskemi-reperfüzyon

İskemi sonrası reperfüzyon dokularda hasara yol açabilir. Eğer aerobik metabolizma için oksijen desteği yetersiz ise, enerji depoları boşaltılır ve hipoksantin oluşur. Reoksijenasyonda hipoksantin, ATP restorasyon için kullanılır. Ancak doku hipoksisi uzun sürerse, reoksijenasyonda ksantin oksidaz aracılığı ile hipoksantin ksantine çevrilir. Bu reaksiyon süperoksit üreten bir süreçtir ve aşağıdaki durumlarda gözlenebilir (97, 98).

- Bazı damar tıkanma tipleri (MI, Felç)
- Mikrosirkülasyon kaybı (Diabet)
- Bütün hipoksi halleri
- Şok
- Organ transplantasyonu

2.4.4.1.4. Diğer

Araşidonik asit kaskadı PLA_2 ile aktive edilince, lipid peroksidasyon süreci başlatılır. Katekolaminler ve monosakkaritler gibi moleküllerin otooksidasyonunun endojen oksidatif strese katkıda bulunabilir. Ayrıca, sitokrom p450, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz'ın katalizlediği reaksiyonlarda serbest radikaller oluşur. Bütün bu reaksiyonlar genellikle birçok bölgede eş zamanlı olarak oluşur (89).

2.4.4.2. Ekzojen Kaynaklar

Önemli ekzojen oluşum kaynakları (89):

- Hava kirliliği: Havadaki azot dioksit
- Sigara kullanımı: Lipitlerin oksidasyon duyarlılığını artırır.
- Kimyasal maddeler: Pestisitler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar
- Radyasyon: Hidroksil radikalının oluşmasını sağlar.
- Alkol: Karaciğerde serbest radikal oluşumunu artırdığı bilinmektedir.

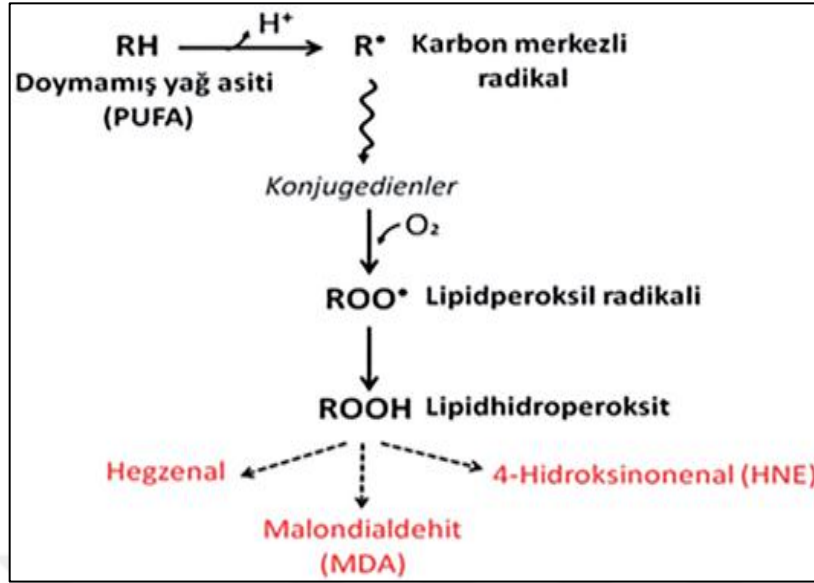
2.4.5. Oksijen Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerdeki zararlı etkileri çeşitlidir. Oksidatif atağa hassas olan nükleik asitler, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi bütün hücre elemanlarında hasara yol açabilir (84).

2.4.5.1. Serbest Radikallerin Lipit Yapılar Üzerine Etkisi

Reaktif oksijen türleri hücrel membranlarda yer alan poliansatüre yağ asitlerinde (PUFA) oksidasyona neden olarak lipit peroksidasyonunu başlatırlar (99). Yağ asidinde bulunan çift bağ, kendisine bitişik karbon ile hidrojen arasındaki bağı zayıflattığından dolayı (C-H) hidrojenin koparılması kolaylaşmış olur (100).

Hidrojen kaybeden yağ asidi konjuge dien yapısı oluşturur. Oluşan konjuge dien yapı oksijenle birleşir ve lipit peroksil radikallerine (LOO•) dönüşür. Bu peroksil radikalleri diğer yağ asitlerinden hidrojen koparak zincirleme peroksidasyon reaksiyonlarını başlatırlar (101). Lipit peroksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan lipit peroksitleri (lipit peroksit, siklik peroksit, siklik endoperoksit) ve son ürünler olan malondialdehit (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE) ve hegzanal isimli aldehitlere dönüşür (102).



Şekil 19. Reaktif oksijen türlerine bağlı oluşan lipit peroksidasyon ürünleri (84).

Peroksidasyon sonucu membran potansiyelinde azalma, membran akışkanlığında bozulma ve membranların iyonlara karşı geçirgenliğinde artış meydana gelir. Bunun sonucunda, organel içeriğinin sitoplazmaya salınmasına ve membranların rüptüre olmasına neden olur (103).

2.4.5.2. Serbest Radikallerin Protein Yapılar Üzerine Etkisi

Hidroksil radikali başta olmak üzere oksidatif stres sonucu oluşan reaktif oksijen türleri geri-dönüşümlü veya geri-dönüşümsüz olarak hücre içi proteinler üzerinde modifikasyon ve hasara yol açar (105, 106). Hücre içi proteinlerin oksidasyonu sonucunda karbonil gruplar oluşur (106).

Aromatik aminoasitlerde (fenilalanin, tirozin, triptofan) doymamış yapılar bulunduğu için oksidatif ataklara çok hassastırlar. Sülfürlü aminoasitler olan sistein ve sistin de serbest radikal atağına hassas aminoasitlerdendir. Ayrıca serbest radikaller, Ig G ve albümin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulduran proteinlerin üç boyutlu yapılarını bozar (89).

Proteinlerde oksidatif stres sonucu oluşan modifikasyonlar ve hasarlar, hücre iskeletinin oluşumunu sağlayan proteinleride ve enzimlerde fonksiyonel ve yapısal değişimler oluşturur. Bu değişimler birçok hastalığın patogenezinin sorumludur (104, 105).

2.4.5.3. Serbest Radikallerin DNA Üzerine Etkisi

Hidroksil radikali protein ve lipitlerde olduğu gibi DNA üzerinde etki eder. 2-deoksiribozun C-H bağlarından H atomu çıkararak veya DNA bazlarındaki çift bağlara H atomu ekleyerek DNA ile reaksiyona girer (107).

8-OHdG (8-hidroksi-2'-deoksiguanozin), DNA baz mutasyonlarında en fazla bilinenidir. Hidroksil radikalleri, guain molekülünde 8. Pozisyonda etkileşerek oksidasyona yol açar ve 8-OHdG oluşur. Bu radikaller DNA'daki şeker kalıntılarından H atomu kopararak zincir kırılmalarına ve şeker modifikasyonlarına yol açar. Aynı zamanda, hücrelerin serbest radikallere maruziyetinde transkripsiyon ve replikasyon üzerine etki göstererek DNA hasarını artırır. 8-OH-dG (8-hidroksiguanin) düzeyi DNA üzerindeki oksidatif hasarın göstergesi olarak kullanılmaktadır (108, 109, 110).

2.4.5.4. Serbest radikallerin Karbonhidratlar Üzerine Etkisi

Fizyolojik pH ve ısıda glukoz gibi monosakkaridlerin otooksidasyonu ile hidrojen H₂O₂, peroksitler ve okzaldehitler oluşabilir. Karbonhidratların proteinlere bağlanması proteinlerin serbest radikal saldırısına duyarlılığını artırmaktadır. Sinoviyal sıvıya vizkosite sağlayan ve glikozaminoglikan olan hyaluronik asit, Süperoksit radikali tarafından depolimerize olarak sinoviyal sıvının vizkositesinin kaybına neden olur (111).

2.4.6. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler. Antioksidanlar genel olarak endojen ve ekzojen olmak üzere iki grupta incelenir (112).

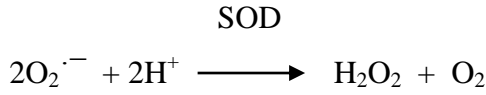
2.4.6.1. Endojen Antioksidanlar

Enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılır.

2.4.6.1.1. Enzim Olan Endojen Antioksidanlar

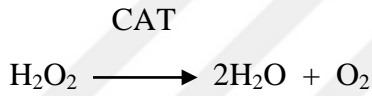
Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalinin ($O_2^{\cdot-}$) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir (89).



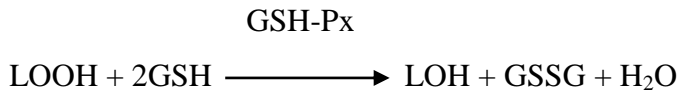
Katalaz (CAT)

Katalaz peroksizomlarda, sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. H_2O_2 'yi suya ve oksijene parçalar. Böylece H_2O_2 'nin ortadan kalkmasını sağlar (113).



Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

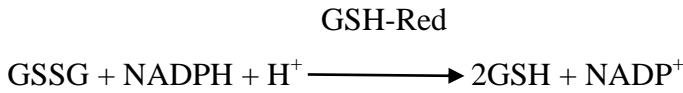
Hem hidrojen peroksit (H_2O_2) hemde lipit peroksidlerini (LOOH) metabolize etmektedir. Bu reaksiyonlar esnasında redükte glutatyon (GSH) hidrojen verici olarak görev yaptığından H_2O_2 ve LOOH indirgenirken GSH ise okside şekline (GSSG) dönüşür (113, 114).



GSH-Px, fagositik hücreler üzerine koruyucu bir etkisi vardır. GSH-Px fonksiyonlarındaki azalma H_2O_2 birikmesine ve bunun sonucunda hücresel hasarlara neden olur. Lipit peroksidasyonunun başlamasının engellemede ve peroksidasyon sonucu oluşan metabolitlerin metabolizmasını sağlar (113, 114).

Glutasyon Redüktaz (GSH-Red)

Glutasyon redüktaz bir flavoproteindir. NADPH yardımıyla okside glutasyonun (GSSG), glutasyona indirgenmesini katalize eder. Glutasyonun indirgenmiş halde kalması GSH-Px ve CAT için önem taşır (114).



Glutasyon S-Transferaz (GST)

Glutasyon S-Transferaz sitozolde bulunmaktadır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda rolleri olan GST'ler çeşitli endojen ve eksojen bileşiklerin GSH ile konjugasyonunu katalize eder (114).



2.4.6.1.2. Enzim Olmayan Endojen Antioksidanlar

Enzim olmayan endojen antioksidanlar arasında: Glutasyon, melatonin, seruloplazmin, ferritin, transferrin, laktoferrin, ürik asit, albümin, bilirubin, hemoglobin, haptoglobin ve hemopeksin bulunmaktadır (115).

Glutasyon (GSH)

GSH, hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan en önemli antioksidan bileşiklerden biridir. GSH, glutamat, sistein ve glisinden sentezlenir. Sentezde glutasyon sentaz ve γ -glutamil sistein sentaz enzimleri katalizördür. Göz merceğini, lökositleri ve eritrositleri oksidatif hasara karşı korumada büyük önem taşır (116).

Melatonin

Melatonin, lens ve kemik iliği hücreleri, safra ve gastrointestinal sistem, over ve pineal bezden salgılanan bir hormondur. Sentezinin düzenlenmesi geceye yani karanlığa bağlıdır.

Melatonin esas olarak karaciğerde metabolize edilir ve idrar ile atılır. Dokulara ve hücelere kolay bir şekilde girebilmektedir. Melatoninin hücrel hasarın onarımında önemli bir rolü olduğu düşünölmektedir (117).

Melatonin katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek, nitrik oksit sentaz enzimini inhibe ederek, SOD aktivitesini artırarak ve GSH-Px enzimini aktive ederek antioksidan özellik göstermektedir (118).

Seruloplazmin

Plazmada major bakır içeren proteindir. Akut faz reaktanıdır ve yangısal olaylarda seviyesi artar. Ferro-oksidadz aktivitesi ile Fe^{+2} 'yi Fe^{+3} 'e okside eder. Bu sayade Fenton reaksiyonunu ve serbest radikal oluşumunu inhibe eder. Demir ve bakır bağımlı lipit peroksidasyonunu önler (119).

Ferritin, Transferrin ve Laktoferrin

Ferritin dokulardaki, transferrin dolaşımdaki, laktoferrin lökositlerdeki serbest demiri bağlar. Serbest demirin, demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdururlar veya yavaşlatırlar (119).

Ürik Asit

Pürin metabolizması sonucu oluşan ürik asit, urat oksidadzın insanlarda bulunmadığından dolayı birikir. Ozon, hipoklorid asit ve singlet oksijeni ve peroksil radikalleri için güçlü bir antioksidandır (120).

Albumin

Albumin, vücutta birçok fonksiyon göstermektedir. Ayrıca, bakır iyonuna bağlanabilmesinden dolayı hidroksil radikali ve lipit peroksidasyonunu inhibe eder (120).

Bilirubin

Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı ve yağ asitlerini peroksidasyona karşı koruma görevine sahiptir (121).

Hemoglobin, Haptoglobin ve Hemopeksin

Hemoglobin, dekompozisyona uğrayıp ortama demir vererek veya doğrudan peroksitlerle etkileşerek lipid peroksidasyonunu uyarabilir. Haptoglobulin hemoglobini, hemopeksin de hem grubunu bağlayarak demir bileşiklerinin lipid peroksidasyonunu uyarmasını engeller (88).

2.4.6.2. Eksojen Antioksidanlar

2.4.6.2.1. Vitamin Olarak Eksojen Antioksidanlar

Vitamin E (α –Tokoferol)

Poliansatüre yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan çok güçlü bir antioksidandır. Singlet oksijeni, lipid peroksit radikallerini, süperoksit ve hidroksil radikallerini indirger. Lipid peroksidasyonunu vitamin E zincir kırıcı etkisiyle sonlandırabilir (122).

Vitamin C (Askorbik asit)

İnsanda sentez edilmeyen ve diyetle alınması gereken güçlü antioksidan moleküldür. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir (123).

Karoten (Vitamin A ön maddesi)

β -karoten vitamin A'nın ön maddesidir. Süperoksit ve hidroksil radikalini temizleme, alkoksil ve peroksil radikalleriyle etkileşme ve singlet oksijenini bastırabilme gibi antioksidan etki göstermektedir (120).

2.4.6.2.2. İlaç Olarak Kullanılan Eksojen antioksidanlar

- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid anti inflamatuvar ilaçlar)
- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- Nötrofil adezyon inhibitörleri
- Sitokinler (TNF ve IL-1)
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri (120).

2.4.8. Spermde ROS Oluşması

Doymamış yağ asitleri, glikolipitler, kolesterol ve fosfolipitlerden lipid hidroperoksitleri türemektedir ve aktive olarak reaktif oksijen türlerine dönüşmektedirler. Spermde ROS'un düşük dozları kapasitasyon, hiperaktivasyon, zona ve akrozom reaksiyonlarında önemli etkilere sahiptir. ROS'un yüksek miktarlarda üretilmesi ise motilitede, DNA ve protein hasarına, sperm-oosit penetrasyon ve füzyon'unda azalmalara dolayısıyla hücre ölümlerine sebep olmaktadır (124).

Spermatozoanın mitokondriasında ve plazma membranında ROS üretimi gerçekleşmektedir. H_2O_2 spermatozoa membranlarından geçip spermatozoanın yapısal/fonksiyonel özelliklerine hasara neden olan hidroksil radikaline dönüşür. yüksek ROS varlığı oksidatif stres yaratmakta ve canlı spermatozoanın tüm spermatolojik fonksiyonları ile nükleer ve mitokondrial DNA'sında kalıcı hasarlara yol açmaktadır (125).

2.5. Sperm Analizi (Spermiyogram)

İnfertil nedenin araştırılması için erkekte yapılan öncül test sperm analizidir. Spermiyogramda semen örneği 2-5 günlük cinsel perhiz sonrası incelenir. Semen analizi semenin yoğunluğu, hacmi, likefaksiyon süresi, kıvamı, pH'ı, morfolojisi, spermelerin sayısı ve hareketlilik oranı hakkında bilgiler verir (126).

Tablo 2. Semen analizi normal değerleri (12).

Parametreler	Değerler
Volüm	2.0 ml veya daha fazla
pH	7.2 – 8.0
Sperm konsantrasyonu	20 milyon spermatozoa/ml veya daha fazla
Total sperm sayısı	40 milyon spermatozoa/ejakulat veya daha fazla
Motilite	Ejakulasyonu takiben 60 dakika içerisinde, %50 veya daha fazlasının ileri hareket göstermesi (a + b kategorisinde); veya %25 ya da daha fazlasının hızlı (a kategorisinde) progresyon göstermesi.
Morfoloji	%30 veya üzerinde normal form.
Vitalite	% 75 veya üzerinde canlı (boya almayan) spermatozoa.
Lökosit.	1 milyon/ml'den az
MAR testi	Partikül yapışmış spermatozoa oranının %10'dan az olması.
Alfa glukozidaz	20 mU/ejakulat veya üzeri
Çinko (total)	2.4 µmol/ejakulat veya üzeri
Asit fosfataz (total)	200 U/ejakulat veya üzeri
Fruktoz (total)	13 µmol/ejakulat veya üzeri.

2.5.1. Semen (Ejakülat)

Seminal vezikül, bulboüretal ve prostat bezlerinin salgıları ile epididim ve testis salgıları içindeki spermatozoonların karışması ile semen oluşur. Seminal veziküller, fosforilkolini, prostaglandinleri, koagule edici maddeleri ve besleyici madde fruktozu içerir. Prostat seminal sıvıya spermin, fosfolipidler, fosfataz ve çinko katar (126).

2.5.2. Likefaksiyon (Sıvılaşma)

Ejakülasyondan sonra semen yoğun kitle halindedir. Oda sıcaklığında ve 37 °C'ye ayarlanmış inkübatörde homojen bir numune oluşturulabilir (127).

2.5.3. Sperm Motilitesi (Hareketlilik)

İleri veya yerinde hareketli olan spermatozoonları hareketsiz olanlardan ayırt eden basit bir hareketlilik derecelendirme sistemi önerilir. Her spermatozoonun hareketliliği aşağıdaki gibi derecelendirilir (127).

- İleri hareket (Progresif Motilite; PR): hızdan bağımsız olarak doğrusal veya geniş bir daire içinde aktif olarak hareket eden spermatozoon.
- Yerinde hareket (Nonprogresif Motilite; NP): ileri doğru hareketin tüm diğer hareketlilik kalıpları, örneğin: küçük daireler halinde yüzme, başı yerinden güçlükle oynatan kamçısals hareket veya yalnızca kuyruğun kamçısals hareketi gözlenebilir.
- Hareketsizlik (İmmobilite; IM): hareketin olmaması.

Diğer bir derecelendirme sisteminde her bir spermatozoonun motilitesi hareketliliğine bağlı olarak derecelendirilir (128).

- Hızlı ileri hareket (a): 37 °C'de 25 µm/s'den yüksek hızlı
- Yavaş ya da tembel ileri hareket (b)

- Yerinde hareketli (c): 5µm/s'den düşük hızlı
- Hareketsiz

2.5.4. Vitalite

Hücre membranlarının bütünlüğüyle belirlenen spermilerin canlılık derecesi rutin olarak numunelerin hepsinde belirlenebilirse de, ileriye doğru hareketli spermilerin yaklaşık %40'dan az olduğu numunelerde vitalite önemlidir. Ölü hücrelerin yüzdesinin hareketsiz spermatozoonların yüzdesini geçmemesi gerektiğinden, bu test motilite değerlendirilmesinin doğruluğunu da kontrol edebilir (127).

2.5.5. Hacim

Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre semen hacmi 2-5 ml arasında olmalıdır (126).

2.5.6. Renk

Ejakülatın görünümü homojen, gri-opelasan bir görünüme sahiptir. Ejakülatın rengi sperm konsantrasyonuna, eritrositler varlığına ve vitamin ya da ilaç kullanımına göre değişebilir (127).

2.5.7. pH

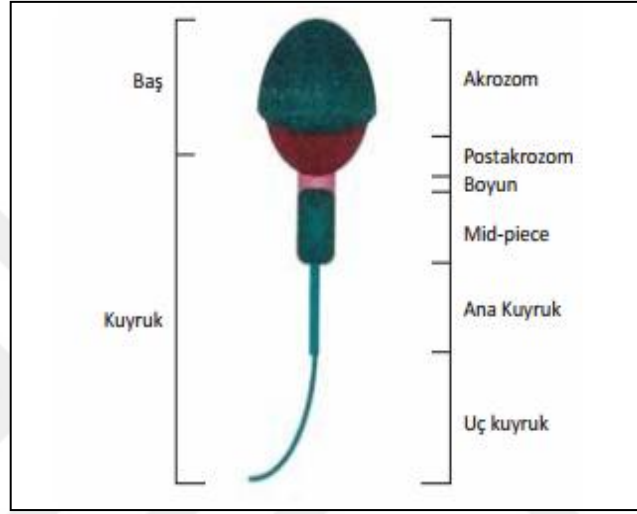
Yaklaşık bir damla semen pH kağıdına eşit olarak yayılır, bölge olarak renk değişimi düzenli olmalıdır ve kalibrasyon çubuğu ile karşılaştırıldığında pH okunur (127).

2.5.8. Viskozite

Likefaksiyondan sonra semen pipet içinden aspire edilerek yerçekimiyle damlamaya bırakıldığında oluşan iplikçiği gözleyerek viskozitesi tahmin edilir (127).

2.5.9. İdeal Spermatozoonların Değerlendirilmesi

Mikroskop altında yapılan incelemelerde, ideal bir spermatozoonun 4-5 µm uzunluğunda, 2,5-3,5 µm genişliğinde, başı oval düzgün kontrollü, iyi sınırlanmış olması gerekir. Spermatozoonun çekirdeği yoğun görünmeli ve baş bölgesini doldurmalıdır. Akrozom baş alanının %40-70 'ini kaplamalıdır. Kuyruk başın tabanında, çentiksiz, halkasız kendi üzerine bükülmemiş ve simetrik olarak yerleşmiş olmalıdır (129, 130).



Şekil 20. Normal spermin bölümleri (131).

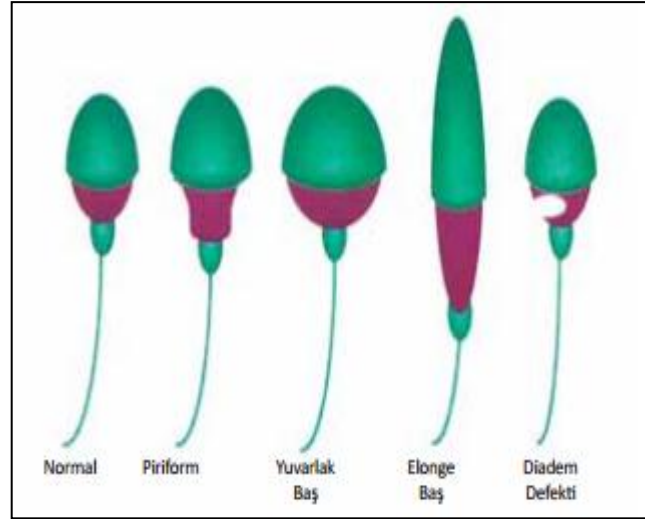
2.5.10. Sperm Malformasyonlarının Tipleri

Baş defektleri: Büyük ya da küçük, konik, piriform, yuvarlak, amorf, vakuollü (>2'den fazla vakuol, vakuoler alan boyanması %20'den fazla), çift başlı veya bunların kombinasyonu (131).

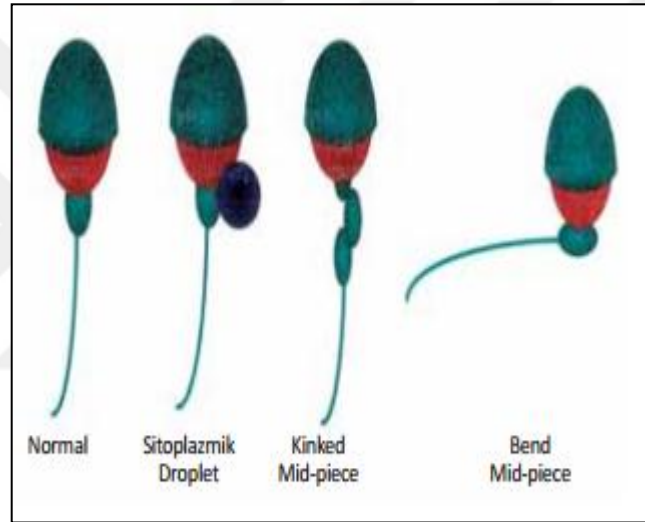
Boyun ve orta kısım defektleri: Başın asimetrik olarak orta parçaya girmesi, kalın ya da düzensiz olması, ince olması veya bunların kombinasyonu (131).

Kuyruk defektleri: Kısa, birden çok, kırık, keskin açılı, koil şekilli, düzensiz ve bunların kombinasyonları (131).

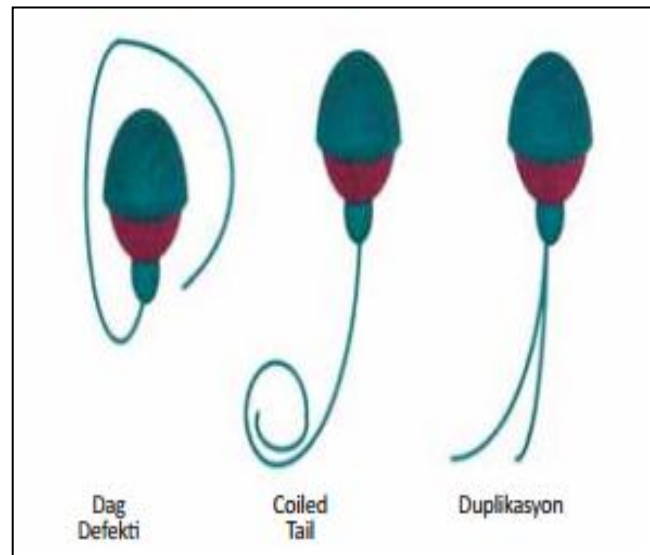
Fazla sitoplazma kalıntısı: Büyük miktarda düzensiz sitoplazma içerir ve orta kısım defektleri ile ilgilidir. Bu anormal aşırı artmış sitoplazma stoplazmik droplet değildir (131).



Şekil 21. Sperm baş defektleri (131).



Şekil 22. Sperm boyun defektleri (131).



Şekil 23. Sperme ait kuyruk defektleri (131).

2.5.11. Ejakülat Değerlendirilmesinde Terminoloji

Aspermia: Ejakülatın olmaması

Azoospermia: Ejakülatta spermin olmaması

Normozoospermia: Normal semen parametreleri

Hematospermia: Ejakülatta kan olması

Lökositospermia: Ejakülatta normalin üzerinde lökosit bulunması

Hipospermia: Ejakülat volümünün 1ml'den az olması

Oligozoospermia: Sperm konsantrasyonunun 20 milyon/ml'den az olması

Astenoospermia: Zayıf motilite veya zayıf ileri doğru hareketlilik

Teratoospermia: Normal morfoloji yüzdesinin azalmış olması

Nekrozoospermia: Tüm spermilerin ölü olması (132, 133).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya, Kasım 2015-Mart 2016 tarihleri arasında Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniğine kasık ağrısı, infertilite, testislerde şişme gibi şikayetlerle gelen ve tetkikler sonucu varikosel tanısı konan toplam 40 hasta ile kontrol grubunu oluşturmak üzere sağlıklı gönüllülerden 40 kişi bilgilendirilmiş onay formları imzalatıldıktan sonra hasta ve kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Çalışmamızda toplanan kanlardan biyokimyasal ve semen örneklerinden immünohistokimyasal inceleme yapıldı.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Steril semen toplama kabı

Nüve EN 400 marka etüv

Nüve NF 615 marka santrfüj

Otomatik pipet

Lam

Poly-L lizin kaplı Lamel

Makler Counting Chamber Sefi-Medical Instrumentes Ltd.

Ph paper

Kronometre

Dikey şale

Kurutma kağıdı

Enjektör

Metanol

Aseton

Aleminyum Folyo

Fluoresan ataçmanlı Zeiss Axioplan 2 mikroskop

SQA-V Otomatik Sperm Analizörü

Otoanalizör (Abbott Aeroset)

Vorteks (DCA-VF-2)

Otomatik pipetler (Gilson)

Visible spektrofotometre (Jenway 6800 UV/VİS)

Hassas terazi (Sartorius)

Su banyosu (Nüve BM 402)

pH metre (Hanna) marka cihaz

Rel Assay marka kimyasal kitler

3.2. Semen Örneğinin Alınması

Hastaların 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası spermiogramları elde edildi. Semen örneğini Mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından özel olarak hazırlanan spermiyogram odasında alındı. Semen örneği mastürbasyon sonrasında, laboratuvar personeli tarafından verilen steril kap içerisine toplandı. Semen örneği toplanırken hastanın uyduğu kurallar:

- Örnek vermeden önce eller ve penis su ile yıkayıp, kağıt havlu ile kurulandı.
- Örnek kabının içerisi steril (yani mikropsuz) olduğu için, kabın içerisine dokunulmadı.
- Örnek kazanım sırasında herhangi bir kayganlaştırıcı madde kullanılmadı (sabun, krem, tükürük vb.).
- Semen örneğinin hepsi kabın içerisine toplandı. Şayet semen örneğinin tamamı kabın içerisine toplanamazsa, mutlaka laboratuvar personeline bilgi verilmesi önerildi.

3.3. Hasta ve Sağlıklı Grubun Seçimi

Varikoselli grubun oluşumuna, varikosel tedavisi gören, testis travması, inguinal herniorafi, hidroselektomi, varikoselektomi, vazektomi, üriner sistem enfeksiyonu, semende lökosit > 1 M/ml ve infertilite nedeni ile tedavi gören bireyler dahil edilmedi.

Sağlıklı grubun oluşumuna, varikosel, testis travması, inguinal herniorafi, hidroselektomi, varikoselektomi, vazektomi, üriner sistem enfeksiyonu, semende lökosit > 1 M/ml ve infertilite nedeni ile tedavi gören bireyler dahil edilmedi.

3.4. Spermogram

Örnekler 37°C'de etüvde 30-60 dk inkübe edilerek likefiye olması sağlandı. Semen likefiye olduktan sonra WHO kriterlerine göre; sayı, motilite, volüm, pH ve morfoloji yönünden değerlendirilmek üzere ve TAS/TOS incelemesi için ayrıldı. Tüm sperm parametreleri için SQA-V Otomatik Sperm Analizörü kullanıldı.

3.5. İmmnihistokimyasal İnceleme

3.5.1. Spermilerin boyamaya Hazırlanması

Hasta ve kontrollerden semen rneği steril toplama kabına masturbasyon yöntemi ile alındı. Elde edilen semene 1/1 oranında sperm wash solüsyonu eklenerek 1200 devirde 10 dk santrifüj edildikten sonra 1ml'de 30-35 x 10⁶ sperm hücresi olacak Şekilde seyreltilmiş spermelerden 30 mikrolitre alınarak poly-L lizin kaplı lameller üzerine yayıldıktan sonra örnekler aşağıdaki Őekillerde tespit edilip hücrelerin cama yapışması için 30 dk beklendi.

3.5.2. Tespit ve Permeabilizasyon

3.5.2.1. Metanolle ve asetonla tespit

-20°C derecedeki metanol ile 20 dk ve ardından soğuk asetonla 2 dk tespit ve permeabilize edildi.

3.5.2.2. Saklama

Lamlar iki lam sırt sırta gelecek şekilde alüminyum folyo ile sarıldı ve -80°C derecede saklandı.

3.5.2.3. İmmünfluoresan Boyama

- -80°C dereceden çıkarılan lamellerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
- 3x5 dk Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkandı.
- 30 dk PBS çözeltisi ile seyreltilmiş keçi serumu (normal goat IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) ile yıkandı.
- % 1.5 keçi serumu katılmış Primer antikorla (caspase-3 Antibody, mouse monoclonal IgG_{2a}, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) 60 dk inkübe edildi.
- 3 X 5 dk PBS ile yıkandı.
- % 1.5 keçi serumu katılmış sekonder antikorla (goat anti-mouse IgG-FITC, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA) 60 dk karanlık ortamda inkübe edildi.
- 3 X 5 dk PBS ile yıkandı.
- Kapatma solusyonu (UltraCruz® Mounting Medium) ile lamel kapatıldı
- Fluoresan ataçmanlı Zeiss Axioplan 2 mikroskopta incelendi.

3.6. Boyamaların Değerlendirilmesi

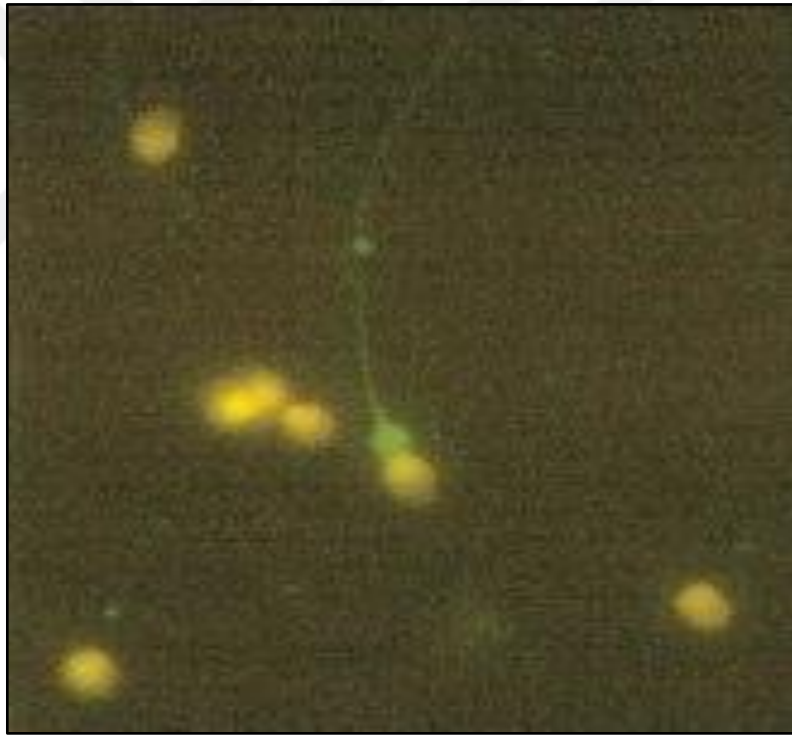
Her birey için en az 5 farklı alanda, 45-55 adet sperm hücresi sayıldı. Sperm hücreleri boyanma yerleri ve şiddetine göre puanlandı (0,1, 2). Her birey için elde edilen değerlerin, yüzdelikleri hesaplanarak istatistiki olarak değerlendirildi.

Tablo 3. Sperm hücrelerinin boyanma yeri ve skoru.

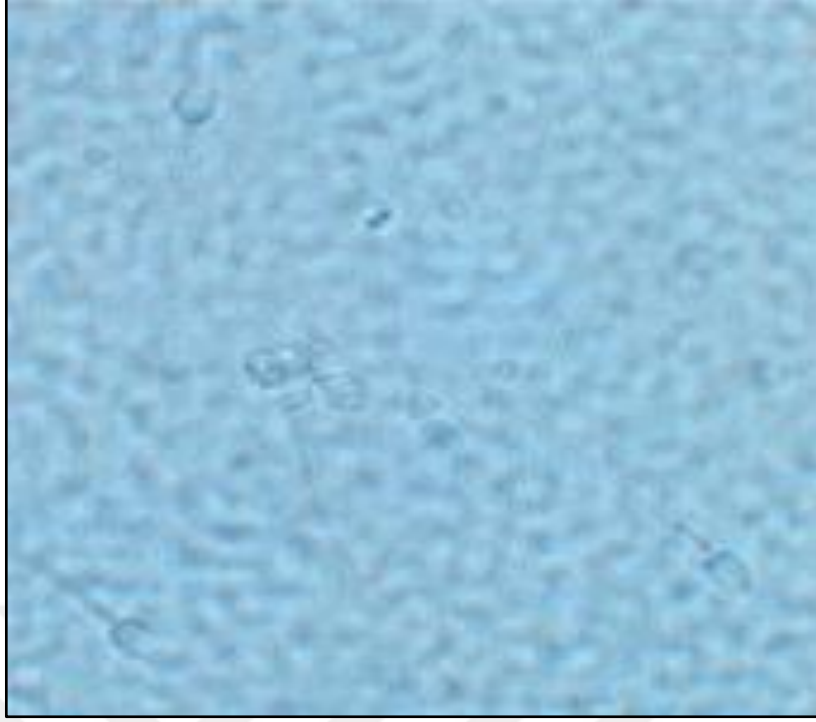
Skor	Boyanma Yeri
0	Spermde hiç boyanma yok veya çekirdekte çok hafif boyanma var
1	Çekirdek arka kısmı, boyun ve orta parçada hafif boyanma
2	Çekirdek arka kısmı, boyun ve orta parçada kuvvetli boyanma

3.8. İnsan Sperminde Kaspaz-3 Boyama

İnsan ejakülatında kaspaz aktivitesi ve apoptotik markırların ölçüldüğü çalışmada, fluoresan mikroskobu ile sperm hücrelerinin (1 pozitif ve 5 negatif hücre) immünboyama kaspaz-3 sonuçları gösterilmiştir (134).



Şekil 24. Sperm mid-piece kısmında yoğun yeşil fluoresan görünümü (1 puan) (134).



Şekil 25. Işık mikroskobu ile spermlerin görünümü (şekil 24 ile aynı alan) (134).

3.7. Biyokimyasal İnceleme

3.7.1. Serum ve Seminal Plazmanın Toplanması ve Saklanması

TAS, TOS ve OSİ incelemesi için ayrılan semen ve kanlar 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edildikten sonra plazmaları alınarak ependorf tüplerine alındı ve -20°C derecede saklandı.

3.7.2. Total Antioksidan Seviye (TAS) Ölçümü

Örneklerin total antioksidan seviye (TAS) düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi. Dokulardaki TAS sonuçları Trolox Equivalent/L olarak ifade edildi (135).

3.7.3. Total Oksidatif Stres (TOS) Ölçümü

Örneklerin toplam oksidan status (TOS) düzeyi, Rel Assay marka ticari kitler kullanılarak ölçülmüştür. Ölçüm testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equivalent/ L olarak ifade edildi (136).

3.7.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Ölçümü

Oksidatif Stresin bir göstergesi olarak gösterilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ), Toplam Oksidan Status/Seviye (TOS) düzeylerinin Toplam Antioksidan Status/Seviye (TAS) düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir.

3.8. Yapılan İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon 11.5 (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolmogorov-Smirnov analizi ile sonuçların normal dağılıma sahip olup olmadığı araştırılmıştır. Normal dağılım gösteren değişkenler için, iki grup arasındaki ortalama farkın önemi parametrik Student's t testi ile karşılaştırılmıştır. Normal dağılıma uymayan değişkenler ise non-parametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) ve median \pm interquartilerange olarak ifade edildi. Parametreler arasındaki ilişki, Spearman korelasyon analizi ile araştırılmıştır. $p < 0,05$ 'den küçük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar Boxplot ve Scatterplot grafikleri ile gösterilmiştir.

4.BULGULAR

Tablo 4’de varikoselli ve kontrol grubunun seminal plazmalarındaki antioksidan-oksidan parametreleri gösterilmektedir. Tabloda da görüldüğü gibi varikoselli hastaların TAS seviyesi sağlıklı gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu. TOS seviyesine bakıldığında ise varikoselli grubun sağlıklı grubu göre yükseldiği görüldü ve bu da istatikselsel olarak anlamlı bulundu. Toplam oksidan seviyenin, toplam antioksidan seviyeye oranının yüzde ifadesi olarak hesaplanan OSI, varikoselli grupta sağlıklı gruba göre anlamlı derecede yükseldiği tespit edildi.

Tablo 4. Varikoselli ve sağlıklı grubun seminal plazma örneklerindeki TAS, TOS ve OSI düzeyleri.

Gruplar	Varikoselli (n=40)	Sağlıklı (n=40)	P
TAS, mmol Troloks Eqv./L	0,93 ± 0,28	1,19 ± 0,27	<0,001
TOS, µmol H ₂ O ₂ Eqv./L	8,32 ± 1,97	7,25 ± 1,81	0,013
OSİ, Arbitrary Unit	1,01 ± 0,48	0,63 ± 0,22	<0,001

❖ Ortalama ± standart sapma

Tablo 5’de varikoselli ve kontrol grubunun serumlarındaki oksidan-antioksidan parametreleri gösterilmektedir. TAS seviyesi varikoselli grupta kontrol grubuna göre düşük görüldü. Ancak, bu düşüş anlamlı bulunmadı. TOS seviyesi varikoselli grupta kontrol grubuna göre artış görüldü. Ancak, bu artış anlamlı değildi. OSI seviyesi ise varikoselli grupta kontrol grubuna oranla yüksek bulundu. Ancak, bu yükseliş anlamlı değildi.

Tablo 5. Varikoselli ve sağlıklı grubun serum örneklerindeki TAS, TOS ve OSI düzeyleri.

Gruplar	Varikoselli (n=40)	Sağlıklı (n=40)	p
TAS, mmol Troloks Eqv./L	0,51 ± 0,14	0,56 ± 0,15	0,124
TOS, µmol H ₂ O ₂ Eqv./L	14,53 ± 4,73	14,22 ± 4,34	0,754
OSİ, Arbitrary Unit	3,36 ± 2,44	3,07 ± 2,54	0,591

❖ Ortalama ± standart sapma

Tablo 6’da varikoselli grup ile sağlıklı grubun spermiyogram parametreleri gösterilmektedir. İleri hareket, toplam hareket, morfoloji, sayısı (M/ml), hacim ve toplam sperm sayısı parametrelerinde varikoselli grupta sağlıklı gruba göre düşüş görüldü. Ancak, bunlardan ileri hareket, toplam hareket ve morfoloji parametrelerindeki düşüş anlamlı bulundu. Yerinde hareket, hareketsizlik ve yaş parametrelerinde artış tespit edildi. Ancak, bu parametrelerden hareketsizlik sadece anlamlı bulundu.

Tablo 6. Varikoselli ve sağlıklı grubun spermiyogram sonuçları ve yaşları.

Gruplar Testler	Varikoselli (n=40)	Sağlıklı (n=40)	P
İleri Hareket, %	33,00 ± 19,50	46,00 ± 13,50	<0,001
Yerinde hareket, %	11,50 ± 9,0	10,50 ± 5,75	0,286
Hareketsizlik, %	54,50 ± 27,0	45,50 ± 15,0	<0,001
Toplam Hareket, %	45,50 ± 27,0	54,50 ± 15,0	<0,001
Morfoloji, %	7 ± 5,0	11,0 ± 3,75	<0,001
Sperm Sayısı, M/ml	48,85 ± 88,87	87,40 ± 67,37	0,071
Hacim, ml	2,50 ± 1,60	3,00 ± 1,5	0,726
Toplam Sperm Sayısı, M	134,65 ± 190,07	157,60 ± 172,37	0,118
Yaş	27,08± 7,06	25,90±4,84	0,368

❖ Ortalama ± standart sapma

Tablo 7’de varikoselli ve sağlıklı grubun sperm hücrelerindeki Kaspaz-3’ün immün boyama (İB) değerleri gösterilmektedir. Varikoselli grupta sağlıklı gruba göre düşüş gözlemlendi ve bu da anlamlı bulundu.

Tablo 7. Varikoselli ve sağlıklı grubun sperm örneklerinde Kaspaz-3’ün İB sonuçları.

Gruplar Testler	Varikoselli (n=40)	Sağlıklı (n=40)	P
İB Kaspaz 3, %	14,27 ± 26,63	25,51 ± 30,70	0,028

❖ Median ± interquartilerange

Tablo 8. Varikoselli grubun seminal plazmalarındaki TAS, TOS ve OSİ ile Kaspaz-3'ün korelasyonu.

Varikoselli Grup		TOS	OSİ	İB Kaspaz 3, %
TAS	<i>r</i>	-,064	-,802	,044
	<i>p</i>	,686	,000	,787
TOS	<i>r</i>		,605	-,016
	<i>p</i>		,000	,922
OSİ	<i>r</i>			-,088
	<i>p</i>			,588

Tablo 9. Varikoselli grubun Spermiyogram parametreleri ile Kaspaz 3'ün Korelasyonu.

Testler		PM, %	NM, %	İM, %	TM, %	M, %	S, M/ml	H, ml	TSS, M
İBK-3, %	<i>r</i>	,199	-,097	-,261	,261	,297	-,053	,226	,100
	<i>p</i>	,219	,551	,104	,104	,062	,754	,172	,550
PM, %	<i>r</i>		-,004	-,868	,868	,853	,102	,157	,209
	<i>p</i>		,980	,000	,000	,000	,532	,335	,195
NM, %	<i>r</i>			-,284	,284	,078	-,865	,014	-,806
	<i>p</i>			,068	,068	,623	,000	,933	,000
İM, %	<i>r</i>				-1,000	-,895	,165	-,169	,065
	<i>p</i>				,000	,000	,310	,298	,691
TM, %	<i>r</i>					,895	-,165	,169	-,065
	<i>p</i>					,000	,310	,298	,691
M, %	<i>r</i>						-,003	,217	,113
	<i>p</i>						,986	,180	,488
S, M/ml	<i>r</i>							-,295	,871
	<i>p</i>							,072	,000
H, ml	<i>r</i>								,119
	<i>p</i>								,477

- ❖ İmmün boyama Kaspaz-3 (İBK-3), İleri hareket (PM), yerinde hareketlilik (NM), hareketsizlik (İM), toplam hareketlilik (TM), morfoloji (M), sayı (S), hacim (H), toplam sperm sayısı (TSS)

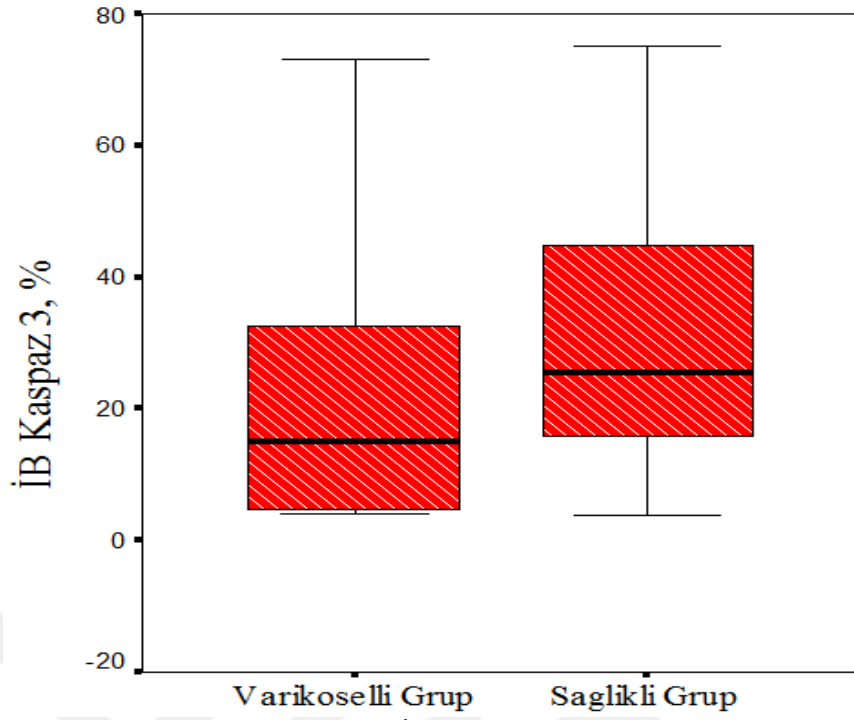
Tablo 10. Sağlıklı grubun seminal plazmalarındaki TAS, TOS ve OSİ ile Kaspaz- 3'ün Korelasyonu.

Sağlıklı Grup		TOS	OSİ	İB Kaspaz 3, %
TAS	<i>r</i>	,090	-,617	,293
	<i>p</i>	,587	,000	,070
TOS	<i>r</i>		,683	-,054
	<i>p</i>		,000	,746
OSİ	<i>r</i>			-,224
	<i>p</i>			,171

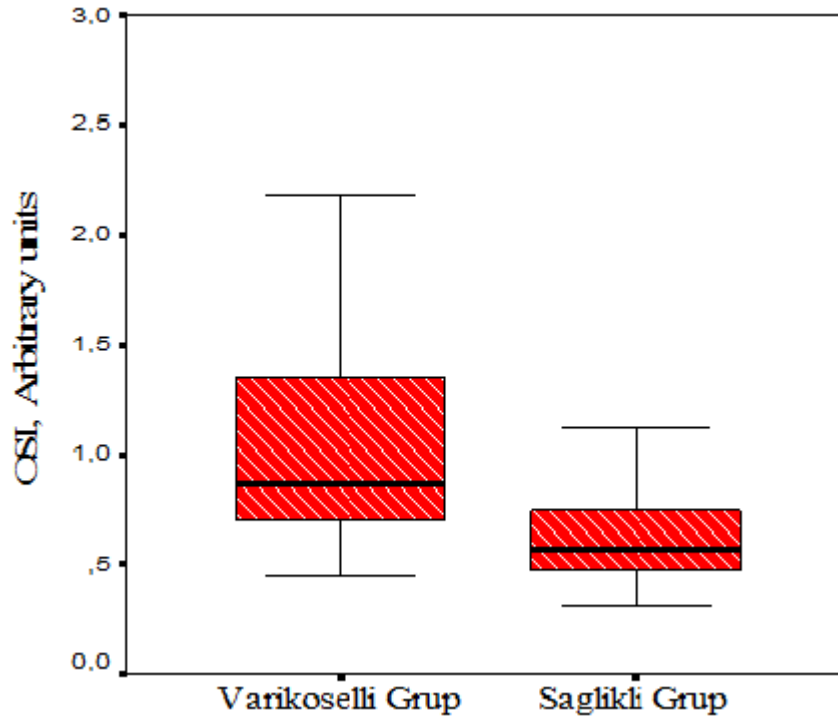
Tablo 11. Sağlıklı Gönüllerin sperm örneklerinde Spermiyogram ile Kaspaz 3'ün Korelasyonu.

		PM, %	NM, %	IM, %	TM,%	M,%	S, M/ml	H, ml	TSS, M
İBK-3, %	<i>r</i>	-,085	,185	,003	-,003	-,143	-,050	-,117	-,028
	<i>p</i>	,603	,253	,988	,988	,379	,761	,472	,862
PM, %	<i>r</i>		,215	-,909	,909	,861	-,289	,373	-,158
	<i>p</i>		,182	,000	,000	,000	,071	,018	,329
NP, %	<i>r</i>			-,566	,566	,194	-,837	,366	-,675
	<i>p</i>			,000	,000	,231	,000	,020	,000
IM, %	<i>r</i>				-,100	-,769	,591	-,424	,435
	<i>p</i>				,000	,000	,000	,006	,005
TH, %	<i>r</i>					,769	-,591	,424	-,435
	<i>p</i>					,000	,000	,006	,005
M, %	<i>r</i>						-,153	,378	-,029
	<i>p</i>						,345	,016	,858
S, M/ml	<i>r</i>							-,316	,855
	<i>p</i>							,047	,000
H, ml	<i>r</i>								,155
	<i>p</i>								,341

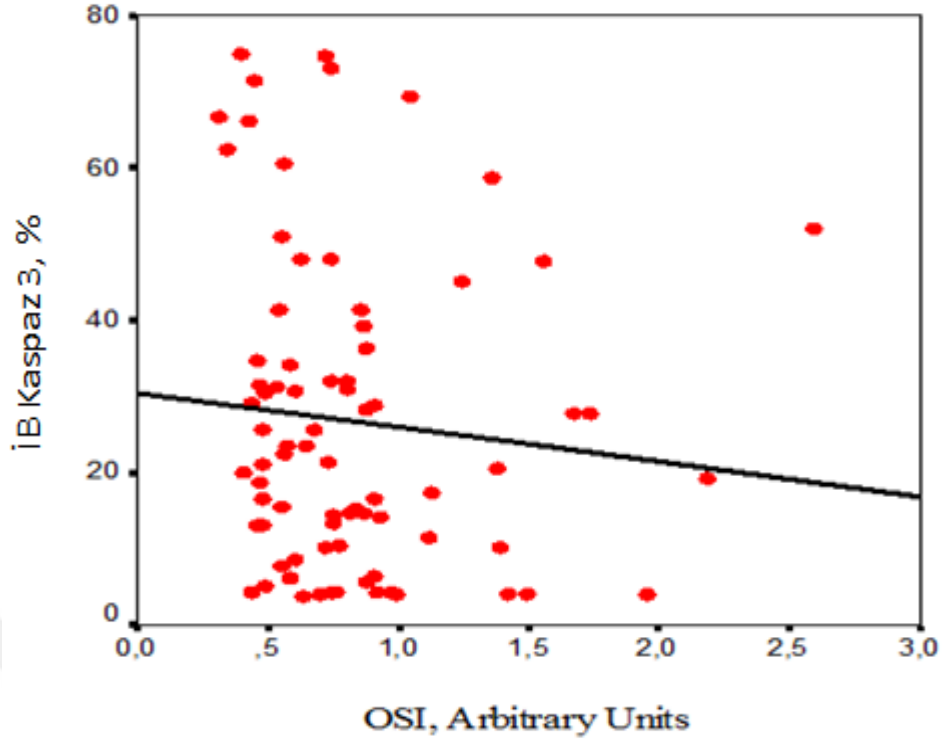
- ❖ İmmün boyama Kaspaz-3 (İBK-3), İleri hareket (PM), yerinde hareketlilik (NM), hareketsizlik (IM), toplam hareketlilik (TM), morfoloji (M), sayı (S), hacim (H), toplam sperm sayısı (TSS)



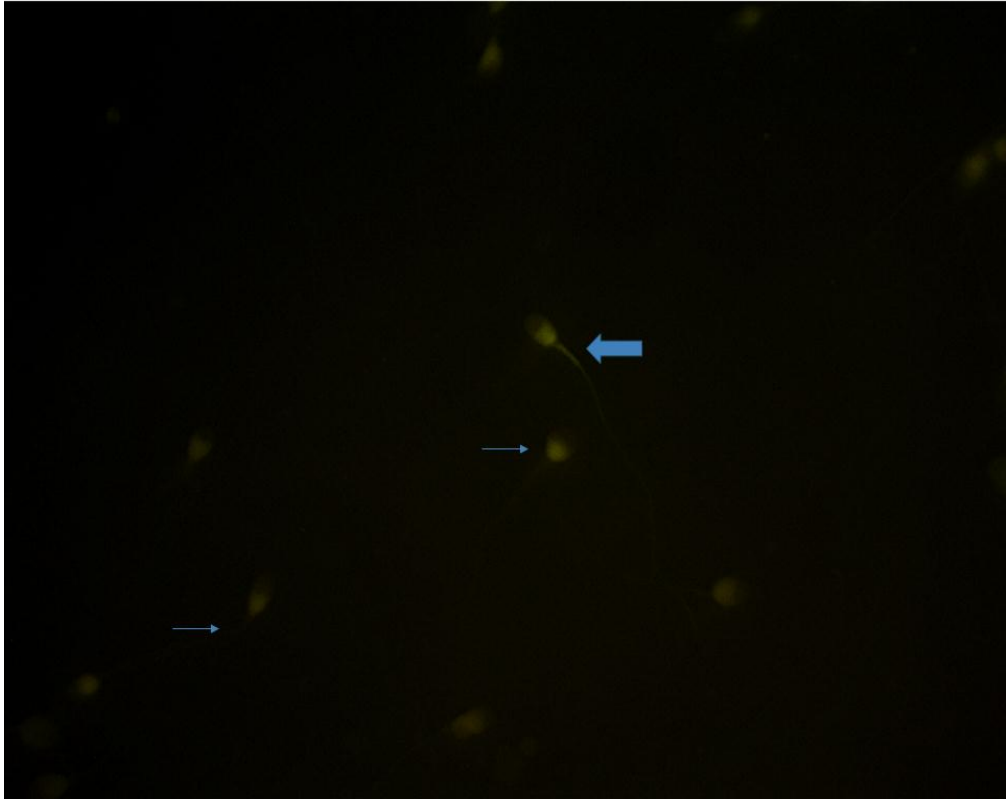
Şekil 26. Varikoselli grup ile sağlıklı grubun İB Kaspaz-3, % boyamalarının dağılım, ortalama ve standart sapma grafiği.



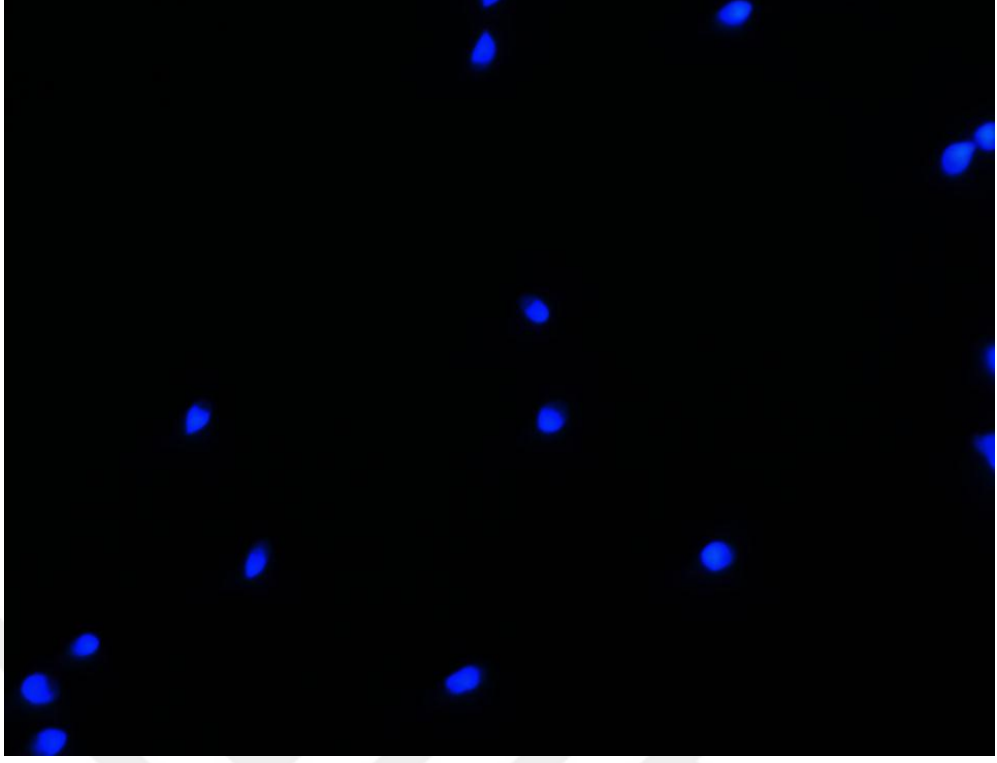
Şekil 27. Varikoselli grup ile sağlıklı grubun OSI seviyesinin dağılım, ortalama ve standart sapma grafiği.



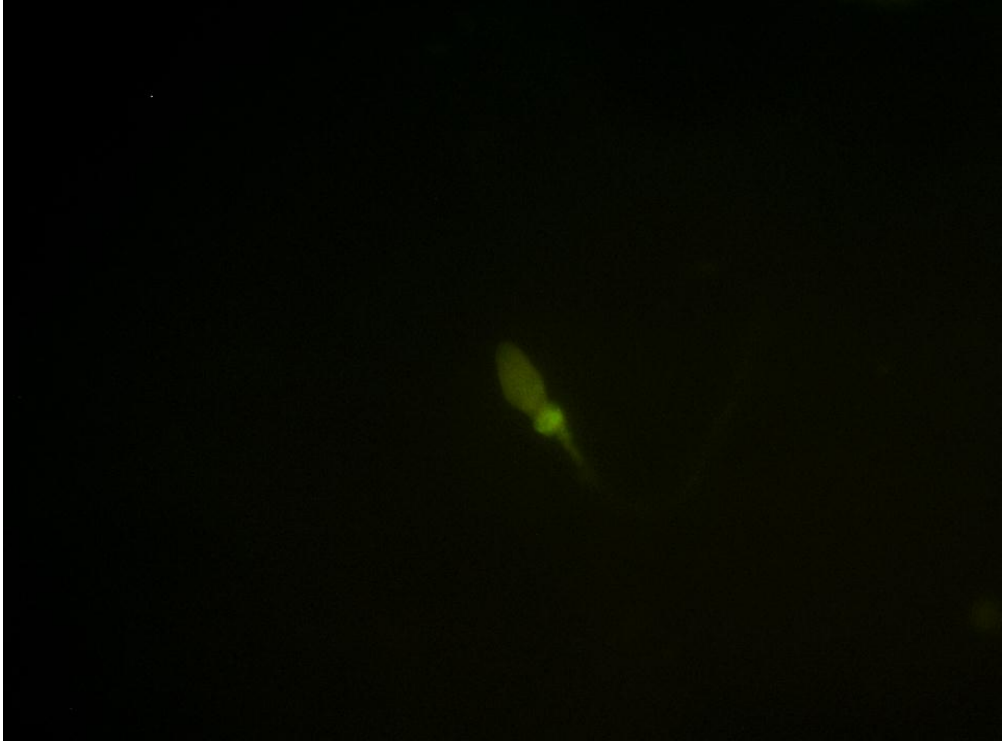
Şekil 28. Varikoselli grup ile sağlıklı grubun İB Kaspaz-3, % ile OSI'nin Scatter Analizi.



Şekil 29. Kaspaz-3'ün boyanmasının gösterimi (x100 Büyütme) (kalın ok 2, ince ok 1 puan).



Şekil 30. Şekil 29'daki sperm hücrelerinin DAPI ile boyanan çekirdekleri.



Şekil 31. Anormal morfoloji gösteren sperm hücresi (2 puan).



Şekil 32. Şekil 31’de gösterilen sperm hücresinin DAPI İle boyanan çekirdeği.

5. TARTIŞMA

Varikosel %15-20 oranında yetişkin erkek popülasyonunda görülmektedir. İnferilite nedeni ile kliniklere başvuran erkeklerde ise %21-40 oranı ile en sık infertilite nedenidir (142, 143). Son yıllarda varikosel patofizyolojisi üzerine pek çok çalışma yapılmakta ve uygun tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Varikoselde, testis dokusunda dejeneratif değişiklikler, semen parametrelerinde bozulma, germ hücre kayıpları, spermatogenetik aktivite azlığı saptanan en sık patolojik değişikliklerdir (144). Varikoselin patogenezindeki önemli teorileri arasında, hipertermi, venöz basınç, renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu, apoptoz, oksidatif stres, testiküler kan akımı ve testis-interstisyel sıvı ilişkisi bulunmaktadır (11).

Çalışmamızda da incelenen ve varikoselin patogenezinde yer alan programlı hücre ölümü ya da apoptozis ; multisellüler organizmalarda hücre ölümü ve hücre çoğalması arasındaki dengenin devamını sağlayan önemli bir mekanizmadır. Apoptozis, farklı stimulanlar ve stres faktörlerine bağlı olarak beklenen zaman dışında ya da kontrol dışı gerçekleşebilir (145). Normal spermatogenez sırasında, yetişkin erkeklerin testislerindeki olgun sperm hücrelerinin %25-75'inin azaldığı tahmin edilmektedir. Apoptozisin normal spermatogenez sürecinde iki önemli rolü vardır. Bunlardan ilki Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıda germ hücre popülasyonunu sınırlandırmak, ikincisi de anormal spermatozoonun azaltılmasında seçici olmaktır. Apoptozis ile ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında oluşur (146).

Omurgalılarda kaspazlar apoptotik yolda etkili proteinlerdir ve enzim olarak görev yaparlar. Öncelikli olarak inaktif proteinler olarak sentezlenen bu enzimler kaspaz kaskadı oluşturarak aktive edilebilirler. Kaspaz-3, apoptozis varlığı için önemli bir göstergedir. Bu yüzden, kaspaz-3 testiküler germ hücreleri için önemli bir apoptozis düzenleyicisi olabilir (151). Litaretürde, varikoselli bireylerde veya deneysel varikosel oluşturulan deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalarda apoptozisin artışı ve düşüşü bildirilmektedir.

Şimşek ve arkadaşları TUNEL yöntemini kullanarak apoptozis varlığını değerlendirmiştir. 29 birey üzerinde yapılan araştırmada (24 varikoselli hasta ve 5 kontrol

grubu) kontrol grubunun testis dokusunda apoptozis varlığı çok nadir olduğu görmüşlerdir. Toplam germ hücre sayısı başına apoptotik hücrelerin ortalama yüzdesi kontrol grubunda %2 ve varikosel grubunda %14.7 hesaplamışlardır (147). Hurley ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, varikoselli erkeklerin seminifer tübüllerinde normal kontrol grubuna göre çok daha fazla apoptotik çekirdeğin varlığını saptamışlardır (148). TUNEL yöntemi ve elektron mikroskobu ile insan sperm hücrelerinde apoptozisi tespit etmek için yapılan bir çalışmada, varikoselli erkeklerin ejakülatlarında sperm hücrelerinin %10 apoptotik, normal erkeklerde ise bu oran %0.1 bulunmuştur (146). Lin ve arkadaşlarının sperm hücrelerinde yaptığı çalışmada, varikoselli hastalarda (29%) apoptozis kontrol grubuna (9%) göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (150).

Tanaka ve arkadaşları varikoseli olan 26 infertil erkeğin testis örneklerinde immünohistokimyasal yöntem kullanarak apoptozis ile ilgili olan Bcl-2, Bax, kaspaz-1 ve kaspaz-3 proteinlerini incelemişlerdir. Varikoseli olan hastalarda kontrol grubuna kıyasla boyanan kaspaz-3 önemli miktarda düşük bulunmuştur (151). Fujisawa ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen çalışmada, apoptozis seviyesi varikoselli hastalarda kontrol grubuna göre belirgin derecede daha düşük bulunmuştur (152).

Bizim yaptığımız çalışmada, varikoselli ve sağlıklı gruptaki bireylerin sperm hücrelerinde immün boyama ile Kaspaz-3 seviyeleri araştırıldı. Varikoselli grupta sağlıklı gruba göre anlamlı bir düşüş bulundu. Apoptozisin varikoselde azaldığı sonucunu bulan diğer çalışmalarda bizim sonucumuzu desteklemektedir.

Diğer bir teori ise oksidan-antioksidan dengenin bozulması sonucu oluşan oksidatif strestir. Serbest radikaller fizyolojik koşullarda spermatazoanın kapasitasyonunda, hiperaktivasyonunda ve füzyonunda önemli rol oynarlar. Seminal plazmada serbest radikallerin zarar verici etkilerini engelleyen enzimatik ve non-enzimatik mekanizmalar bulunmaktadır (124, 125).

Oksidatif stres sonucu hücre fonksiyonları olumsuz yönde etkilenmektedir. Semendeki reaktif oksijen ürünlerinin kaynağı spermatazoa ve fagositik lökositlerdir. Özellikle motilitede azalma olmak üzere sperm fonksiyonlarında bozulma meydana gelir. Reaktif oksijen ürünlerinin sperm metabolizması, morfolojisi, motilitesi ve fertilizasyon kapasitesi üzerinde

zararlı etki yaptıkları bilinmektedir. Varikoselli bireylerde ROS'un infertilite ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (153, 154).

Semen örnekleri değerlendirildiğinde, ROS konsantrasyonu varikoseli olanlarda olmayanlara oranla yüksek bulunmuştur (154). Başka bir çalışmada, varikoselli infertil ile varikoselli fertil bireylerde sırasıyla ROS konsantrasyonu %80 ve %77 bulunmuştur. Ancak, varikoseli olmayan fertil bireylerde bu oran %20'dir (155). Başka bir çalışmada da ROS miktarı varikoselli hastalarda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek, toplam antioksidan seviyesi daha düşük bulunmuştur (119). Oksidatif stres ile varikosel arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, seminal sıvıdaki total antioksidan seviyesi varikoseli olan bireylerde azaldığı bulunmuştur (149). Bir diğer çalışmada, varikoselli olgularda spermatik ve periferik ven MDA düzeyleri araştırılmıştır. Spermatik ven MDA düzeyleri periferik venden daha yüksek bulunmasına rağmen anlamlı değildi. Aynı zamanda periferik vendede MDA düzeyleri anlamsız bulundu (156).

Bizim çalışmamızda daha önceki çalışmalara benzer sonuçlar bulundu. Varikoseli ve sağlıklı bireylerde periferik vendede ve seminal plazmada oksidatif stres göstergeleri olan TAS, TOS, OSİ parametrelerini inceledik. TAS seviyesi sağlıklı gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu. TOS seviyesi ise anlamlı derecede yüksek tespit edildi. Ancak, varikoselli ve kontrol grubunun serumlarındaki oksidan-antioksidan parametreler incelendiğinde; TOS ve OSİ varikoselli grupta kontrol grubuna göre yükseldiği ama anlamlı olmadığı ve TAS seviyesinin ise düştüğü ve bununla anlamlı olmadığını tespit ettik.

Birçok çalışma varikosel ile düşük sperm kalitesi arasında korelasyon olduğunu göstermektedir. 9034 varikoselli erkeğin dahil edildiği bir çalışmada, varikoselli hastaların testis volümünde ve toplam sperm konsantrasyonunda düşüş olduğunu ileri sürmektedir. Ancak morfoloji ve motilite gibi diğer sperm parametreleri varikoselden etkilenmemiştir (137). Villeneuve-Diaz ve arkadaşlarının yaptığı 40 varikoselli 40 fertil birey üzerinde yaptığı çalışmada, varikoselli hastaların kontrol grubuna göre tüm sperm parametrelerinin düştüğünü bildirmiştir (138). Chehval ve Purcell'in yaptığı çalışmada varikoselli hastaların sperm parametrelerinde önemli bir bozulma olduğunu saptamıştır (139). Haans ve arkadaşlarının çalışmasında, varikoselli erkeklerde toplam sperm konsantrasyonu ve sol testis volümü anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Ancak, morfoloji ve motilitede anlamlı fark

bulunmamıştır (140). Birçok çalışma varikosel ile düşük semen kalitesi arasında korelasyon göstermektedir. Bu korelasyonların bazıları tüm sperm parametrelerinde bazıları ise birkaç sperm parametreleri üzerindedir (141).

Bizim çalışmamızda bazı sperm parametrelerinin varikoselli hastalarda bozulduğunu tespit ettik. İleri hareket, toplam hareket, morfoloji, sayısı (M/ml), hacim ve toplam sperm sayısı parametrelerinde varikoselli grupta sağlıklı gruba göre düşüş görüldü. Ancak, bunlardan ileri hareket, toplam hareket ve morfoloji parametrelerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Yerinde hareket, hareketsizlik ve yaş parametrelerinde artış tespit edildi. Ancak bu parametrelerden hareketsizlik sadece anlamlı bulundu.



6. SONUÇ

Varikoselin patofizyolojisinde çeşitli hipotezler ileri sürülmektedir; bunlar arasında oksidatif stres ve apoptozis bulunmaktadır. Oksidatif stres göstergeleri olan TAS, TOS ve OSİ seviyelerini ölçtük ve apoptozis göstergesi olan Kaspaz-3 varlığını değerlendirdik. Aynı zamanda, varikoselin sperm parametrelerine olan etkisini ve apoptozisin bu parametrelerle ilişkisini inceledik.

Varikoselli hastaların seminal plazmadaki TOS ve OSİ seviyelerinde anlamlı bir artma ve TAS seviyesinde de anlamlı bir azalma tespit ettik. Kaspaz-3 seviyesi ise varikoselli hastalarda sağlıklı kişilere göre anlamlı bir düşüş bulduk. Varikoselin birçok spermiyogram parametresi üzerine olan negatif etkisini gördük.

Bulgularımız ışığında; Kaspaz-3, varikoselli erkeklerin testislerinde önemli bir apoptozis düzenleyicisi olabilir ve ekspresyonu da oksidatif stres gibi çeşitli faktörlerle kontrol edilebilir. Varikoselli hasta grubunda artmış olan oksidatif stresin antioksidanları tüketerek total antioksidan seviyenin düşmesine neden olduğunu ve ayrıca muhtemelen apoptozisinde bu hastalarda düşük bulunmasına katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz.

7. KAYNAKLAR

1. Luiz Carlos Junqueira, Jose Carneiro. Temel Histoloji (Çev. Ed: Aytekin Y. ve Solakoğlu S.), Nobel Tıp Kitabevleri, 10. Baskı, İstanbul, 2006.
2. Tekelioğlu M. Özel Histoloji, ince yapı ve gelişme, Erkek Üreme Sistemi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları, 1. baskı, Ankara 2002:231-244.
3. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş (Çev. Ed: Demir R.) Abraham L. Kierszenbaum, MD, PhD. Bölüm 20, Palme yayıncılık, Ankara, 2006.
4. Leslie P.Gartner, James L.Hiatt. Color Textbook of Histology. Chapter 21 Male Reproductive System.
5. Gartner LP, Hiatt JL, Color Textbook Histology, W.B. Saunders Company, 2. Baskı, New York, 2001:487-508.
6. Temel Histoloji, (Çeviri editörü Solakoğlu S. ve Aytekin Y.) Nobel Tıp Kitapevleri, 2009: 419–434.
7. Özdamar S, Çetin N Sorkun H. Genel Embriyoloji, E.Ü.T.F Yayınları Kayseri, 2002:4-15.
8. Aras İ. Erkek İnfertilitesinde Semen Parametreleri İle Sperm Kromozom Anöploidi Sıklığı İlişkisinin Arastırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, 2009.
9. Sermin P, Histoloji, Uludag Üniversitesi Yayınları, 1. baskı, 1990:260-287.
10. Susan Benoff, Bruce R.Gilbert. Varicocele and male infertility: Part I Preface. Human Reproduction Update, Vol.7, No.1 pp. 47-54, 2001.

11. Ricardo Miyaoka, Sandro C. Esteves. A Critical Appraisal on the Role of Varicocele in Male Infertility. Hindawi Publishing Corporation Advances in Urology, volume 2012, Article ID 597495, 9 pages doi:10.1155/2012/597495.
12. Fikret Erdemir F, Şahin Kılıç. Varikosel. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2011;3(2):1-11.
13. David C. Saypol. Varicocele. American Society of Andrology, 1981; 2:61-71.
14. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. Hum Reprod Update, 2001;7(5):473-81.
15. Braedel HU, Steffens J, Ziegler M, Polsky MS, Platt ML. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. J Urol. 1994;151(1):62-6.
16. Dahl HV HJ. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. Surg Gynecol Obstet, 1959;108:697-705.
17. Zorgniotti AW, Macleod J. Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. Fertil Steril, 1973;24(11):854-63.
18. Jockenhovel, F., Grawe, A. And Nieschlag, E. A portable digital data recorder for long-term monitoring of scrotal temperatures. Fertil Steril, 1990; 54: 694-700.
19. Green KF, Turner TT, Howards SS. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. J Urol. 1984;131(6):1208-11.
20. Sofikitis N, Miyagawa I. Left adrenalectomy in varicoceles does not inhibit the development of varicocele-related physiologic alterations. Int J Fertil Menopausal Stud. 1993;38(4):250-5.
21. Cathy K. Naughton, Ajay K. Nangia and Ashok Agarwal. Varicocele and male infertility: Part II Pathophysiology of varicoceles in male infertility. Human Reproduction Update, Vol.7, No.5 pp. 473-481, 2001.

22. Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C, Gore RW. Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *Am J Physiol*, 1991;260(5 Pt 2):H1581-9.
23. Hsu HS, Chang LS, Chen MT, Wei YH. Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *Eur Urol*. 1994;25(1):71-5.
24. Hsu HS, Wei YH, Li AF, Chen MT, Chang LS. Defective mitochondrial oxidative phosphorylation in varicocele-bearing testicles. *Urology*, 1995;46(4):545-9.
25. Shafik A. Venous tension patterns in cord veins. II. After varicocele correction. *J Urol*. 1983;129(4):749-51.
26. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N, Fritjofsson A. Phlebography in varicocele scroti. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*, 1966;4(5):517-28.
27. Comhaire F, Kunnen M, Nahoum C. Radiological anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. *Int J Androl*, 1981;4(3):379-87.
28. Turner TT, Lopez TJ. Effects of experimental varicocele require neither adrenal contribution nor venous reflux. *J Urol*. 1989;142(5):1372-5.
29. Jarow JP, Sanzone JJ. Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol*. 1992;148(6):1805-7.
30. Shook TE, Nyberg LM, Collins BS, Mathur S. Pathological and immunological effects of surgically induced varicocele in juvenile and adult rats. *Am J Reprod Immunol Microbiol*, 1988;17(4):141-4.
31. Rogers BJ, Mygatt GG, Soderdahl DW, Hale RW. Monitoring of suspected infertile men with varicocele by the sperm penetration assay. *Fertil Steril*, 1985;44(6):800-5.
32. Vigil P, Wohler C, Bustos-Obregon E, Comhaire F, Morales P. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia*, 1994;26(2):55-60.

33. Benoff S, Barcia M, Hurley IR, et al. Classification of male factor infertility relevant to in-vitro fertilization insemination strategies using mannose ligands, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. *Hum Reprod.* 1996;11(9):1905-18.
34. Hikim AP, Swerdloff RS. Temporal and stage-specific effects of recombinant human follicle-stimulating hormone on the maintenance of spermatogenesis in gonadotropin-releasing hormone antagonist-treated rat. *Endocrinology*, 1995;136(1):253-61.
35. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of germinal epithelium. *Anat Rec.* 1998:905-926.
36. Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod.* 1996;55(5):935-41.
37. Fujisawa M, Hiramane C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol.* 1999;17(5):296-300.
38. Simsek F, Turkeri L, Cevik I, Bircan K, Akdas A. Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. *Arch Esp Urol.* 1998;51(9):947-50.
39. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1996;28(4):587-96.
40. Marmar JL. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update*, 2001;7(5):461-72.
41. Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, 1999;140(4):1709-17.

42. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*, 1993;7(5):643-50.
43. Brinkworth MH, Weinbauer GF, Bergmann M, Nieschlag E. Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in elderly men. *Int J Androl*, 1997;20(4):222-8.
44. Ku WW, Wine RN, Chae BY, Ghanayem BI, Chapin RE. Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995;134(1):100-10.
45. Li LH, Wine RN, Chapin RE. 2-Methoxyacetic acid (MAA)-induced spermatocyte apoptosis in human and rat testes: an in vitro comparison. *J Androl*, 1996;17(5):538-49.
46. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation in whole semen and its association with low superoxide scavenging capacity in seminal plasma. *Fertil Steril*, 1993;59(6):1291-5.
47. Aitken J, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 1994;16(4):259-67.
48. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 1987;81(2):459-69.
49. Turner TT, Brown KJ, Spann CL. Testicular intravascular volume and microvessel mitotic activity: effect of experimental varicocele. *J Androl*, 1993;14(3):180-6.
50. Li H, Dubocq F, Jiang Y, Tiguert R, Gheiler EL, Dhabuwala CB. Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology*, 1999;53(6):1258-62.

51. Harrison RM, Lewis RW, Roberts JA. Pathophysiology of varicocele in nonhuman primates: long-term seminal and testicular changes. *Fertil Steril* 1986;46(3):500-10.
52. Turner TT, Miller DW. Protein synthesis and secretion by the rat seminiferous tubule in vivo not affected by experimental varicocele. *J Urol* 1996;156(5):1881-7.
53. Anafarta K, Bedük Y, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kitabı Üroloji yayımları cilt 3; S: 952- 954.
54. Lipshultz LI, Corriere JN. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol* 1977; 117(2):175- 175.
55. Hamm G, Fobbe F, Sorensen R et al. Varicoceles: combined sonography and thermography in diagnosis and post-therapeutic intervention. *Radiology* 1996; 160:419–424.
56. Sigman M, Jarow JP. Ipsilateral testicular hypertrophy is associated with decreased sperm count in infertile men with varicocele. *J Urol*, 1997;158:605- 607.
57. Eskew LA, Watson NE, Wolfman N, Bechold R, Jarow IP. Ultrasonographic diagnosis of varicoceles. *Fertil Steril*, 1993; 60: 683- 685.
58. Amoah EA, Gelaye S. Biotechnological advances in goat reproduction. *J. Anim. Sci.* 1997; 75: 578–585.
59. [Http://www.urolojiistanbul.com/urolojik-hastaliklar/testis-hastaliklari/varikosel.html](http://www.urolojiistanbul.com/urolojik-hastaliklar/testis-hastaliklari/varikosel.html).
60. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26(4): 239-57.
61. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007; 35:495-516.
62. Apoptozis Ders notları, www20.uludag.edu.tr/~eulukaya (2003).

63. Canan Kaya, Yasemin Çalışkan, Zafer Yönden. Apoptozis. Mustafa Kemal Üniv.Tıp Derg, Cilt 3, Sayı 11, Yıl 2012.
64. Lawen A. Apoptosis an introduction. BioEssays, 2003; 25:888-896.
65. Abbro L, Dini L. Common morphological features of apoptotic cell blebs. Ital J Zool, 2003; 70(4): 297-299.
66. İbrahim Halil Yıldırım, Nadir Koçak, Seval Cing Yıldırım. Programlı Hücre Ölümü; Literatür Bilgilerinin Türkçe Derlemesi.Dicle Üniv. Vet. Fak. Derg., 2012: 2(3):58-66.
67. Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. Cell, 2001; 104: 325–328.
68. Robertson JD, Orrenius S, Zhivotosky B. Review: Nuclear events in apoptosis, Journal of Structural Biology, 2000; 129:346-358.
69. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. News Physiol Sci, 2004; 19: 124-8.
70. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Infect Immun, 2005;73(4):1907-16.
71. Sarıoğlu S, Ataman Ş. Apoptoz. T Klin FTR, 2003; 3: 37-44.
72. Özcan A, Atakişi E. Apoptozisin Biyokimyasal Önemi. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 2003; 9(1): 95-100.
73. Gülfidan Coşkun, Hülya Özgür. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi. Arşiv, 2011; 20: 145.
74. Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. Am J Pathol, 2000; 157: 1415–1430.

75. Dipak D. Ghatage, Suchitra R. Gosavi, Sindhu M. Ganvir, Vinay K. Hazarey. Apoptosis: Molecular mechanism. Journal of Orofacial Sciences. Vol. 4, Issue 2, December 2012.
76. Nagata S. Apoptosis by death factor. Cell, 1997; 88:355-365.
77. Güneş HV. Moleküler Hücre Biyolojisi. İstanbul Tıp Kitabevi.2010.
78. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol. 2008; 151(1): 10-27.
79. Krauss, G., Biochemistry of signal transduction and regulation, WILEY-VCH, Darms, 456-467 (2001).
80. Tiso N, Pallavicini A, Muraro T, Zimbello R, Apolloni E, Valle G, Lanfranchi G, Danieli GA. Chromosomal localization of the human genes, CPP32, Mch2, Mch3, and Ich-1, involved in cellular apoptosis. Biochem Biophys Res Commun, 1996; 225(3):983-9.
81. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. Biochem J, 1997; 326 :1-16.
82. Özyay Güleş, Ülker Eren. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008 (2) 73-78. ISSN 1017-8422; e-ISSN: 1308-3651.
83. Alper Koçyiğit, Mesut Çevik. Memeli Reprodüktif Dokuları, Gamet Hücreleri ve Embriyolarında Apoptozis. Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg, 2011; 8(1) 33-41.
84. Oğuzhan Özcan, Hüseyin Erdal, Gökhan Çakırca, Zafer Yönden. Oksidatif stres ve hücre içi lipit, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. Journal of Clinical and Experimental Investigations. 2015; 6 (3): 331-336.
85. Taner Onat, Kaya Emerk, Eser Y. Sözman. İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık. Ankara,2006.

86. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. Hacettepe Tıp Dergisi, 2002;33:110-118.
87. Fridovich I. Oxidative Stres. Encyclopedia Of Life Sciences. Nature Publishing Group, 2001.
88. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants And The Mammalian Thioredoxin System. Free Radical Biology And Medicine, 2001: 31(11): 1287-1317
89. Delibaş N, Özçankaya R. Serbast radikaller. SDÜ. Tıp Fakültesi Dergisi, 1995;2 (3):11-17.
90. Uchida K. 4-Hydroxy-2-Nonenal: a product and mediator of oxidative stress. Prog Lipid Res. 2003;569:1-26.
91. Antmen Ş E. Beta talasemide oksidatif stress. Yüksek Lisans.Adana: Çukurova Üniversitesi; 2005.
92. Halliwell B, Gutteridge Jmc. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals And Disease. Biochem J, 1984:219;1-14.
93. Ryter SW, Tyrrell RM. Singlet molecular oxygen (1O_2): a possible effector of eukaryotic gene expression. Free Radic Biol Med. 1998; 24(9):1520-1534.
94. Merel A, Tuncel P, Surmen-gur E. Ozbek R, Ozturk E, Gunay UC. Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Beta-Thalassemia, Pediatr Hematol Oncol. 2000;17:687-693.
95. Southorn, P. A, Powis, G. Free Radicals İn Medicine. I. Chemical Nature And Biologic Reactions. Mayo Clin Proc. 1998: 63(4):381-9.
96. Mccord JM. Human Disease, Free Radicals And The Oxidant/Antioxidant Balance. J Clin Biochem, 1993: 26: 351-357.

97. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J Surgery*, 1994; 81 (5):637-47.
98. Ward A, Mc Burney A, Lunec J. Evidence for the involvement of oxygen derived free radicals in ischaemia-reperfusion injury. *Free Radical Research*. 1994; 20 (1):21-8.
99. Gupta RK, Patel AK, Shah N, et al. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:4405-4409.
100. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*. 1995;41:1819-1828.
101. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, *J Lipid Res*. 1998;39:1529-1542.
102. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1987;25:317-364.
103. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38:1482-1495.
104. Prokai L, Yan LJ, Vera-Serrano JL, et al. Mass spectrometry-based survey of age associated protein carbonylation in rat brain mitochondria. *J Mass Spectrom*, 2007;42:1583-1589.
105. Rao RS, Moller IM. Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. *Proteomics*, 2011;11:4166-4173.
106. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*. 2003;329:23-38.
107. Breen AP and Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med*. 1995;18:1033-1077.

- 108.Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN. 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-Hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol*, 1999;300:156-166.
- 109.Hardie LJ, Briggs JA, Davidson LA, et al. The effect of hOGG1 and glutathione peroxidase I genotypes and 3p chromosomal loss on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in lung cancer. *Carcinogenesis*, 2000;21:167- 172.
- 110.Hu JJ, Dubin N, Kurland D, Ma BL and Roush GC. The effects of hydrogen peroxide on DNA repair activities. *Mutat Res*, 1995;336:193-201.
- 111.Günel Erenel, Deniz Erbaş, Aysel Arıcıoğlu. Serbest Radikaller ve Antioksidan Sistemler. *Gazi Tıp Dergisi*, 1992; 3: 243-250.
- 112.Nilgün Altan, Aylın Sepici Dinçel, Cemile Koca. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres. *Türk Biyokimya Dergisi*, 2006; 31 (2); 51–56.
- 113.Rodríguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*, 2004; 36: 1-9.
- 114.Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005;16: 577-586.
- 115.Şehirli AO. Renal İskemi/Reperfüzyon Hasarında Melatonin'in Koruyucu Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. T.C. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2001.
- 116.Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuña-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18: 1-11.

- 117.Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. FASEB J, 1995; 9: 526-533.
- 118.Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, Qi W, Tan DX. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. Ann N Y Acad Sci, 2000; 917: 376-386.
- 119.Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol. 2001;54:176-186.
- 120.Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, 1995;1: 1-60.
- 121.Erel, O, A Novel Automated Method To Measure Total Antioxidant Response Against Potent Free Radical Reactions. Clin Biochem, 2004: 37: 2, 112-9.
- 122.González-Pérez O, Moy-López NA, Guzmán-Muñiz J. [Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine] Rev Invest Clin. 2008; 60: 58-67.
- 123.Silalahi J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. Asia Pac J Clin Nutr, 2002; 11: 79-84.
- 124.Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress and male reproductive biology. Reprod Fertil 2004; 16: 581- 588.
- 125.Serpil Sarıözkan. Spermada lipid peroksidasyon ve permada lipid peroksidasyon ve antioksidanlar ntioksidanların rolü. Vet. Hekim Dergisi. Derg, 2008; 79(4): 19-22.
- 126.Pryor JL, Howards SS: Varicocele, Urol Clin North Am. 1997; 14 (3) :499-513.
- 127.Ateş Kadioğlu. WHO Laboratuvar El Kitabı, 5.Basım . Türk Üroloji Derneği 2011.
- 128.Bar-Chama N, Lamb DJ. Evaluation of sperm function. What is available in the modern andrology laboratory. Urologic Clinics of North America. 1994;21:433-46.

- 129.Dunphy BC, Kay R, Barrat CLR, Quality during the conventional analysis of semen, an assential exercises, Journal of Andrology, 1998; 10:378-85.
- 130.Mortimer D, Shu MA, Tan R. Standardization and quality control of sperm concentration and sperm motility counts in semen analysis. Human Reproduction. 1986; 1:299-303.
- 131.Fikret Erdemir, Fatih Fırat, Yusuf Gençten. Sperm Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve Klinik Önemi. Turk Urol. Sem 2011; 2: 11-7.
- 132.WHO Laboratuvar el kitabı, insan semeni ve sperm-servikal mukus etkileşimi değerlendirilmesi, (Çeviri editörü: Günalp S), Tıp Teknik Kitabevi, 4. baskı, Ankara 2002; 76: 10-100.
- 133.Makler A. The improve ten mikrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. Fertil Steril, 1980; 33:337- 100.
- 134.Shun-long weng, Steven I. Taylor, Mahmood Morshedi et al. Caspase activity and apoptotik markers in ejaculated human sperm.Molecular human reproduction. Vol.8, No.10pp, 984-991, 2002.
- 135.Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidantcapacity using a new generation, more stable ABTS radical cation.Clinical Biochemistry, 2004; 277– 285.
- 136.Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem.2005; 38(12):1103-11.
- 137.World Health Organization. The influence of varicocele an parameters of infertility in a large group men presenting to infertility clinics. Fertil Steril, 1992;57, 1289-1293.

- 138.Villanueva-Diaz, C.A., Vega-Hernandez, E.A., Diaz-Perez, M.A. et al. Sperm dysfunction in subfertile patients with varicocele and marginal semen analysis. *Andrologiz*, 1990; 31: 263-267.
- 139.Chehval, M.J. and Purcell, M.H. Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. *Fertil. Steril*, 1992; 57:174-177.
- 140.Haans, L.C., Laven, J.S.E., Mali, W.P.Th.M. et al. Testis volumes, semen quality, and hormonal patterns in adolescents with and without a varicocele. *Fertil. Steril*, 1991; 56: 731-736.
- 141.R Hauser, G Paz, A Botchan, L Yogev and H. Yavetz . varicocele and male infertility: Part II: effect on sperm functions .*Human reproduction Update*, Vol.7, No.5 pp.482-485,2001.
- 142.Dubin L, Amelar D. Varicocele. *Urol Clin N Amer*. 1978; 5: 563-587.
- 143.Saypol DC. Varicocele *J Androl*. 1981; 2: 61-67.
- 144.Çayan S. Varikosellin cerrahi tedavisinde yüksek ligasyon ve mikrocerrahi yüksek inguinal varikoselektomi sonuçlarının karşılaştırılması. *Uzmanlık Tezi*, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara; 1997.
- 145.Ayaşlıoğlu E. Apoptoz. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi*. 2001; 21: 57-62
- 146.Şule Doğan, Müge Kovalı, Ceyda Yıldız, Çetin Pekçetin .Programlı hücre ölümü ve spermatozoon. *Androloji Bülteni*, 2010; 42: 201-206.
- 147.Simsek F, Turkeri L, Cevik I, Bircan K, Akdas A. Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. *Arch Esp Urol*. 1998; 51: 947-50.

- 148.Hurley IR, Cooper GW, Napolitano B, Gilbert BR, Marmar JL, Benoff S. High testicular cadmium (Cd^{2+}) levels in varicocele-associated infertility (VAI). *Andrologia*, 2000; 32 : 190–1.
- 149.Ja Hyeon Ku, Hong Bang Shim, Soo Woong Kim and Jae-Seung Paick. The role of apoptosis in the pathogenesis of varicocele. *BJU International*, 2005; 96:1092-1096.
- 150.Lin JC, Dhabuwala CB, Li H. The role of apoptosis in infertile men with varicoceles: Is there Fas system implicated? *J Urol*. 2001; 165 (Suppl. 4): 1378A.
- 151.Tanaka H, Fujisawa M, Tanaka H, Okada H, Kamidono S. Apoptosis-related proteins in the testes of infertile men with varicocele. *BJU Int*. 2002; 89: 905–9.
- 152.Fujisawa M, Hiramine C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol*. 1999; 17: 296–300.
- 153.Mustafa Karalar, Murat Şamlı, Emre Tüzel, Tülay Köken, Murat Demirbaş, Cem Güler. Varikoselli olgularda spermatik ve periferik vendeki oksidatif stresin değerlendirilmesi. *Türk üroloji dergisi*, 2007; 33 (1): 40-44.
- 154.Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril*, 2003; 80: 1431–6.
- 155.Kass EJ, Belman AB: Reversal of testicular growth failure by varicocele ligation. *J. Urol*. 137: 475-476, 1987.
- 156.Arıkan, N., Küpeli, S., Aydos, K., Yaman, L.S. Varikoselli olgularda skrotal termografi ve testiküler sintigrafi değişikliklerinin seminal parametreleriyle korelasyonu. *Türk üroloji dergisi*, Cilt:16, Sayı: 4, 1990; 397-401, 1990.

8. EKLER

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırmanın Adı: “Varikoselli hastalarda İmmünohistokimyasal yöntem kullanarak spermlerdeki apoptozisin saptanması ve apoptozis ile sperm parametreleri, serum ve seminal plazmadaki TAS-TOS seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılması”

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALISMANIN AMACI NEDİR?

Varikosel, spermatik kord içerisinde pampiniform pleksusu oluşturan venlerde dilatasyon, staz ve yüksek basınç ile karakterizedir ve erkek infertilitesinin en sık düzeltilbilir nedenidir. Varikoselin patofizyolojisi konusunda birçok hipotez ileri sürülmüştür. Bunlar arasında; apoptozis ve artmış oksidatif stres bulunmaktadır. Bizde yapacağımız çalışmada, apoptozis ile oksidatif stres ve sperm parametreleri arasında anlamlı bir ilişkinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık ve bununda başka çalışmalara ışık tutacağına inanıyoruz. Bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Bu çalışmaya dahil edilebilmeniz için Kasım 2015 ve Kasım 2016 tarihleri arasında Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Polikliniğine başvuru yapmış

olmanız gerekir. Kendinizde bir şikâyet olmasa bile katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Üroloji polikliniğine başvuru yapan ve bu işlem için semen örneği veren hastalardan, kullanılan materyal dışında kalan, atılacak olan semen örnekleri ve kan örnekleri çalışmada kullanılacaktır. Sizin için gerekli olan tüm değerlendirmeler bittikten sonra artan semen örneklerinden yapılacak yayma preparatları incelemeye alınacaktır. Bu örneklerden yapılacak incelemede elde edilecek sonuçlar, varikoselli apoptozis ile oksidatif stres ve sperm parametreleri arasında anlamlı bir ilişkinin olup olmadığını açıklama ve bununla ilerde ilgili diğer araştırmaların yapılmasına yol açacaktır.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Araştırma ile ilgili olarak üstlenilmesi gereken ek bir sorumluluk bulunmamaktadır. 3-5 günlük cinsel perhiz sonrasında normal spermiyogram ve kan örneği verilmesi dışında bir ilaç kullanımı gerekli değildir. Sperm örneği verilmesi sırasında su, sabun ve kayganlaştırıcı madde kullanmadan, verilen steril kaba semenin tamamının aktarılması çalışma için uygundur.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı Üroloji Polikliniğine başvuran 40 erkek hasta ve kontrol grubu için 40 sağlıklı erkek bireydir.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 12 aydır.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

‘Varikoselli hastalarda İmmünohistokimyasal yöntem kullanarak spermlerdeki apoptozisin saptanması ve apoptozis ile sperm parametreleri, serum ve seminal plazmadaki

TAS-TOS seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılması' bu tıbbi yarar kısa sürede kullanılamasa bile uzun dönemde bu tip araştırmaların artmasıyla tedavi için insanlık yararına kullanılmasında fayda sağlayacağı bir gerçektir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Size bu araştırmada Üroloji Polikliniğinde her zaman uygulanan işlemler uygulanacaktır. Bu uygulama ile ilgili gözlenebilecek istenmeyen etki bulunmamaktadır. İncelenmesi planlanan materyal hastadan alınan ve tüm işlemler bittikten sonra atılan semen ve kan örnekleridir. Bu araştırma ile ilgili hastaya yönelik herhangi bir girişim yapılmayacaktır. Çalışmanın neden olabileceği olası bir risk yoktur. Çalışma sonunda artan materyal çalışma dışındaki örneklerde uygulandığı gibi imha edilecektir.

HANGİ KOŞULLARDA ARAŞTIRMA DIŞI BIRAKILABİLİRİM?

Bu çalışmaya dahil olmak istememeniz, çıkmak istemeniz durumunda araştırmadan çıkarılabiliyorsunuz. İstenen semen ve kan örneğini uygun koşullarda vermemeniz durumunda, çalışma programını aksatmanız veya bir yan etkiye maruz kalmanız vb. nedenlerle doktorunuz sizin izniniz olmadan sizi çalışmadan çıkarabilir.

HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA YÜKÜMLÜLÜK/ SORUMLULUK KİMDEDİR VE NE YAPILACAKTIR?

Bu çalışmada hastaya ait zararlanma söz konusu değildir. Hastanın spermiyogram uygulaması için verdiği semen ve kan örneklerinden uygulama bittikten sonra atılacak olan materyal üzerinde çalışıldığı için hastaya zarar gelmeyecektir. Bu konuda herhangi bir sorumluluk olduğunda sorumluluk Doç. Dr. Mete KÖKSAL, Yüksek Lisans Öğrencisi Şükrü AKMEŞE ve diğer yardımcı araştırmacılarıdır. Hastaya bilgilendirme yapılacaktır.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Uygulama süresi boyunca, zorunlu olarak araştırma dışı ilaç almak durumunda kaldığınızda Sorumlu Araştırıcıyı önceden bilgilendirmek için, araştırma hakkında ek bilgiler

almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için Üroloji polikliniğine başvurabilirsiniz. Bu konudaki herhangi bir sorun için araştırma için örnekleri toplayan ve immunohistokimyasal değerlendirmeyi yapacak olan **Doç. Dr. Mete KÖKSAL (0 533 621 24 89) ve Şükrü AKMEŞE’yi (0541 366 99 52)** arayabilirsiniz.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Bu çalışma için laboratuvar işlemleri için gerekli kimyasal maddelerin alımı Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (HÜBAK) Komisyonu tarafından desteklenecektir. Sizden tetkikler sonunda alınacak sperm örnekleri dışında hiçbir maddi beklenti bulunmamaktadır.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR?

Çalışma için gerekli kimyasal malzemeler Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (HÜBAK) kapsamında yüksek lisans tez projelerini destekleme kapsamında sağlanacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır. Elde edilecek sonuçlar bilimsel yarar için kullanılacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmacı, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız vb.

nedenlerle isteğiniz dışında ancak bilginiz dahilinde sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda da sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmanın sonuçları sadece bilimsel amaçla kullanılacaktır, hasta kimliği gizli kalacaktır.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.



ANAMNEZ FORMU

Çalışma adı: 'Varikoselli hastalarda İmmünohistokimyasal yöntem kullanarak spermlerdeki apoptozisin saptanması ve apoptozis ile sperm parametreleri, serum ve seminal plazmadaki TAS-TOS seviyeleri arasındaki ilişkinin araştırılması'

Olgu No:

Tarih:

Hastanın adı ve soyadı baş harfleri:

Protokol No:

Yaş:

Kan Grubu:

Mesleği:

Kaç yıldır evli:

Korunma Süresi:

İnfertilite süresi:

İnfertilite Çeşiti:

Primer:

Sekonder:

GEÇİRMİŞ OLDUĞU OPERASYONLAR:

Travma:

İnguinal Herniorafi:

Hidroselektomi:

Varikoselektomi:

Vazektomi:

Diğer:

GEÇİRMİŞ OLDUĞU HASTALIKLAR:

Ateşli hastalıklar:

Kabakulak:

Spinal kord yaralanması:

Tümoral hastalıklar:

Radyoterapi:

Diğer:

SİSTEMİK HASTALIKLAR:

Diabetes Mellitus:

Multiple Sklerozis

Tuberkulozis:

Diğer:

ALIŞKANLIKLARI:

Alkol: Günde:...../Bardak

Yıl:.....

Sigara: Günde:...../Adet

Yıl:.....

Kahve: Günde:...../Fincan

Çay: Günde:...../Bardak

SOY GEÇMİŞ:

Kistik fibrozis:

Y kromozomu Delesyonu:

Diğer:



T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : 74059997.050.01.04/158
Konu : Proje

14./10/2015

Sayın Doç. Dr. Mete KÖKSAL
Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Yürütücüsü olduğunuz ve 15.06.2015 tarih, 06 nolu oturum ve 16 sayılı kararı ile onaylanan “Varikoselli Hastalarda İmmünohistokimyasal Yöntem Kullanarak Spermlerdeki Apoptozis ve HSP 70 Seviyeleriyle Sperm ve Seminal Plazmadaki Total Antioksidan ve Total Oksidan Seviyeleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın “Varikoselli Hastalarda İmmünohistokimyasal Yöntem Kullanarak Spermlerdeki Apoptozisin Saptanması ve Apoptozis ile Sperm Parametreleri, Serum ve Seminal Plazmadaki Total Antioksidan (TAS) ve Total Oksidan (TOS) Seviyeleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması” olarak değiştirilmesine Etik Kurulu onayı verilmesine, ilişkin Kurulumuzun 09.10.2015 tarih ve 09 nolu oturum 11 sayılı kararı ekte gönderilmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Nurten AKSOY
Etik Kurul Başkanı

EK: Etik Kurul Kararı (1 Adet)

Tıp Fakültesi Morfoloji Binası Diyarbakır yolu üzeri Yenişehir Kampüsü 63300 ŞANLIURFA
Telefon : (0 414) 318 30 31 – 318 30 00 Fax: (0 414) 318 31 92 e-mail: etik.kurul@yahoo.com

HARRAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ Etik Kurul Kararı	
TARİH	: 09.10.2015
OTURUM	: 09
SAAT	: 15:00

15/09/11	<p>Karar: Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mete KÖKSAL'ın sorumlu araştırmacısı olduğu ve 15.06.2015 tarih, 06 nolu oturum ve 16 sayılı kararı ile onaylanan “Varikoselli Hastalarda İmmünohistokimyasal Yöntem Kullanarak Spermlerdeki Apoptozis ve HSP 70 Seviyeleriyle Sperm ve Seminal Plazmadaki Total Antioksidan ve Total Oksidan Seviyeleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması” başlıklı çalışmanın “Varikoselli Hastalarda İmmünohistokimyasal Yöntem Kullanarak Spermlerdeki Apoptozisin Saptanması ve Apoptozis ile Sperm Parametreleri, Serum ve Seminal Plazmadaki Total Antioksidan (TAS) ve Total Oksidan (TOS) Seviyeleri Arasındaki İlişkinin Araştırılması” olarak değiştirilmesine Etik Kurulu onayı verilmesine,</p> <p>Oybirliğiyle / Oyçokluğuyla karar verilmiştir.</p>
	<p>ASLI GİBİDİR Prof. Dr. Nurten AKSOY Etik Kurul Başkanı</p>