

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
ÜROLOĞİ SERVİS ŐEFLİĐİ

**RAT DENEYSEL KRİPTORŞİDİZM MODELİNDE β -hCG
TEDAVİSİNİN TESTİSTE NEDEN OLDUĞU
MAKROSKOPİK VE HİSTOPATOLOĞİK
DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

Ömer YILMAZ
Hv. Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı'nın
Üroloği Programı
İçin Öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak HazırlanmıŐtır.

İSTANBUL
2007

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
ÜROLOĞİ SERVİS ŐEFLİĐİ

**RAT DENEYSEL KRİPTORŞİDİZM MODELİNDE β -hCG
TEDAVİSİNİN TESTİSTE NEDEN OLDUĞU
MAKROSKOPİK VE HİSTOPATOLOĞİK
DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

Ömer YILMAZ
Hv. Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı'nın
Üroloği Programı
İçin Öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
Olarak HazırlanmıŐtır.

TEZ DANIŞMANI
İlker AKYOL
Yrd. Doç. Hv. Tbp. Bnb.

İSTANBUL
2007

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı'na;

“ Rat deneysel kriptorşidizm modelinde β -hCG tedavisinin testiste neden olduğu makroskopik ve histopatolojik değişikliklerin incelenmesi ” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Üroloji Ana Bilim Dalı'nda Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Hv. Tbp. Bnb. İlker AKYOL

Üye : Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. A. Cüneyid İŞERİ

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Murat DAYANÇ

Üye : Prof. Dz. Tbp. Kd. Alb. Kadir V. BAYKAL

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. Mehmet YILDIZ

Üye : Prof. Tbp. Kd. Alb. T. Rıfki EVRENKAYA

ONAY:

Hv. Tbp. Yzb. Ömer YILMAZ' ın 15.10.2007 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu' nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu tez konusu Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Üroloji Kliniği Şefliğince 10 Ekim 2005 tarihinde verilmiş ve çalışmaya başlanmıştır.

Kriptorşidizm klinik pratikte sık görülen, infertilite ve malignite ile yakından ilişkili, klinik yaklaşım ile ilgili hala bazı tartışmaların olduğu bir konudur. Bu tartışmalardan biri de kriptorşidizmde hormon tedavisinin yeridir. Bu tez çalışmasıyla, ratlarda oluşturduğumuz deneysel kriptorşidizm modelinde hormon tedavisi vererek, bu tedavinin etkilerini çok yönlü olarak değerlendirdik.

Mesleğimi icrayı öğrendiğim uzmanlık eğitimim süresince bilgi, deneyim ve emeklerini esirgemeyen, yetişmem sırasında her türlü olanağı sunan, ihtiyacım olan her an yanımda bulduğum sayın hocalarım, başta Üroloji Servis Şefi Prof. Dr. A. Cüneyid İŞERİ olmak üzere, Prof. Dr. Kadir BAYKAL' a, Doç. Dr. Kenan KARADEMİR' e, Doç. Dr. Temuçin ŞENKUL' a, Yrd. Doç. Dr. Cüneyt ADAYENER' e, Yrd. Doç. Dr. Ferhat ATEŞ' e, Op. Dr. Hasan SOYDAN' a ve tezimin hazırlanmasında büyük pay sahibi olan Yrd. Doç. Dr. İlker AKYOL' a minnet ve şükranlarımı sunarım. Yine tez çalışmamın patoloji kolunu özveri ile yürüten değerli arkadaşım Uz. Dr. Ufuk BERBER' e ve bu çalışmanın istatistiksel değerlendirmesini yapan sayın Özlem KÖKSAL' a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm asistan arkadaşlarıma, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Üroloji Kliniği' nde birlikte görev yaptığım tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma, yoğun çalışma temposunda yanımda oldukları için teşekkürü bir borç bilirim.

Ömer YILMAZ

Hv. Tbp. Yzb.

ÖZET

Rat deneysel kriptorşidizm modelinde β -hCG tedavisinin testiste neden olduğu makroskopik ve histopatolojik değişikliklerin incelenmesi.

Kriptorşidizm, erkeklerde en sık görülen gelişimsel anomalidir. İnfertilite ve karsinogenez ile yakın ilişkili olup, 1 yaşından önce tedavi edilmesi önerilmektedir. Hormonal tedavinin başarısının cerrahi tedaviye oranla düşük olması ve yapılan farklı çalışmalarda testisin histolojik yapısı üzerine çelişkili sonuçların bildirilmesi, hormonal tedavinin sorgulanmasına neden olmuştur.

Çalışmamızda, 22 günlük toplam 60 adet sağlıklı erkek Sprague Dawley cinsi rat, Sham operasyonu, deneysel kriptorşidizm ve deneysel kriptorşidizm+hormon tedavisi gruplarını oluşturacak şekilde, eşit sayıda rat içeren üç ana gruba, her grup da kendi içinde erken ve geç dönem orşiektomi gruplarına ayrıldı. Erken ve geç dönem orşiektomiler sırasıyla deneysel kriptorşidizm oluşturulduktan sonraki 8. ve 30. günde yapıldı. Hormon tedavisi grubundaki ratlara postoperatif ilk günden itibaren 7 gün boyunca, subkütan 50 IU/kg/gün dozunda β -hCG uygulandı. Kriptorşidizmin ve β -hCG'nin etkileri ve bu etkilerin zaman içindeki değişimleri testis ağırlığı, fertilité indeksi ve apoptozis indeksi parametreleri kullanılarak değerlendirildi. Çalışmanın sonucunda; sham grubunda, zaman içinde testis ağırlığı arttı, apoptozis indeksi azaldı, fertilité indeksi artış gösterdi. Deneysel kriptorşidizm grubunda testis ağırlığı, sham grubuna oranla daha az gelişim gösterdi. Apoptozis indeksi tüm gruplar içinde en yüksek bu grupta saptandı ve zaman içinde azaldı. Fertilité indeksi sham grubundan düşük bulundu. Hormonal tedavi uygulanan grupta testis ağırlığı, kriptorşidizm grubuna benzer şekilde, sham grubuna oranla daha düşük gelişim gösterdi. Bu grubun apoptozis indeksi erken ve geç dönemde sham grubundan yüksekti ve zaman içinde düşme eğilimi gösterdi. Apoptozis indeksi erken dönemde kriptorşidizm grubuyla benzerken, geç dönemde kriptorşidizm grubundan düşük saptandı. Fertilité indeksi kriptorşidizm grubundakine benzer şekilde erken ve geç dönemde sham grubundan daha düşüktü. Çalışmamızın sonucunda, deneysel kriptorşidizm modelinde gerçekleşmesi beklenen makroskopik ve histopatolojik olumsuz etkiler gözlemlendi. Hormon tedavisinin deneysel kriptorşidizme göre anlamlı ek bir olumsuz etkisi saptanmadı.

Anahtar Kelimeler : Kriptorşidizm, β -hCG, apoptozis, fertilité.
Destekleyen Kuruluşlar : GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi
Yazar : Hv. Tbp. Yzb. Ömer YILMAZ
Danışman : Yrd. Doç. Hv. Tbp. Bnb. İlker AKYOL

SUMMARY

Evaluation of the macroscopic and histopathologic changes caused by β -hCG treatment in the testis in rat experimental cryptorchidism model.

Cryptorchidism is the most frequent developmental anomaly among males. It has close relationships with infertility and carcinogenesis, and must be treated before 1 year of age. Hormonal treatment of cryptorchidism has been questioned because of its lower success rate than surgical treatment, and the conflicting reports on its effects on testis histology. In our study, 60 22 day-old Sprague-Dawley rats were distributed into 3 main groups, which were Sham-operated (SO), experimental cryptorchidism (EC), and hormone treated EC groups (HT), which were further divided into early and late orchidectomy groups each. Early and late orchidectomies were performed on 8th and 30th day respectively after experimental cryptorchidism was carried out. The rats in hormone treatment group received SC injections of 50 IU/kg β -hCG daily for 7 days following the first operation. The effects of cryptorchidism itself and β -hCG were evaluated using the parameters of testis weight, fertility index (FI) and apoptosis index (AI). As for the results; in SO group, testis weight increased, apoptosis index decreased, fertility index increased as a function of time. In EC group, testis weight increased less than SO group. AI was highest among all groups, and it decreased with time. FI was lower than SO group. In HT group, testis weight increased less than SO group, as in EC group. AI in HT group was higher than SO, and it decreased with time. AI in HT group was similar to, and lower than SO group in early and late periods respectively. FI in HT group was lower than SO group in early and late periods, as in EC group. To conclude, the expected macroscopic and histopathologic negative effects of experimental cryptorchidism were observed at the end of our study. No significant additional negative effects of hormone treatment was observed as compared with experimental cryptorchidism itself.

Keywords : Cryptorchidism, β -hCG, apoptosis, fertility
Supported by : GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi
Author : Hv. Tbp. Yzb. Ömer YILMAZ
Counsellor : Yrd. Doç. Hv. Tbp. Bnb. İlker AKYOL

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
TABLolar	ix
ŞEKİLLER	x
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Embriyoloji.....	3
2.2. Spermatogenez.....	4
2.3. Kriptorşidizm.....	6
2.4. Apoptozis.....	11
GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1 Cerrahi Teknik.....	16
3.2 Histopatolojik İnceleme.....	20
3.3 İstatistiksel Yöntem.....	22
BULGULAR	27
TARTIŞMA	33
SONUÇ VE ÖNERİLER	40
KAYNAKLAR	41

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ABP	: Androjen bağlayan protein
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
AI	: Apoptozis indeksi
β -hCG	: Beta - insan koryonik gonadotropini
CIS	: Karsinoma insitu
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EC	: Deneysel kriptorşidizm (<i>Experimental cryptorchidism</i>)
FI	: Fertilité indeksi
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GAG	: Glikozaminoglikan
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
GnRH	: Gonadotropin serbestleştirici hormon
HT	: Hormon tedavisi alan (<i>Hormone treated</i>)
LH	: Lüteinleştirici hormon
LHRH	: Lüteinleştirici hormon serbestleştirici hormon
MIF	: Mülleryen engelleyici faktör (<i>Müllerian Inhibiting Factor</i>)
SO	: Sham operasyonu yapılan (<i>Sham operated</i>)
SPSS	: <i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TUNEL	: <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labelling</i>

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 3.1 : Çalışma grupları.....	16
Tablo 4.1 : Testis ağırlığının istatistiksel analizi.....	29
Tablo 4.2 : Apoptozis indeksinin istatistiksel analizi.....	30
Tablo 4.3 : Fertilite indeksinin istatistiksel analizi.....	31
Tablo 4.4 : İrdelenen parametrelerin birbirleriyle ilişkisi (Erken dönem)...	32
Tablo 4.5 : İrdelenen parametrelerin birbirleriyle ilişkisi (Geç dönem)	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1 : Vertikal kesi ile karın içine ulaşılması.....	18
Şekil 3.2 : Sol testisin kesi hattından çıkarılması.....	18
Şekil 3.3 : İnguinal kanalın sütün ile kapatılması.....	19
Şekil 3.4 : Periton, cilt altı dokular ve cildin kapatılması.....	19
Şekil 3.5 : Hematoksilen-eozin ile boyama (200X)	23
Şekil 3.6 : Negatif kontrol (100X)	23
Şekil 3.7 : Hor-E grubu (200X).	24
Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermekte	
Şekil 3.8 : Hor-G grubu (200X).	24
Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermekte	
Şekil 3.9 : Kript-E grubu (200X).	25
Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermekte	
Şekil 3.10 : Kript-G grubu (200X).	25
Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermekte	
Şekil 3.11 : Sham-E grubu (200X).	26
Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermekte	
Şekil 3.12 : Sham-G grubu (200X).	26
Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermekte	
Şekil 4.1 : Testis ağırlıkları.....	30
Şekil 4.2 : Apoptozis indeksleri.....	31
Şekil 4.3 : Fertilité indeksleri.....	32

GİRİŞ

Bir erkekte, testislerin bulunması gereken yer olan skrotumun dışında bir yerleşimde olması ya da hiç olmaması durumunu tanımlayan kriptorşidizm, yenidoğanda % 1-4 görülme sıklığı ile erkeklerdeki en sık gelişimsel defektir (39). Skrotum, karın içinden birkaç derece daha düşük olan ısı ile testiküler işlevlerin gerçekleşebilmesi için en uygun ortamı sağlamaktadır (81).

İnterseks, Prune-Belly sendromu gibi klinik durumlarla da birlikte görülebilen (44, 45) kriptorşidizmin asıl önemi, infertilite ve karsinogenez ile yakından ilişkili olmasıdır(102, 103).

Skrotal ısıdan daha yüksek ısıya maruz kalan testiste, bu sebeple veya henüz bilinmeyen başka sebeplerle bazı histolojik değişiklikler oluşur. Bunlar: 1) Değişik matürasyon evrelerindeki germ hücrelerinin sayılarında azalma, 2) Seminifer tübül çaplarında değişiklik, lamina propriada kalınlaşma, 3) Peritübüler fibrozistir (79, 80).

Kriptorşidizm tedavisinin zamanlaması ile ilgili genel kabul edilen görüşe göre testisin skrotuma 1 yaş öncesi indirilmesi, yetişkin dönemde testiküler fonksiyonlar açısından önemlidir (90, 85). Tedavisinde hormonal veya cerrahi yöntemlerden birisi seçilebilir. Ancak eksojen hCG, eksojen GnRH ya da LHRH agonistleri ile yapılan hormonal tedavinin cerrahiye oranla başarısının daha düşük bildirilmesi (87), uygulanan hormonal tedavinin yetişkin çağda spermatogenez üzerine hem olumlu (59) hem de olumsuz (38) etkilerini bildiren farklı çalışmalar olması nedeni ile bu tedavinin etkinliği ve güvenilirliği ile ilgili bazı soru işaretleri mevcuttur.

Programlanmış hücre ölümü olan apoptozis, testiste de fizyolojik bir süreçtir. Normal spermatogenez sırasında, spermatogenik hücrelerin yarıdan fazlası olgun spermatozoa olmadan apoptozis yolağı ile ortadan kaldırılır (24, 25, 38). Wang ve ark.'nın kriptorşidizmde germ hücrelerinin ölümünün apoptozis yolağı ile olduğunu ortaya koymaları, diğer deneysel çalışmalarda da kriptorşidizm oluşturulan ratların germ hücrelerinde apoptozisin artmış

olduğunun bulunması (28, 83, 84) infertilite ve kriptorşidizm arasındaki ilişkiyi açıklayabilir.

β -hCG ile yapılan hormonal tedavinin, insan ve rat testisinde inflamasyona yol açtığı, çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (96, 62). Dunkel ve ark.'nın (62) çalışmasında, β -hCG ile tedavi edilmiş olan çocukların testislerinden alınmış biyopsilerde, bu tedaviyi almamış olanlarıkinden yaklaşık 6 kat fazla apoptotik spermatogonia tesbit edilmesi, yetişkin dönemde, kriptorşidizm nedeni ile varolan infertilite riskini olumsuz yönde artırabileceği yorumlarının yapılmasına neden olmuştur. Bununla birlikte Hadziselimovic ve ark.'nın (59) yaptıkları çalışmada hormonal tedavinin yetişkin dönemde spermatogenez üzerine olumlu etkilerinin olabileceğine dair sonuç elde etmeleri, hormonal tedavinin başka çalışmalarla da irdelenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır.

Bu çalışmada, deneysel kriptorşidizm oluşturulan ratlara β -hCG verilmesinin, yalnızca kriptorşidik rat testislerinde meydana gelen makroskopik (testis ağırlığı) ve mikroskopik (apoptozis indeksi, fertilite indeksi) değişikliklere olumlu ya da olumsuz bir etkisinin olup olmadığı; varsa, bu etkinin zaman içindeki değişiminin saptanması, özellikle apoptozis ile fertilite indeksi arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

1. Embriyoloji

İnsanda testis farklılaşması Y kromozomu varlığında SRY geni etkisiyle gebeliğin 7. haftasında başlar (1). Yine 7. gebelik haftasında ilkel Sertoli hücreleri oluşur. 8. haftada, seminifer tübüller arasında, gonadal mezenkim içinde Leydig hücreleri farklılaşır. 15. haftada germ hücreleri, fetal spermatogoniumları oluşturacak olan gonositlere farklılaşır (2).

Fetal testis 8. haftada, hipofizin hormonal kontrolünden bağımsız olarak fetal Leydig hücrelerinden testosteron ve Sertoli hücrelerinden MIF salgılamaya başlar. MIF Müller kanalının gelişimini baskımlarken, testosteron Wolf kanalının epididim ve vas deferense farklılaşmasını sağlar. Parakrin bir hormon niteliğindeki testosteron, annenin insan koryonik gonadotropininin (hCG) kontrolü altındadır ve gebeliğin 12-14. haftasında en yüksek düzeye çıkar (3).

Testis inişinde en önemli rolü oynayan gubernakulum, gebeliğin 7. haftasında vertebranın her iki yanındaki gonadlarla, gelişmekte olan karın ön duvarı kaslarının fasyaları arasında uzanan mezenkimal dokunun yoğunlaşması ile ortaya çıkar. Bu yapı, kraniyal yönde epididim kuyruğu ve testisin alt kutup tunika albugineasına, kaudal yönde inguinal kanala yapışır (4).

Testisler inmeden önce gubernakulumun üzerindedir. Gubernakulum ise içinde glikozaminoglikandan zengin materyal olan farklılaşmamış içsi hücrelerden oluşmuştur. Testislerin inişinden hemen önce gubernakulumun boyu uzar, hacmi genişler. Bu, muhtemelen içeriğindeki GAG maddenin hücre dışı alandan su çekmesi ile mümkün olmaktadır (5). Genişleme aynı zamanda inguinal kanalı da genişleterek testis geçişine olanak sağlamaktadır.

Gubernakulumun inguinal kanala yapışmış olan alt kısmı, testisin kanaldan geçmesini takiben yapıştığı yerden ayrılır. Gubernakulumun, testisin inişinden önce testisin inguinal kanala yönlendirilmesinde önemi açıkça bilinmesine rağmen testisin kanaldan geçmesi ve skrotuma

yerleşmesi ile ilgili halen bilinmeyen ve araştırılması gereken noktalar mevcuttur.

Testislerin skrotuma ulaşmaları için geçecekleri inguinal kanal, gebeliğin 8. haftasında oluşur (6). Başlangıçta, oluşmakta olan böbreklerin yakınında yerleşen testisler 23. haftaya kadar buldukları yerde sessizce kalırlar, bu sırada processus vaginalis skrotum içinde uzar (7). Testisin transinguinal geçişi birkaç günde tamamlanır (8). Testislerin %75'i inguinal kanalı 24-28. gebelik haftasında geçer (9). Yani testislerin büyük çoğunluğu 23. haftada karın içindeyken 30. haftada skrotuma inmiş olurlar (8).

Testisin böbrek bölgesinden inguinal kanala doğru yer değiştirmesinde fetal Leydig hücrelerinden salgılanan insülin benzeri faktör-3 rol oynamaktadır (10).

Testisin inişinde etkili faktörler olarak androjenler dikkati çekmektedir. Androjenlerin, gubernakulumun oluşmasında etkileri olmamasına rağmen, testisin kasık bölgesinden skrotuma inişinde etkili olduğu düşünülmektedir. MIF' in de gubernakulum oluşumuna etkisi oldukça azdır (11).

2. Spermatogenez

Testisler, sölom epitelinin proliferasyonu ile karın arka duvarında gonadal tümsek içinde gelişirler. 4. haftada yolk sac'ın endodermal yüzey hücrelerinden ilkel germ hücreleri oluşur ve fetal dolaşıma katılarak ameboid hareketlerle, bazı kemotaktik faktörlerin de etkisi ile genital tümseğe ulaşırlar. Aynı zamanda sölom epiteli hücrelerinden Sertoli hücreleri, mezenkimal hücrelerden de interstisyel Leydig hücreleri meydana gelir. Leydig hücre oluşumunda insan koryonik gonadotropin hormonunun etkisi vardır. Fetal hayatın 12 ve 18. haftalarında serum testosteron düzeyleri ilk pikini yapar (200- 400 ng/dl). İlkel gonadda ilkel germ hücreleri (gonositler), Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri yerleşmiş olur (12).

Gonositleri iki farklı hücre grubu oluşturmuştur. Birinci grup, az mitokondri, bol mikroflament içeren büyük ve yuvarlak nükleuslu tüm gestasyon boyunca görülebilenler, ikinci grup ise, sitoplazmalarında bol mitokondri ve glikojen barındıran, gestasyonun 10. haftasında kaybolanlardır.

Seminifer tübüllerde germ hücrelerinin gelişimi 3 basamakta gerçekleşir: 1) Spermatogoniumların mitoz ile çoğalması, 2) Mayoz bölünme ile kromozom sayısının yarıya inmesi, 3) Spermioyogenez (12).

Gonositler fetal hayatta mitotik duraklamaya uğrarlar (37). Doğumdan sonraki ilk 6 ay içinde FSH, LH ve testosteronun da serum konsantrasyonlarının aynı zamanda yükselmesiyle gonositler tekrar aktive olarak mitoz devam eder ve spermatogoniumlara dönüşüm gerçekleşir (35, 36, 38). Bununla birlikte gonositler 4 yaşa kadar testiste görülebilirler. İlk olarak koyu sitoplazmalı spermatogonium Ad' ler oluşur. Bunların bir kısmı mitozla çoğalarak yeni kök hücreleri oluştururken diğer bir kısmı da daha açık sitoplazmalı spermatogonium Ap' leri oluşturur. Spermatogonium Ap' ler pubertede FSH ve LH etkisiyle spermatogonium B' lere d n ş rlere. Puberte öncesinde seminifer tübüllerin lümenleri henüz oluşmamıştır. İmmatür Sertoli hücreleri ve aralarında spermatogoniumlar bulunur. Sertoli hücreleri arasında henüz özel bağlantı kompleksleri gelişmemiştir. Pubertede hormonal uyarı ile germ hücreleri bazale doğru yer değiştirerek olgun spermatogoniumları oluşurmaya başlarlar. Bu arada Sertoli hücrelerinin nükleusları bazale kayar ve hücrelerarası bağlantı kompleksleri gelişir. Spermatogonium B' ler mitoz ile çoğalarak preleptoten spermatisitleri oluştururlar. Bu hücreler seminifer tubullerin bazal membranına yakın yerleşmişlerdir. DNA duplikasyonu yaparlar. Sertoli hücreleri arasından lümene doğru ilerlerler. Spermatisitler bu sırada önce leptoten, ardından zigoten dönemine girerler. Pakiten döneminde genetik materyal değişimi devam eder ve ardından hücre uzun bir diploten safhasına girer. Eşleşmiş kromozomlar ayrılır ve aralarında köprüler oluşur. Kromozomların metafaz plağında toplanmalarından sonra, 1. metafaz ve sırayla anafaz, telofaz safhaları gelişir. Sonuçta, haploid ($23n$) sayıda kromozom içeren sekonder spermatisitler meydana gelir. Yeni bir DNA sentezi olmadan 2. mayoz bölünmeye girerler ve ge spermatisitler oluşur. Spermatisitler olgun spermatozoa (olgun sperm hücresi) oluşana kadar birtakım morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler geçirirler. Bu başkalaşma ve değişikliklere spermioyogenez denir. Sertoli hücreleri içinde olgunlaşan spermatozoa aktif olarak lümen içine atılır. Bu olaya ise spermioyasyon adı

verilir. Spermatogenez, Y kromozomunun uzun kolundaki AZFa, AZFb, AZFc bölgelerinde bulunan pekçok gen tarafından yönetilir (12).

Erken evre sperm hücrelerinin yalnızca kalitatif olarak yapımını sağlamak için testosteron yeterli olurken, ileri basamak sperm hücrelerinin gelişimi için FSH' ya ihtiyaç vardır. Ayrıca puberte öncesi spermatogenezin başlaması için FSH ve LH' ya birlikte ihtiyaç varken puberte sonrası spermatogenez başlatmak için LH yeterlidir (12).

Spermatogenezin kontrolünde santral sinir sisteminin de etkisi vardır. Korteks, limbik sistem, hipotalamus ve özellikle mediobazal hipotalamusu oluşturan çekirdeklerden premammalian nükleus, arkuat nükleus, supraoptik nükleus, suprakiazmatik nükleus ve teberal alan, GnRH salgılanmasından sorumlu önemli merkezlerdir. Kolesistokinin, oksitosin ve GABA-B, norepinefrin üzerine negatif etki yaparak GnRH salgısını azaltırken, nöropeptid-Y ve angiotensin 2 ise norepinefrin salgısını artırarak GnRH salgılanmasını uyarırlar. ACTH ve dopamin, opioid peptidleri uyararak GnRH salgılanmasını azaltır. GnRH' nın, dolayısıyla LH' nin azalmasıyla Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronun azalması spermatogenez olumsuz etkiler. FSH uyarısı ile Sertoli hücrelerinden androjen bağlayan protein (ABP) salınır. ABP, spermatozoanın matürasyonunda oldukça önemlidir. Testosteron Leydig hücrelerinden salgılandıktan sonra lokal dolaşım ile Sertoli hücrelerine ulaşır ve sitoplazmaya girerek ABP' ye bağlanır. Testosteron-ABP kompleksi daha sonra germinal hücrelerin içine, seminifer tübüllerin lümenine ve buradan da epididime kadar taşınarak androjen etkisi sağlanmış olur (12).

3. Kriptorşidizm

Yunanca " saklı gonad " anlamına gelen kriptorşidizm; ya testisin hiç olmaması, ya da embriyonik yerleşiminden skrotuma inişi sırasında bir duraklama sonucu, testisin skrotum içinde olmaması durumudur. Balinalar ve filler hariç tüm memelilerde bulunan skrotum, karın içinden birkaç derece daha düşük olan ısı ile testiküler işlevlerin gerçekleşebilmesi için en uygun ortamı sağlamaktadır (81).

Kriptorşidizm, yeni doğan döneminde %1-4 oranında görülürken, hayatın 1. yılında bu oran %1' e geriler (39). Karsinogenez riski ve infertiliteyle ilişkisi nedeniyle önemlidir (102, 103).

Kriptorşidizm, çeşitli sendromların bir parçası olarak da görülebilir. İnterseks, Prune-Belly sendromu, mesane ekstrofisi, böbrek ve üriner sistem anomalileri, hipospadias, imperfore anüs, nöral tüp defektleri gibi klinik durumlarla birlikte görülebilir (44, 45). Sık rastlanan histolojik bulgular ise : 1) Değişik matürasyon evrelerindeki germ hücrelerinin sayılarında azalma, 2) Seminifer tübül çaplarında değişiklik, lamina propriada kalınlaşma, 3) Peritübüler fibrozistir (79, 80).

3. 1. Sınıflama

İnmemiş testis, retansio testis, maldesensus testis, kriptorşidizm terimlerinin hepsi aslında testisin olması gerektiği yerde, yani skrotum içinde olmadığını anlatmaktadır.

Klinik pratikte palpe edilebilen / edilemeyen, iki taraflı / tek taraflı kriptorşidizm ayırımları, yararlı sınıflamalardır (49).

Testisin yerleşim yerinin yüksek / alçak abdominal, inguinal, supraskrotal, yüksek skrotal, ektopik gibi ayrıntılı tarifi, testisin inip çıkıyor olmasının belirtilmesi, geçirilmiş inguinal cerrahi sonrası ortaya çıkan iatrojenik kriptorşidizm olduğunun vurgulanması, yapılacak çalışmalar için ortak dil oluşturulması bakımından önemlidir. Retraktif testis ise başlangıçta olmadığı halde manipülasyonla ağrısız bir şekilde skrotumun en alt tarafına kadar inebilen ve orada kalan testisi tarif eden bir terimdir ve normal testis yerleşimi varyasyonudur (50).

3. 2. Epidemiyoloji

Kriptorşidizmle ilgili çalışmaların toplanarak ortak bir kanaate varılmasında bazı zorluklar mevcuttur. Bunun nedeni testislerin yerinin tarifinde ortak metodolojinin kullanılmamasıdır. Örneğin retraktif testisler bazı çalışmalarda kriptorşidik olarak nitelendirilirken bazılarında ise normal olarak

belirtilmiştir. Birkaç güvenilir araştırma sonucuna göre son dönemlerde ABD ve Avrupa'da kriptorşidizm görülme sıklığı artmıştır (39).

Yapılan kontrollü çalışmalarda kriptorşidizmin; düşük doğum ağırlığı, anne yaşının özellikle 20' nin altında olması, ilk doğum olması (40), sezaryen, gebelik toksemisi, miyadından önce doğum (41), maternal obezite (42), annede diyabet (41, 43), fetal hayatta dietilstilbesterole maruz kalma ile yakın ilişkili olduğu saptanmıştır.

3. 3. İnfertilite ile İlişkisi

Kriptorşidizm ve infertilite için yapılan araştırmaların çoğunda normal sperm sayısının alt sınırı olarak Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) belirlediği 20 milyon / ml sınırı kullanılmıştır. Yetişkin çağda olup iki taraflı kriptorşidizmi olanlar azospermiktir. Bu kişilere iki taraflı orşiopeksi ameliyatı uygulandığında yaklaşık %28'inin normospermik hale geldiği saptanmıştır. Tek taraflı kriptorşidizmi olanların ise yaklaşık %49'unun sperm sayıları normal olup orşiopeksi ameliyatı uygulandıktan sonra bu oranın %71 olduğu bulunmuştur. Tedavi ile birlikte babalık oranlarının bilateral kriptorşidizmi olanlarda iyileştiği (46), tek taraflı olanlarda ise değişmediği görülmüştür (47, 48).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; bilateral kriptorşidizmde orşiopeksi 10 ay - 4 yaş arasında yapıldığında %76 olguda, 4 yaş - 14 yaş arası yapıldığında ise %26 olguda normal sperm sayısını sağlamıştır. Tek taraflı kriptorşidizmde ise zamanlamanın etkisi bu kadar belirgin değildir (51).

3. 4. Testis Kanseri ile İlişkisi

Kriptorşidizm testis neoplazmları için iyi bilinen bir risk faktörü olmasına karşın, kriptorşidizm ile ilişkili bulunan testis kanseri oranı yalnızca %5' tir (51). Son dönemlerde yapılmış germ hücreli testis tümörü epidemiyolojisi ile ilgili metaanalizde, öyküsünde kriptorşidizm bulunanlarda risk 3.5 - 17.1 kat fazla bulunmuştur (52). Germ hücreli testis kanserleri ve kriptorşidizmin, intrauterin ve perinatal dönemdeki testis gelişimi sırasında

bazı ortak etyolojik faktörlere sahip olabileceği ihtimali üzerinde durulmaktadır (53, 54).

Kriptorşidizm öyküsü olan erişkinlerde malignite ile çok yakın ilişkili olan testiküler CIS oranının %2.9 civarında olduğu tahmin edilmektedir (55).

İki taraflı kriptorşidizm, tek taraflıdan daha fazla kanser riski taşımaktadır (51). Tek taraflı kriptorşidizmde tümörlerin çoğu etkilenen testistedir. Ancak %8-15 olguda karşı taraf inmiş testiste de olabilmektedir (56). Kriptorşidizmi olan bireydeki normal testisin tümör riski, hiç kriptorşidizmi olmayan birine göre 1.6-2.1 kat daha fazladır (52). İntra-abdominal yerleşimli testislerde tümör riski oldukça yüksektir; yapılan bir çalışmada, yetişkinlerde palpe edilemeyen testislerde tümör bulunma ihtimali yaklaşık %40 bulunmuştur (57).

3. 5. Tedavi

Kriptorşidizm tedavisinde iki temel yaklaşım vardır. Bunlar cerrahi ve hormonal tedavidir. Tedavinin zamanlaması ile ilgili genel kabul edilen görüşe göre testisin skrotuma 1 yaş öncesinde indirilmesi yetişkin dönemde testis işlevleri açısından önemlidir (90, 85).

A. Hormonal

İnmemiş testiste hormon tedavisi iki amaçla kullanılmaktadır: 1) Testisin skrotuma inmesini sağlamak, 2) Fertilitate potansiyelini artırmak. Bunlardan ilkinin prensibi deneysel gözlemlere dayanır ve testisin inişinde androjenlerin rol oynadığı görüşünü temel alır (87). Testisi skrotuma indirmek için dışarıdan verilen hCG, GnRH ya da LHRH agonistleri kullanılmıştır. HCG tedavisinde uyarılan Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron ile testis inişi sağlanmaktadır. GnRH tedavisinde ise LH ve FSH'nin endojen salınımı artırılarak iniş sağlanmaktadır (67). Başarı oranı testisin ilk pozisyonuyla yakından ilişkili olup, alt seviyelerdeki testislerin inişinde daha yüksektir. Ayrıca tedavi sonrasında %25 olguda testis, tekrar supraskrotal seviyeye yer değiştirebilmektedir (58). Cerrahi sonrası

uygulanan hormonal tedavinin ise sperm parametreleri üzerine olumlu etkisi klinik pratiğe girmemiş olsa da gösterilmiştir (59, 60).

Hormon tedavisiyle ilgili olarak; enjeksiyon bölgesinde ağrı, penis büyümesi, kasıklarda ağrı, ağrılı ereksiyon, testislerde inflamatuvar değişiklikler, germ hücre apoptozisinde artış, erişkin dönemde germ hücre sayısında ve testis boyutunda azalma (61-63), erken epifiz kapanması, sekonder seks karakterlerinin hızlı ortaya çıkması (pubik kıllanma gibi), çocukta saldırgan davranış tarzı, skrotumda pigmentasyon artışı, kilo alma hızında artış, β -hCG ile hücresele bağışıklıkta geçici azalma gibi istenmeyen etkiler bildirilmiştir (87).

Çeşitli çalışmalarda GnRH, LHRH ve β -hCG etkinlikleri birbirleriyle ve plaseboyla karşılaştırılmıştır. Bu çalışmaların sonuçları, genel olarak inmemiş testisin skrotuma yerleşmesini sağlamada hormon tedavisinin tatmin edici bir etkinliğe sahip olmadığını, bu ajanların da birbirlerine üstünlüğü olmadığını düşündürmektedir (87). β -hCG ve GnRH ile yapılan hormonal tedavileri irdeleyen metaanaliz sonuçlarına göre testisin skrotuma kalıcı bir şekilde yerleşmesini sağlamada etkinlikleri ortalama %20 dir (58).

Yapılmış çalışmalara ilgili bir sorun, retraktıl testislerin tanımlanıp çalışma grubuna dahil edilip edilmemesi durumudur ki, muhtemelen bu nedenle literatürde çok farklı tedavi başarı oranları bildirilmiştir. Öte yandan, testisin inişinde hormonal mekanizma tek başına rol oynamamaktadır. Bunun en önemli göstergesi, tek taraflı inmemiş testislerin varlığıdır. Yine inguinal eksplorasyon sırasında gubernakulumun nereye yapıştığı araştırılmış ve olguların çoğunluğunda skrotum iç duvarı dışında yapışma noktaları saptanmıştır (88). Gubernakulumların yanlış yönlendiği bu testislerin, bir anlamda “ektopik” olduğu ve testisin inişine anatomik bir engel bulunduğu, dolayısıyla hormon tedavisinin inişi sağlamasının bu olgularda mümkün olmadığı anlaşılmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı, inmemiş testisin skrotuma yerleşmesini sağlamada altın standart hala cerrahidir.

B. Cerrahi

Fertilitenin korunabilmesi için, geri dönüşümsüz hasarlanmaların başlamasından önce yapılmış bir orşiopeksiyle inmemiş testisin skrotuma yerleştirilmiş olması gereklidir (89, 92). Bu tedavide başarı, yani testisin skrotuma indirilmesi ve atrofiye uğramaması testisin ilk yerleşim yerine (palpe edilebilir / edilemez oluşuna), cerrahi tekniğe ve ameliyat sırasındaki yaşa bağlıdır. Tedavinin başarısızlığına karar vermek için en az 1 yıllık bir süre geçmesi gerekir. Son 10 yıllık dönemde inguinal yerleşimli testislerde orşiopeksinin başarıları %95' in üstüne, abdominal yerleşimlilerde ise gerek açık gerekse laparoskopik yöntemle tek veya iki aşamalı, Fowler-Stephens orşiopeksi ile %85-90 ların üzerine çıkmıştır (64).

Cerrahi tedavi tek taraflı ve çift taraflı kriptorşidizmde sperm sayısını artırmaktadır (51). Orşiopeksinin Sertoli hücre fonksiyonlarına etkisi ise postoperatif inhibin B seviyeleri ile yansıtılabilir. Yetişkin dönemde, 2 yaş öncesi orşiopeksi yapılanlardaki inhibin B seviyesi, daha geç yaşta opere edilenlerden daha yüksek bulunmuştur (67). Orşiopeksi geç yaşta yapılırsa Leydig hücre fonksiyonlarındaki azalma da fazla olmaktadır (65, 66).

Cerrahi tedavinin komplikasyonları ağrı, hematoma, enfeksiyon, atrofi, nadiren vas deferens yaralanması ve anesteziye bağlı komplikasyonlardır (64).

4. Apoptozis

Köken olarak "apo-TOE-sis" den gelen ve eski Yunanca' da "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelen (13) apoptozis terimi, ilk kez Kerr ve ark. (14) tarafından 1972 yılında kullanılmıştır. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanan (15-17) bu olayda hücreler, kontrollü bir şekilde kendilerini öldürecek olan bir programı başlatırlar (18).

Gelişim sırasında artık ihtiyaç duyulmayan yapılar apoptozis ile ortadan kaldırılır. Yaşam boyunca vücuda yararı olmayan veya zararlı olabilecek yaşlı, enfekte, mutasyona uğramış, yaralanmış hücreler ile germ hücrelerinde olduğu gibi çok fazla sayıda üretilen hücreler bu yolla ortadan

kaldırılır. Apoptozis sırasında hücre büzülür, iskeletinde değişiklikler oluşur, çekirdeği yoğunlaşır, internükleozomal DNA parçalanmaları olur (19). Bu parçalanma en karakteristik özelliklerinden birisidir ve apoptozisin saptanmasında kullanılır (21).

Apoptozis regülasyonu, temelde genetik olarak yapılır (20). Oluşumu ise kendiliğinden veya özgül bir fizyolojik uyarın ile de gerçekleşebilir. Örneğin karın içi veya kasık kanalı içindeki testislerde skrotumdan birkaç derece daha yüksek olan ısı, testisteki apoptozisi tetikleyebilir (28, 86). Hafif derecede hiperterminin sıçan tümör hücrelerinde apoptozis başlatarak ölümlerine neden olduğunun bulunması (28), olması gerekenden daha yüksek ısıya maruz kalan karın içindeki testiste de apoptozisin araştırılmasına yol açmıştır.

Hücre ölüm çeşitlerinden olan nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plasma membranı yırtılır. Sitoplazma içeriği hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin meydana gelebilmesi için hücre içinde ATP seviyesinin yüksek olması gerekir. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da hücrenin enerji merkezi olan mitokondrinin apoptozisin erken safhasındaki önemini göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (22).

Tüm hücreler kaspaz denenen proteazlara sahiptir. Bunlar hücre içinde inaktif formları olan prokaspazlar olarak bulunurlar ve apoptozis mekanizmasında kilit rol oynarlar. Kaspaz-1 ve 3' ün inhibitörleri apoptozisi inhibe ederler (77). Kaspaz-6, çekirdek zarındaki protein tabakayı etkileyerek nükleusun ayrışmasını sağlar ki bu apoptozisin kilit aşamalarındandır (76).

Günümüzde kaspaz aktivasyonunu sağlayan 3 temel mekanizma bilinmektedir. Bunlar: 1) Reseptör-Ligand bağlanması ile kaspaz-8' in aktivasyonu, 2) Mitokondrial mekanizma ile kaspaz-9' un aktivasyonu, 3) Endoplazmik retikulumun dahil olduğu kaspaz-12 aktivasyonu ile devam

eden mekanizma (75). İlk iki mekanizma sonunda kaspaz-3 aktive olmaktadır.

Apoptoziste en iyi bilinen ligandlar Fas ligand ve Tümör Nekrozis Faktör Alfa' dır (TNF-Alfa) (74).

Apoptozise giden hücreler fagositoz yoluyla ortamdan yok edilirler (23). Spermatogenez sırasında spermatogenik hücrelerin yarıdan fazlası olgun spermatozoa olmadan apoptozis yolağı ile ortadan kaldırılır (24, 25 , 38). Olgunlaşma sırasında spermatogenik hücrelerde değişik basamaklarda apoptozis olduğu bilinmekle birlikte (26-30) histokimyasal inceleme yapıldığında apoptozise giden spermatogenik hücrelerin çoğunluğu gösterilemez. Bunun muhtemel nedeni ise hızla fagosite edilmeleridir (23, 31-33). Sertoli hücreleri, apoptotik spermatogenetik hücrelerin membranlarındaki fosfatidilserin aracılığıyla bu hücreleri tanıyarak fagosite eder (34).

4. 1. Apoptozis Tanı Araçları

A. Morfolojik

Morfolojik değişiklikler en iyi elektron mikroskop ile belirlenir. Işık mikroskobu ile de hematoxilen, *Shiff* ayırıcı gibi nükleik asitlere bağlanabilen boyalarla gösterilebilir. Ayrıca floresan mikroskop ile *Acridin orange* ve *Hoechst* gibi apoptotik hücredeki yoğunlaşmış DNA' yı ortaya koyabilen floresan özellikli maddeler kullanılarak gösterilebilir (73).

B. Jel Elektrofrezisi

Kaspaz aktivitesi, kaspazlara karşı özgül antikolar ile *Western Blot* yöntemi kullanılarak ortaya konabilir. Dezavantajı, hücrelerin tek tek değil de toplam olarak aktivitelerinin gösterilmesidir (73).

C. Histokimyasal

DNA kırılmaları in situ olarak TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labelling*) yöntemi ile gösterilebilir. Bu

yöntemde işaretlenmiş dUTP' ler enzimatik olarak DNA parçalarının 3-OH sonlanmalarına eşleştirilir ve histokimyasal olarak gösterilir (72).

Diğer bir yöntem, formamin içinde ısı yükseltildiğinde yalnızca apoptotik hücrelerin tek DNA zincirlerinin açığa çıkarılması ve bu zincir üzerindeki 25 - 30 baz uzunluğundaki spesifik nükleotid dizinlerinin monoklonal antikorlarla işaretlenmesidir (71).

Başka bir yöntem Kaspaz-3 'ün immünohistokimyasal olarak gösterilmesidir (78).

Kaspaz-3'ün gösterildiği ardından TUNEL'in kullanıldığı kombine yöntem de tanımlanmıştır (70).

D. Flowsitometri

Bu yöntem, *Annexin V* proteininin apoptotik hücre membranındaki fosfotidilserine bağlanmasının gösterilmesi esasına dayanır (69).

E. Mitokondriyal Transmembran Potansiyeli Tayini (68)

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Hayvanı Etik Kurul onayı (06.12.2006 / 58) alındıktan sonra Nisan-Haziran 2007 tarihleri arasında, 60 adet 22 günlük sağlıklı erkek Sprague Dawley cinsi rat üzerinde, Marmara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda yapıldı. Çalışmanın yapıldığı laboratuvar ortamının ısısı sürekli 24 ± 2 °C' de tutuldu ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortam sağlandı. Ratlar standart pellet yem ile beslendiler. Kafeslerde istedikleri anda içebilecekleri su bulunduruldu. Her kafeste toplam 4 rat olacak şekilde 15 adet kafese yerleştirildiler.

Sham operasyonu yapılacak, deneysel kriptorşidizm oluşturulacak, deneysel kriptorşidizm oluşturulup β -hCG verilecek ana gruplardan erken ve geç orşiektomi yapılacak ikişer kol oluşturuldu. 60 rat, oluşturulan bu 6 gruba eşit olarak dağıtıldı (Tablo 3.1)

Hormon tedavisi gruplarındaki ratlara deneysel kriptorşidizm oluşturulduktan sonraki ilk günden itibaren 7 gün boyunca 50 IU / kg / gün dozunda subkütan soğuk zincir koşullarında tutulan β -hCG (Pregnyl Flakon 1500 IU[®] , Organon) uygulandı (91). Yapılan günlük kontrollerde sol skrotal kompartıman daima boş olarak gözlemlendi. Sağ testisin ise çoğunlukla sağ skrotumda olduğu saptandı.

Erken dönem incelemeler için deneysel kriptorşidizm oluşturulmasından sonraki 8. gün, geç dönem incelemeler için ise 30. günde orşiektomi yapıldı. Sham grubunda da yine sol testisin manipule edildiği ilk ameliyattan sonraki 8. ve 30. günlerde, diğer gruplarda yapılan işlemler aynı şekilde yapıldı.

Tüm ratlarda orşiektominin hemen sonrasında testislerin ağırlıkları, tunika albuginea dışındaki dokular keskin diseksiyon ile uzaklaştırıldıktan sonra elektronik hassas terazi ile gram cinsinden ölçüldü. Orşiektomi ile elde edilen testis dokularında uygun histopatolojik ve immünohistokimyasal boyama teknikleri kullanılarak fertilité indeksi ve apoptozis indeksi araştırıldı. Kaydedilen ağırlıklar kullanılarak gruplar arasında kıyaslama yapıldı.

Yapılacak immünohistokimyasal boyamada (TUNEL) pozitif kontrol preparatı olarak kullanılmak üzere 1 adet yetişkin, emziren dişi Sprague Dawley cinsi ratın 2 adet meme dokusu alındı. Yavruları 22 günlük olan rat, bu işlemden önce sütten kesildi. Sütten kesilmesinin 4. gününde intraperitoneal Ketamin HCl (Ketalar Flakon[®] , Pfizer) + Ksilazin (Rompun %2 Flakon[®] , Bayer) anestezisi altında 2 adet meme dokusu çıkarıldı ve işlem sonunda rat servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Çıkarılan doku %10 formalin solüsyonunda 18 saat bekletildikten sonra doku takip işlemleri tamamlanarak parafin bloklar hazırlandı ve 3 µm lik kesitler alındı.

Tablo 3.1. Çalışma grupları.

Erken orşiektomi (8. gün)	Geç orşiektomi (30. gün)
Sham-E : Kontrol (Sham operasyonu) n:10	Sham-G : Kontrol (Sham operasyonu) n:10
Kript-E : Deneysel kriporşidizm n:10	Kript-G : Deneysel kriporşidizm n:10
Hor-E : Deneysel kriporşidizm + Pregnyl n:10	Hor-G : Deneysel kriporşidizm + Pregnyl n:10

1. Cerrahi Teknik

Ratlar tartıldıktan sonra anestezi için 40 mg / kg dozunda Ketamin HCl (Ketalar Flakon[®] , Pfizer) ve 10 mg / kg dozunda Ksilazin (Rompun %2 Flakon[®] , Bayer) karışımı, intraperitoneal yoldan uygulandı. Yaklaşık 5 dakika içinde tam anestezi düzeyine ulaşıldı. Karın sol alt kadrant bölgesinde 2 cm² lik alan traş edildi. 35 °C' lik sıcak su içeren kap içinde ısıtılmış jel torbası üzerine yatırılan ratların kesi bölgeleri antiseptik solüsyonla silindikten sonra, karın sol alt kadrantlarına orta hattın 0.5 cm soluna 1 cm' lik vertikal bir kesi yapıldı. Kesi hattında peritona kadar keskin diseksiyona devam edildi. Periton penset yardımı ile asılarak vertikal yönde makas ile kesildi ve intraperitoneal alana ulaşıldı (Şekil 3.1)

Her iki testis skrotumda palpe edildikten sonra kesi tarafındaki sol testis karına doğru itildi ve inguinal kanaldan doğurtularak karın içinde görünür hale getirildi. Testis, epididimden penset ile tutularak kesi hattından dışarı alındı (Şekil 3.2). Sham operasyonu grubunda testis, palpe edildikten sonra gubernakuler yapışıklıklara müdahale edilmeden tekrar skrotuma yerleştirildi. Periton ve ciltaltı dokular 4/0 krome katgüt, cilt 4/0 ipek ile kontinü tarzda sütüre edilerek kapatıldı. Deneysel inmemiş testis oluşturulacak gruplarda ise inguinal kanal ve skrotum içine yapışan gubernakuler bağlantılar makas ile kesilerek testis ve epididim serbestleştirildi. Bu işlem sırasında vas deferens ve vasküler yapıların korunmasına özen gösterildi. Testis batın içine, diyafragma altına doğru yerleştirildikten sonra, inguinal kanal girişi 4/0 *polyglycolic acid* ile 2 kez sütüre edildi (Şekil 3.3). Künt uçlu klemp yardımı ile kanal girişinin tamamen kapalı olduğu kontrol edildi. Periton ve ciltaltı dokular 4/0 krome katgüt ile, cilt 4/0 ipek ile kontinü tarzda sütüre edilerek operasyon tamamlandı (Şekil 3.4). Operasyon sonrası anestezi etkisi tam olarak geçinceye kadar ratlar 4 saat boyunca kafeslerde tek olarak tutulduktan sonra kuyrukları işaretlenerek tekrar eski kafeslerine 4' erli olacak şekilde yerleştirildiler.

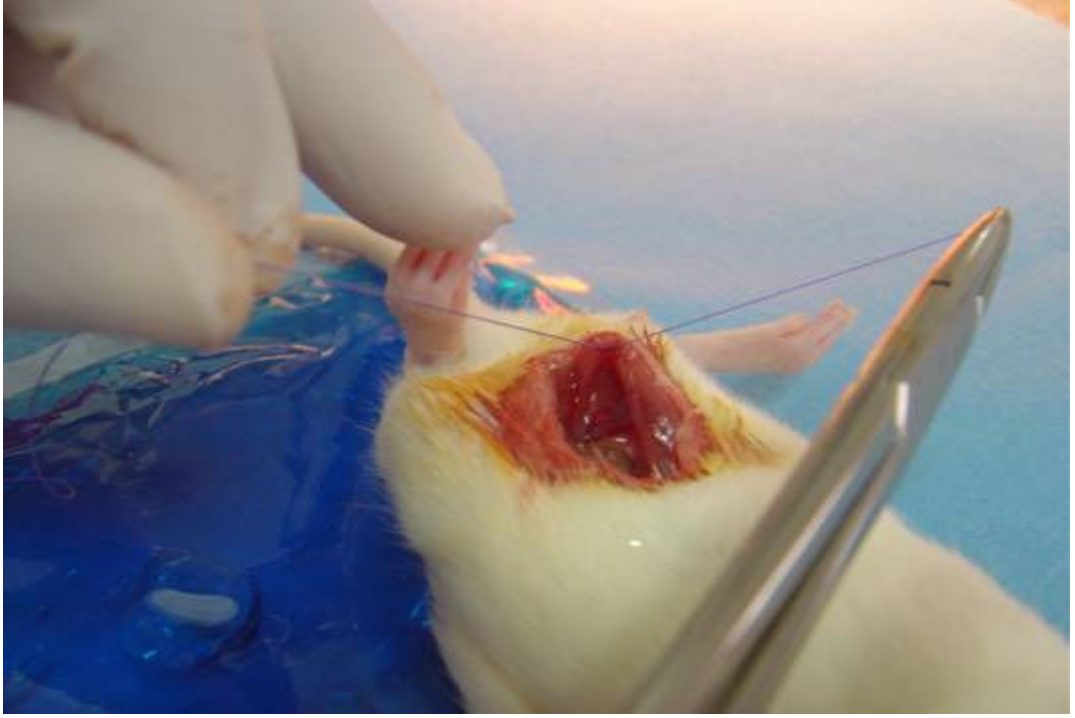
Orşiektomi zamanı geldiğinde, yine anestezi altında, Sham grubunda skrotumdaki, diğer gruplarda ise batın içindeki testis bulunarak eksize edildi. Eksize edilen testisler, %10' luk formalin çözeltisine bırakıldılar ve en geç 48 saat içinde, parafin blokların oluşturulması için GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Patoloji Laboratuvarına götürüldüler.



Şekil 3.1. Vertikal kesi ile karın içine ulaşılması.



Şekil 3.2. Sol testisin kesi hattından çıkarılması.



Şekil 3.3. İnguinal kanalın sûtür ile kapatılması.



Şekil 3.4. Periton, cilt altı dokular ve cildin kapatılması.

2. Histopatolojik İnceleme

Yüzde onluk formalin solüsyonu içindeki testisler, doku takibine alınıp sırasıyla değişik dereceli etil alkol ve ksilen serilerinden geçirilip parafinize edilerek parafin bloklar hazırlandı. Her bir olgu için hazırlanan bloklardan alınan kesitler, hematoksil-eozin ile boyanıp incelenerek, immünohistokimyasal uygulama için 1 negatif kontrol ve 1 test olmak üzere, pozitif yüklü lamlara 3 µm kalınlıkta ikişer kesit alındı. Apoptozisin immünohistokimyasal olarak gösterilebilmesi için TUNEL (*ApopTag® Plus Peroxidase, In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon International, Temecula, CA 92590*) yöntemi tercih edildi (87, 97-99). İmmünohistokimyasal boyama işlemi, tüm gruplar ve pozitif kontrol olarak meme dokusundan hazırlanan kesitlerde, kullanılan kitin prospektüsüne uygun biçimde, aşağıda belirtilen 13 aşamada tamamlandı.

1) Deparafinizasyon: Bloklar sırasıyla; 3 kez *Xylene* ile 5' er dakika, 2 kez %100 etanolle 5' er dakika, %95 etanolle 3 dakika, %70 etanolle 3 dakika yıkandılar. Son olarak 5 dakika PBS solüsyonunun içinde bekletilerek deparafinizasyon tamamlanmış oldu.

2) DNA' yı çıplaklaştırmak amacıyla, prospektüste belirtilen şekilde dilüe edilen (20 µg / ml) Proteinaz K (Proteinase K®, Diagnostic Biosystems, Pleasanton, CA 94566) enzimi, 12 µL/cm² ölçüsünde kesitlere doğrudan damlatıldı ve 15 dakika oda ısısında bekletildi. Preparatlar sürenin sonunda 2 şer dakika olmak üzere 2 kez distile su ile yıkandı.

3) Kesitler PBS ile seyreltilmiş %3 hidrojen peroksit solüsyonu içine bırakıldılar ve 5 dakika oda ısısında bekletildiler. Ardından 2 kez 5' er dakika PBS içinde yıkandılar.

4) Yıkama işlemi bittikten sonra, lam üzerindeki dokunun etrafında kalan sıvı dikkatlice silinerek, ivedi olarak 15 µL/cm² miktarında "*Equilibration Buffer*" solüsyonu, pipet yardımıyla doğrudan dokuya damlatıldı.

5) Doku üzerindeki solüsyon, lam sallanarak mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. Kalan solüsyon, dokunun etrafından dikkatlice silinerek temizlendi ve prospektüste belirtilen şekilde hazırlanarak saklanan *TdT* enzimi, ivedi olarak pipet aracılığıyla doku üzerine 12 µL/cm² miktarında

uygulandı. Doku üzerinden solüsyonun buharlaşmasını engellemek için üzeri plastik lamel ile kapatıldı ve tabanında bir miktar su bulunan kap içine dizilen preparatlar, 37 °C' deki etüv içine yerleştirilerek 1 saat inkübe edildi. Bu basamakta negatif kontrol preparatına *TdT* enzimi uygulanmadı.

6) İnkübasyon bitiminde, doku üzerindeki lamel kaldırılarak preparatlar 10 saniye süreyle prospektüste belirtilen şekilde hazırlanan "*Stop / Wash Buffer*" solüsyonu içine oda ısısında bırakıldı.

7) Solüsyon içinden çıkarılan preparatlar, 3 kez 1' er dakika PBS solüsyonu içinde yıkandıktan sonra, doku etrafındaki sıvı dikkatlice temizlenerek oda ısısında üzerlerine "*Anti-digoxigenin Conjugate*" solüsyonu pipet aracılığı ile 13 µL/cm² miktarında damlatıldı. Nemli ortamda 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.

8) Süre bitiminde preparatlar 4 kez 2' şer dakika PBS ile yıkandılar.

9) Doku etrafındaki PBS solüsyonu dikkatlice silindikten sonra, apoptotik hücrelerin boyanmasını sağlayan "*Peroxidase Substrat*" solüsyonu, kullanım kılavuzunda belirtildiği şekilde *DAB substrat* ve *DAB dilüsyon Buffer* solüsyonları karıştırılarak elde edildi ve tüm dokuyu kaplayacak şekilde pipet yardımı ile 15 µL/cm² miktarında doğrudan damlatıldı. Lam, ışık mikroskobu altına alındı ve boyanmanın gerçekleşmesi gözlemlendi. Boyanma yaklaşık 3. dakikada istenilen şekilde gerçekleşti.

10) Boyanma işleminin ardından preparatlar 3 kez distile su ile yıkandı ve son olarak oda ısısında 5 dakika süreyle tekrar distile su içinde bekletildi.

11) Distile su içinde 5 dakikası tamamlanan preparatlar, 0.1 M sodyum asetat ile pH: 4 olacak şekilde önceden hazırlanmış %0.5 *metil-green* zemin boyama solüsyonu içerisine alınarak oda ısısında 10 dakika bekletildiler. 10 dakika sonunda 3 kez distile su ile, ardından 3 kez %100 N-Butanol solüsyonu ile yıkandılar.

12) Yıkama işleminin ardından preparatların üzeri aköz kapama maddesi kullanılarak kapatıldı ve preparatlar ışık mikroskobu ile değerlendirmeye alındı.

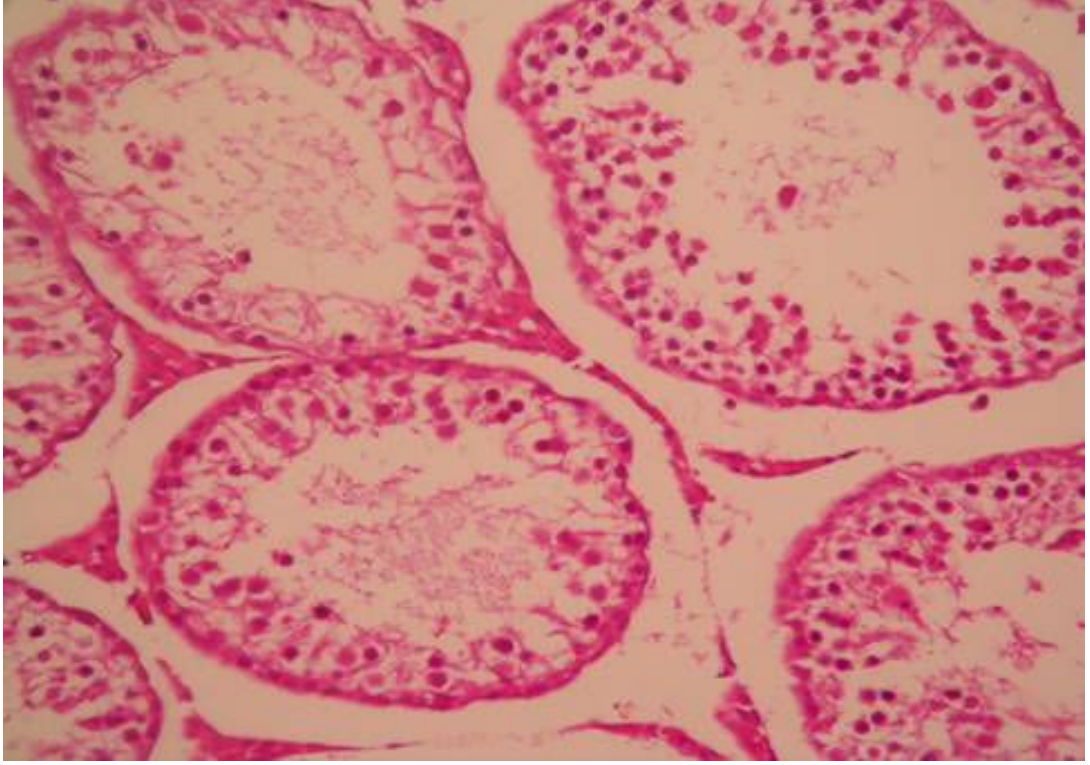
Hematoksilen-eozin ile boyanan preparatlarda (Şekil 3.5) 400 büyütmede kesit alanını dik gören 30 adet seminifer tübül içindeki spermatogoniumlar sayıldı ve tübül başına düşen ortalama spermatogonium sayısı, fertilité indeksi olarak kaydedildi (93)

Apoptozis indeksi ise seminifer tübül başına düşen apoptotik hücre sayısı olarak tanımlandı (82, 83). Apoptozis indeksinin hesaplanması için, TUNEL yöntemi ile boyanan preparatlarda (Şekil 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11) tüm testisin histolojisini ortalama olarak yansıtabilecek alanlardan, kesit yüzeyini dik gören 50 adet seminifer tübül ve içlerindeki apoptotik hücreler sayıldı.

Kullanılan pozitif kontrol preparatının TUNEL yöntemi ile boyandığı, negatif kontrol preparatının (Şekil 3.12) ise boyanmadığı görülerek, yöntemin doğruluğu ve kullanılan reaktiflerin sağlamlığı kontrol edilmiş oldu.

3. İstatistiksel Yöntem

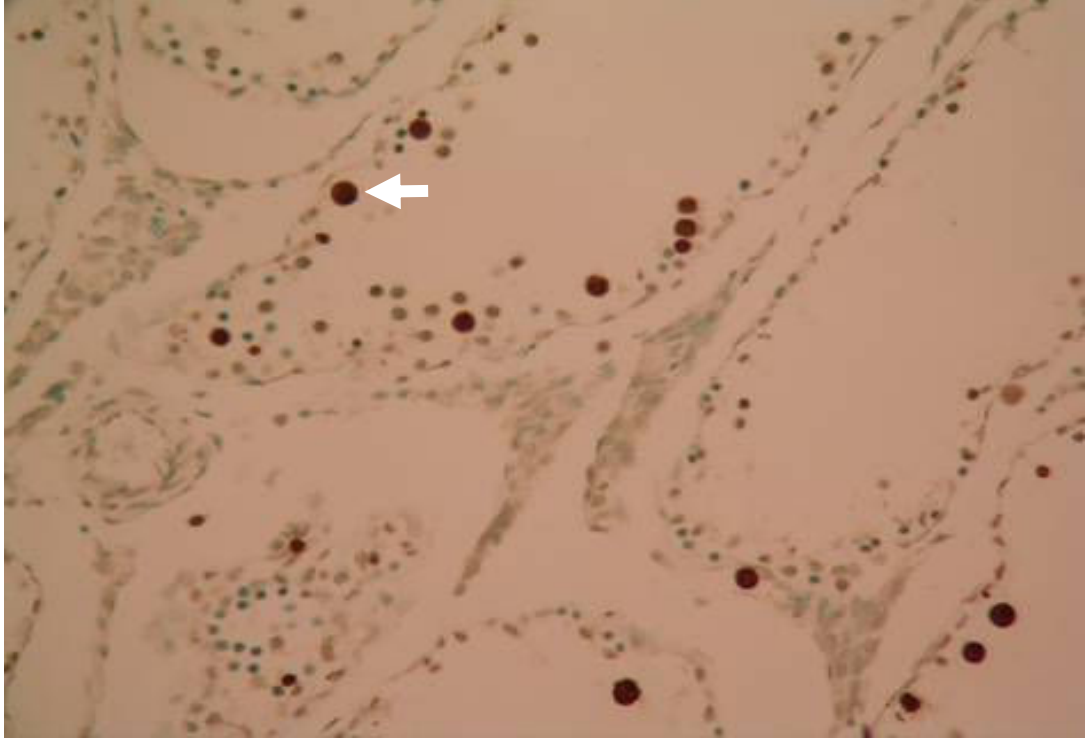
Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için *SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 11.0* programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel yöntemlerin (Frekans sayımı, standart sapma) yanısıra verilerin dağılımları Kolmogorov-Smirnov testi, grafiksel dağılımlar ile test edildikten sonra normal dağılım gösteren veriler için varyans analizi (ANOVA, Post-Hoc Shceffe testi, Eşleştirilmiş Gruplarda t testi, normal dağılım göstermeyen veriler için Kruskal Wallis Varyans Analizi, Mann-Whitney U testi, Willcoxon testi kullanıldı. Sonuçlar %95' lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi. Verilerin ilişkileri Pearson Korelasyon katsayısı ile araştırıldı, ilişki katsayısı %95' lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ ve %99' luk güven aralığında, ileri derecede anlamlılık $p < 0,01$ düzeyinde değerlendirildi.



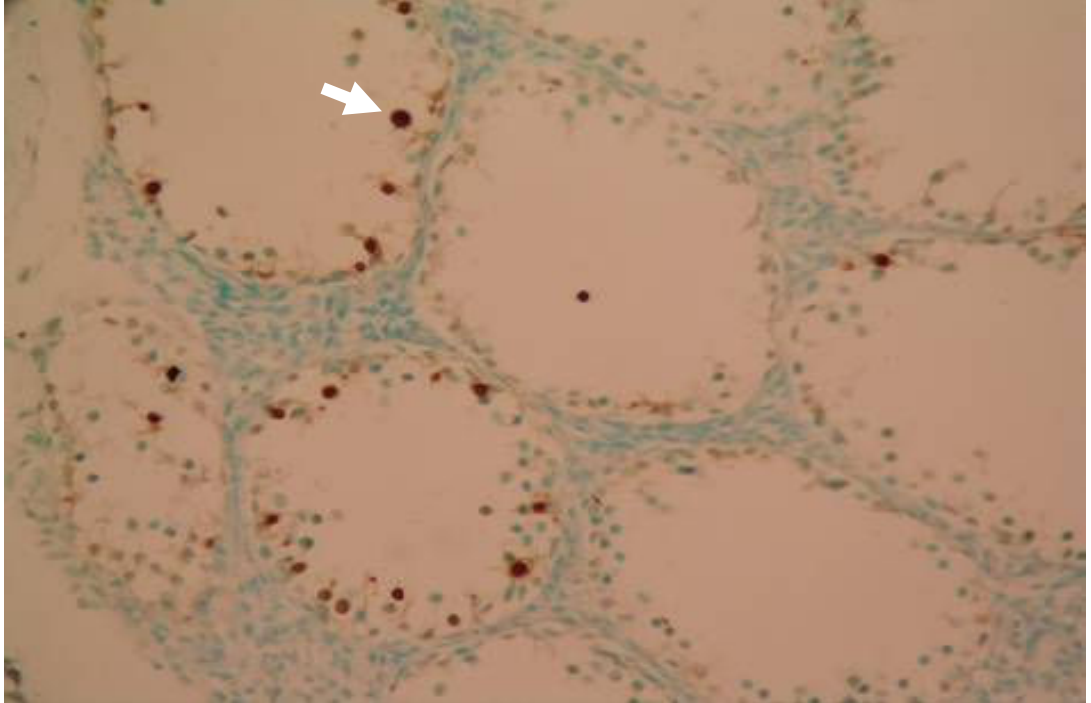
Şekil 3.5. Hematoksilen-eozin ile boyama (200X).



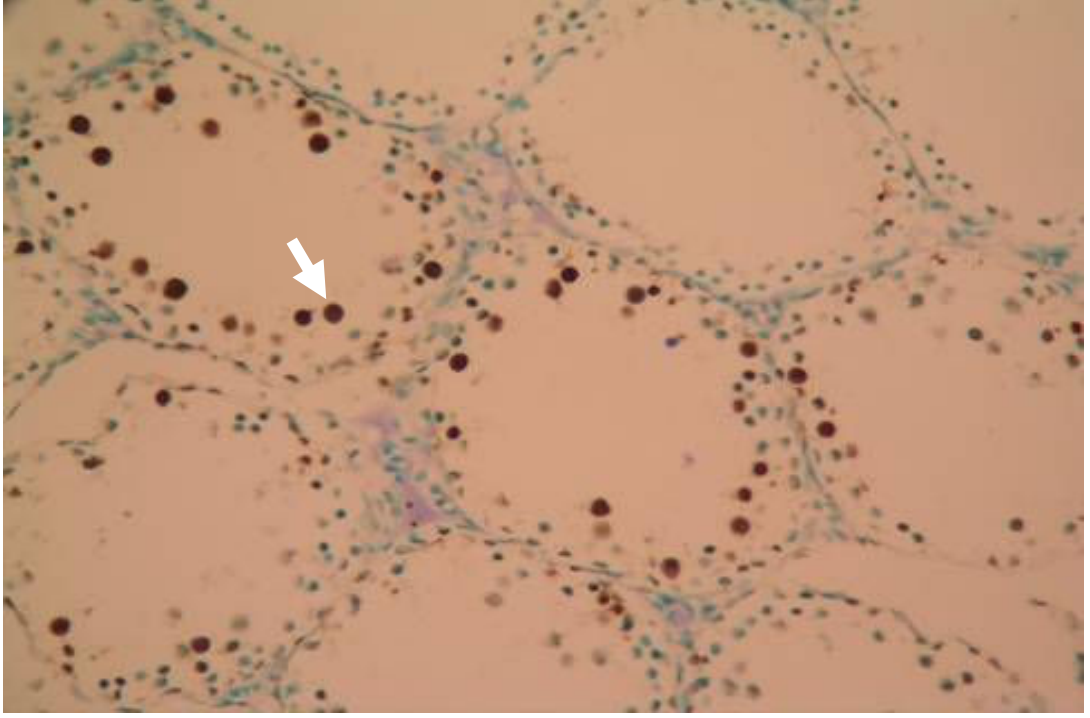
Şekil 3.6. Negatif kontrol (100X).



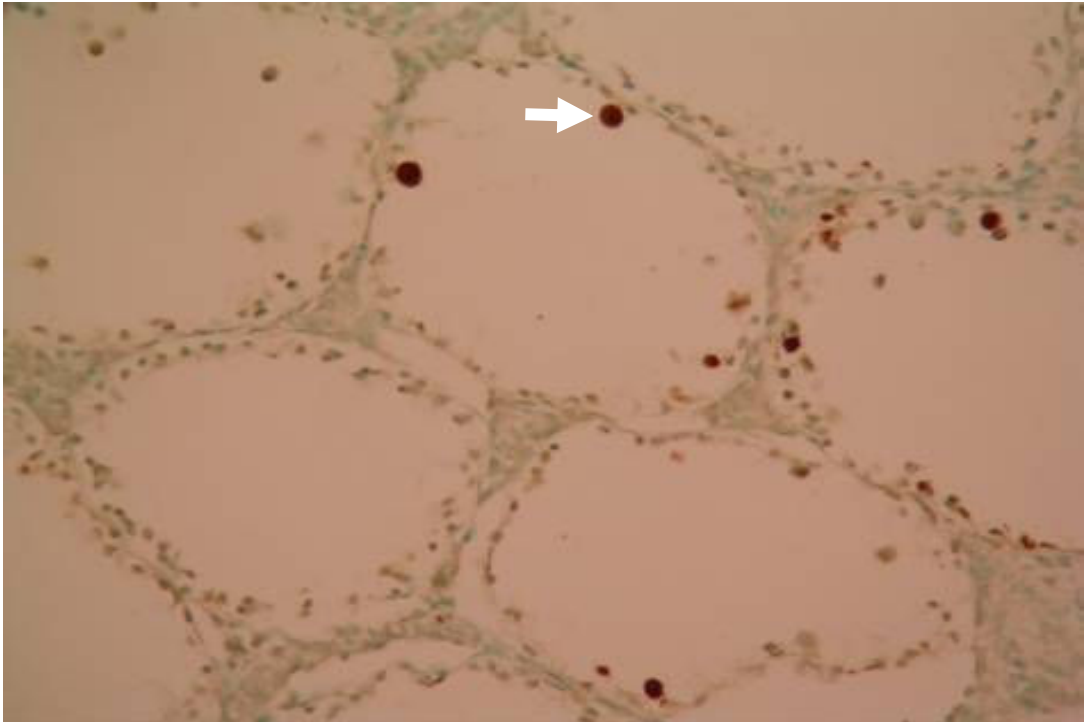
Şekil 3.7. Hor-E grubu (200X). Ok, apoptotik germ hücrecini göstermekte.



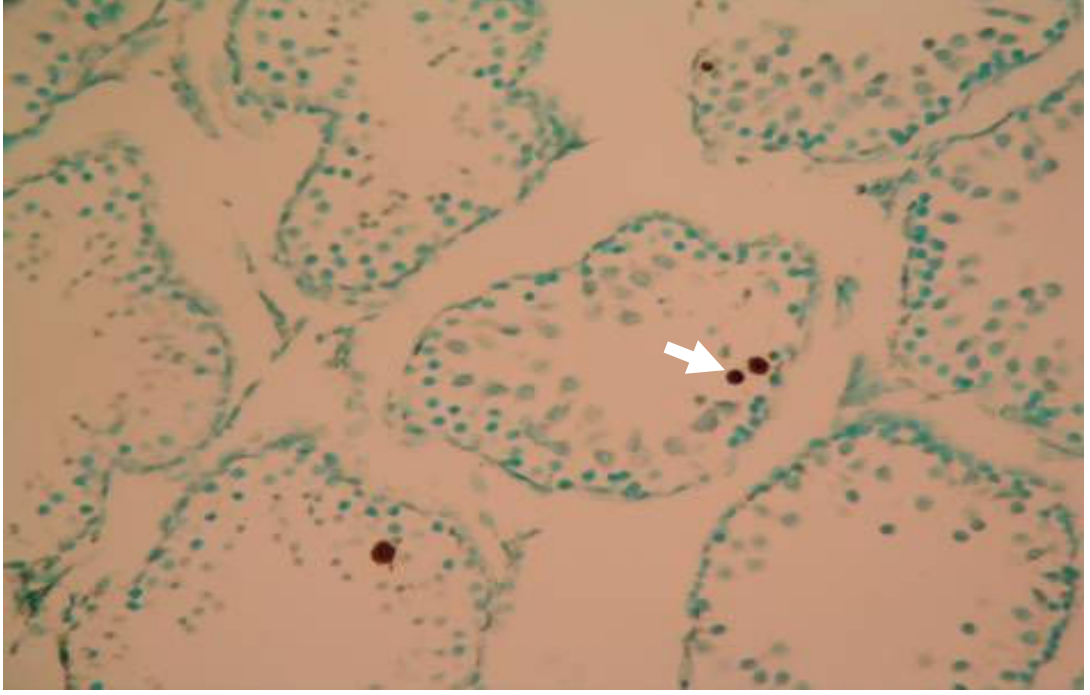
Şekil 3.8. Hor-G grubu (200X). Ok, apoptotik germ hücrecini göstermekte.



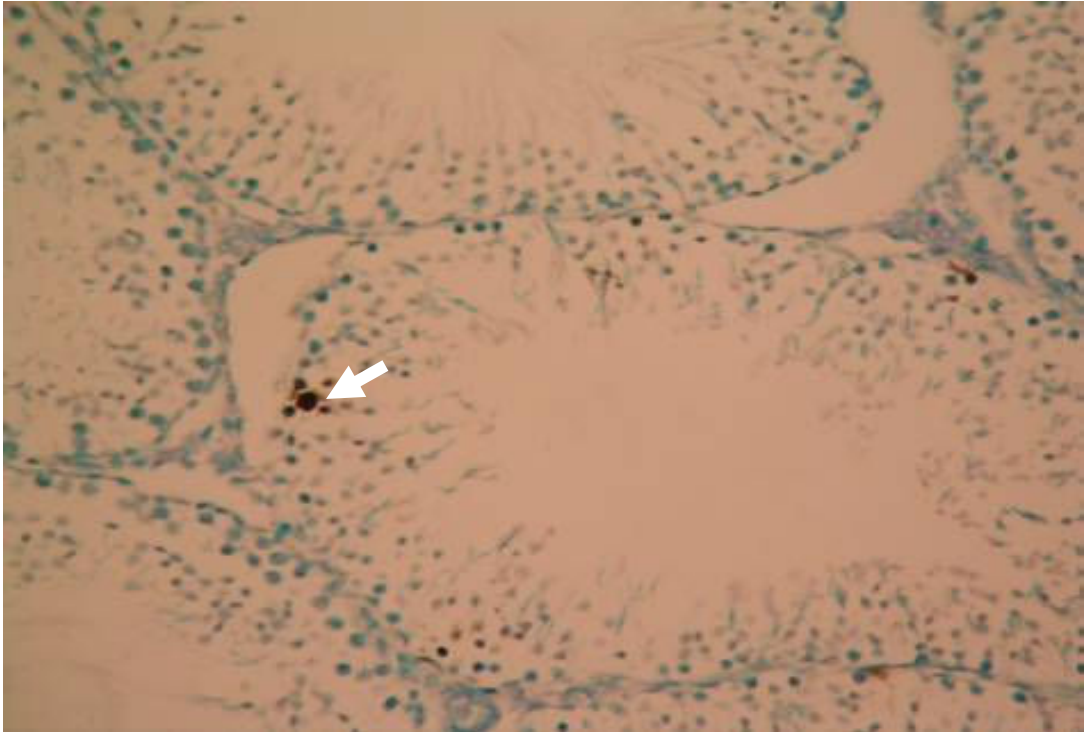
Şekil 3.9. Kript-E grubu (200X). Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermektedir.



Şekil 3.10. Kript-G grubu (200X). Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermektedir.



Şekil 3.11 Sham-E grubu (200X). Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermekte.



Şekil 3.12 Sham-G grubu (200X). Ok, apoptotik germ hücrelerini göstermekte.

BULGULAR

Toplam 6 gruptaki ratların orşiektomi sırasındaki testis ağırlıkları, fertilitite indeksleri ve apoptozis indeksleri istatistiksel olarak birbirleri ile kıyaslandı.

Sağlıklı kontrol grubunu temsil eden sham grubundaki testis ağırlığı olması gereken normal değerler olarak kabul edildi. Buna göre erken dönemde orşiektomi yapılan 30 günlük ratların ortalama testis ağırlıkları $0,28\pm0,08$ gram olarak bulundu. Ratlar 52 günlük olduklarında yani geç orşiektomi yapılan sham grubunda ortalama testis ağırlığı ise $1,27\pm 0,08$ gram bulundu. Elde edilen bu değerler diğer gruplardaki testis ağırlıkları ile kıyaslanmak için kullanıldı (Tablo 4.1).

Sham grubunun hesaplanan değerlerini normal değerler olarak kabul edersek ratlar 52 günlük olduklarında apoptozis indeksi ortalama $0,75\pm0,16$ bulundu. Bu değer ratın normal yerleşimli testisindeki fizyolojik apoptozis indeksi olarak kabul edildi. Ancak ratlar 30 günlük iken, yani sham operasyonundan sonraki 8. günde bu değer $1,25\pm0,27$ olarak saptanmıştı. Sham grubunda erken ve geç orşiektomi yapılanlar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4.2).

Sham grubundaki fertilitite indeksi tüm gruplardan yüksek bulundu ve zaman içinde fertilitite indeksi, beklendiği gibi istatistiksel olarak anlamlı biçimde artış gösterdi (Tablo 4.3).

Kriptorşidizmin testis üzerindeki etkilerini saptayabilmek için oluşturulan deneysel kriporşidizm grubunda testis ağırlığı, erken dönemde sham grubuna yakın olmakla birlikte geç dönemde sham grubundan anlamlı derecede düşük bulundu. Böylece deneysel kriporşidizmin testisin makroskopik gelişimini olumsuz etkilediği saptanmış oldu (Tablo 4.1).

Kriptorşidizm grubunda apoptozis indeksi diğer gruplara kıyasla en yüksek düzeyde idi. Sham grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Özellikle kriporşidizmin erken döneminde apoptozis indeksi, geç döneme kıyasla anlamlı derecede yüksekti. Böylece kriporşidizmin erken dönemde artırdığı apoptozisin geç dönemde gerilediği saptandı (Tablo 4.2).

Kriptorşidizm grubunda fertilite indeksi, geç dönemde sham grubundan anlamlı derecede düşük bulundu. Ancak bu fark erken orşiektomi yapılanlarda çok belirgin değildi. Yani kriptorşidizm yapılan testislerde başlangıçta kontrol grubu ile benzer fertilite indeksi ortalaması görülürken zaman ilerledikçe kontrol grubunun aksine bu grupta fertilite indeksinin azaldığı saptandı. Başka bir ifade ile fertilite indeksinin, kriptorşidizmin süresi ile orantılı şekilde azaldığı görüldü (Tablo 4.3).

Tedavide uygulanan β -hCG' nin kriptorşidik testise etkilerini göstermek için deneysel kriptorşidizm oluşturularak β -hCG verilen hormon grubunda testis ağırlığı, sham grubu ile karşılaştırıldığında geç dönemde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. Ancak kriptorşidizm grubundaki ile benzer olan bu sonuç, testisin makroskopik gelişimi üzerine hormonun, kriptorşidizme ek olumsuz bir etkisinin olmadığını gösterdi (Tablo 4.1).

Hormon grubunda apoptozis indeksi sham kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. Yine diğer gruplarda olduğu gibi erken dönemde daha yüksek olan apoptozis indeksi bu grupta da zaman ilerledikçe anlamlı biçimde azalmış bulundu. Kriptorşidizm grubuyla karşılaştığımızda apoptozis indeksini bu grupta biraz daha düşük bulduk. Özellikle geç dönemde bu fark istatistiksel olarak anlamlı hale geldi. Bu bulgu bize hormon tedavisinin kriptorşidizmde apoptozis önleyici bir etkisinin olabileceğini düşündürdü (Tablo 4.2).

Hormon tedavisi alan gruptaki fertilite indeksi değerlendirildiğinde sham grubuna göre düşük bulundu. Bu grupta fertilite indeksi zaman içinde sham grubunun aksine azaldı. Kriptorşidizm grubuyla karşılaştırıldığında hormon grubundaki fertilite indeksi hem erken hem geç dönemde daha düşük bulundu. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Özetle hormon tedavisinin, fertilite indeksi üzerindeki etkisinin, yalnızca kriptorşidizmin neden olduğu etkiden belirgin derecede farklı olmadığı sonucuna varıldı (Tablo 4.3).

Çalışmamızda fertilite indeksi ve apoptozis indeksinin kendi aralarındaki ilişkileri, Pearson Korelasyon katsayısı ile değerlendirildi (Tablo 4.4, 4.5).

Sham grubunda erken ve geç dönemde apoptozis indeksi ile fertilité indeksi arasında negatif korelasyon saptandı. Ancak bu korelasyonlar istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı.

Kriptorşidizm grubunda erken ve geç dönemde apoptozis indeksi ile fertilité indeksi arasında pozitif korelasyon saptandı bu korelasyonlardan hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Hormon grubunda erken dönemde apoptozis indeksi ile fertilité indeksi arasında, kriporşidizm grubunda olduğu gibi yine pozitif korelasyon, ancak geç dönemde negatif korelasyon saptandı. Erken dönemdeki pozitif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken geç dönemdeki negatif korelasyon anlamlı idi.

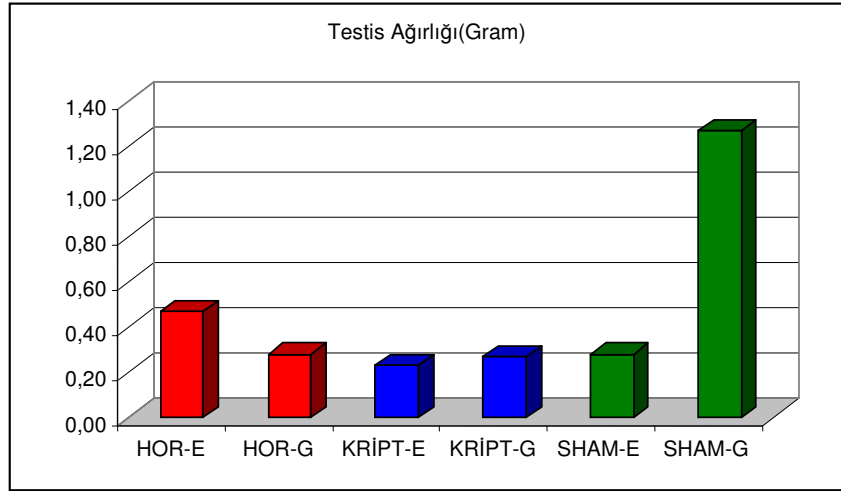
Tablo 4.1. Testis ağırlığının istatistiksel analizi.

Testis Ağırlığı(Gram)	Hor.	Krip.	Sham	Gruplararası Kıyaslama♥		
				Hor-Krip♥	Hor-Sham♥	Krip-Sham♥
Erken	0,47±0,07	0,23±0,05	0,28±0,08	0,0001*	0,0001*	0,3334
Geç	0,28±0,08	0,27±0,07	1,27±0,08	0,9567	0,0001*	0,0001*
Zamansal Karşılaştırma♦	0,0001*	0,28	0,0001*			

*: İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$)

♦: Eşleştirilmiş Gruplarda t Test

♥: ANOVA (Post Hoc Scheffe Testi)



Şekil 4.1 Testis ağırlıkları.

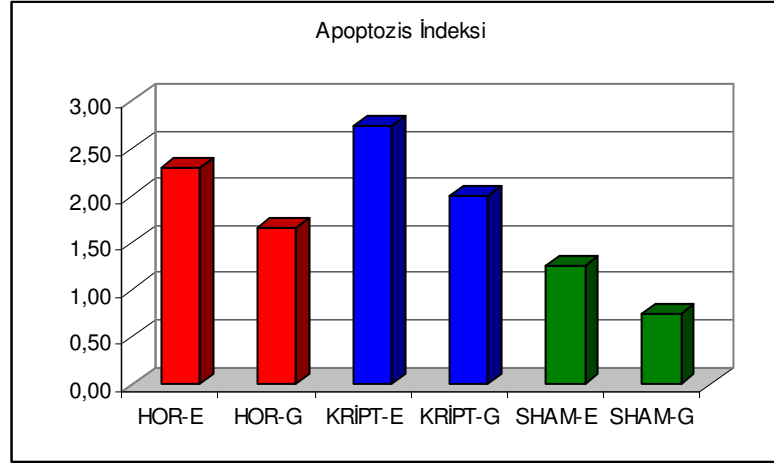
Tablo 4.2. Apoptozis indeksinin istatistiksel analizi.

Apoptozis İndeksi	Hor.	Krip.	Sham	Gruplararası Kıyaslama		
				Hor-Krip♥	Hor-Sham♥	Krip-Sham♥
Erken	2,29±0,66	2,75±0,31	1,25±0,27	0,1055	0,0001*	0,0001*
Geç	1,66±0,33	1,99±0,24	0,75±0,16	0,0362*	0,0001*	0,0001*
Zamansal Karşılaştırma♦	0,04*	0,0001*	0,0001*			

*: İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$)

♦: Eşleştirilmiş Gruplarda t Test

♥: ANOVA (Post Hoc Scheffe Testi)



Şekil 4.2. Apoptozis indeksleri.

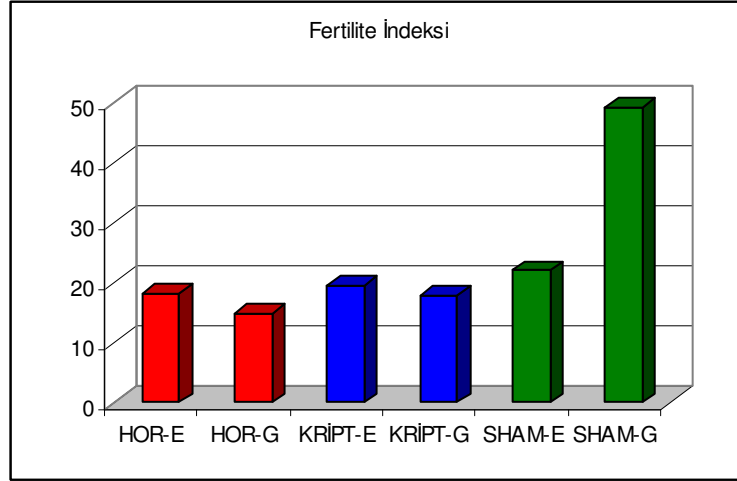
Tablo 4.3. Fertilite indeksinin istatistiksel analizi.

Fertilite İndeksi	Hor.	Krip.	Sham	Gruplararası Kıyaslama		
				Hor-Krip♥	Hor-Sham♥	Krip-Sham♥
Erken	18,16±3,7	19,61±1,91	22,03±1,14	0,4641	0,0075*	0,1313
Geç	14,78±3,22	17,74±2,93	49,25±1,35	0,0779	0,0001*	0,0001*
Zamansal Karşılaştırma♦	0,29	0,1	0,0001*			

*: İstatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$).

♦: Eşleştirilmiş Gruplarda t Test

♥: ANOVA (Post Hoc Scheffe Testi)



Şekil 4.3. Fertilite indeksleri.

Tablo 4.4. İrdelenen parametrelerin birbirleriyle ilişkisi (Erken dönem).

Hormon	Apoptozis İndeksi	Fertilite İndeksi ♦
Hormon	Apoptozis İndeksi	0,130
Kript.	Apoptozis İndeksi	0,118
Sham	Apoptozis İndeksi	-0,510

* Korelasyon Katsayısı istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$)

** Korelasyon Katsayısı istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ($p < 0,01$)

♦ : Pearson Korelasyon Katsayısı

Tablo 4.5. İrdelenen parametrelerin birbirleriyle ilişkisi (Geç dönem).

Hormon	Apoptozis İndeksi	Fertilite İndeksi ♦
Hormon	Apoptozis İndeksi	-0,842 (**)
Kript.	Apoptozis İndeksi	0,435
Sham	Apoptozis İndeksi	-0,410

* Korelasyon Katsayısı istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,05$)

** Korelasyon Katsayısı istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ($p < 0,01$)

♦ : Pearson Korelasyon Katsayısı

TARTIŞMA

Erken orşiektomi için deneysel kriptorşidizm oluşturulduktan sonra en fazla apoptozisin görüldüğü zaman olan 8. gün, geç orşiektomi için de apoptozisin tekrar normal düzeyine dönmesinin beklendiği 30. gün seçildi. (28, 83)

Çalışmamızda apoptozisi göstermek için, ratlarla yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi TUNEL boyama tekniği kullanıldı (98-101).

Zini ve ark.'nın (104) ratlarla yaptıkları deneysel kriptorşidizm çalışmasında, sham operasyonu yapılan grup ile hiçbir müdahale yapılmayan normal ratların testisleri karşılaştırıldığında, ortalama testis ağırlıkları ve histolojik bulguların benzer olduğunu saptamışlardır. Bu bilgidan yola çıkılarak çalışmamızda oluşturulan sham grubunun değerleri, diğer grupların karşılaştırıldığı normal değerler olarak kabul edildi.

Sham operasyonu yapılan ve normal değerler olarak alınan grupta testis ağırlığı, normal yaşam döngüsündeki bir ratın testis gelişimini temsil etmekte olup, çalışmaya dahil edilen ratlarda beklenildiği gibi erken orşiektomi ile geç orşiektomi arasındaki 30 günlük süre içinde devamlı bir artış göstermiştir. Bu bulgu diğer çalışmalardakilerle örtüşmektedir (83, 84)

Sham grubunda hayatlarının 30. gününde erken orşiektomi yapılan ratlarda apoptozis indeksi, geç dönemde orşiektomi yapılan, yani 52 günlük ratlardan anlamlı olarak yüksek bulundu. Sham grubunda operasyon sonrası 8. günde apoptozis indeksinin geç dönemden daha yüksek bulunması anestezi ve cerrahi etkisiyle açıklanabilir. Başka bir neden de, rat testislerinde hayatın erken dönemlerinde fizyolojik olarak artmış bir apoptozisin bulunması olabilir.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki: Normal spermatogenez sırasında germ hücrelerinin bazıları apoptozis yolu ile kendiliğinden ölmektedir ve bu olay sperm sayısını etkilemektedir (98). Normal gelişim gösteren bir rat testisinde fizyolojik apoptozis yaşa bağlıdır ve hayatın 28. gününde en yüksek düzeye ulaşmakta yetişkin dönemde ise azalmaktadır. Yaşla birlikte

apoptoziste meydana gelen bu azalma, gelişim süresince spermatogenezin de artması ile uyumludur (83).

Sham grubunda fertilité indeksi değerlendirildiğinde erken dönem orşiektomi yapılan ratlarda geç dönem orşiektomi yapılanlara göre anlamlı derecede düşük fertilité indeksi saptandı. Zaman içerisindeki bu artış apoptozis indeksindeki azalma ile uyumlu görünmektedir. Bu artışın testis ağırlığı ile de paralel olduğu düşünülürse alınan bu sonuçlar rat testisinin normal gelişim sürecini yansıtıyor görünmektedir.

Deneyssel sol kriptorşidizm uygulanan ratlarda testis ağırlığı, testisin karın içine alındığı ilk operasyondan sonraki 8. günde orşiektomi yapılarak ölçüldüğünde kontrol grubunun ortalamasından düşük olmakla birlikte aralarındaki farkın anlamlı olmaması erken dönemde testis gelişimine olumsuz etkisinin belirgin olmadığını göstermektedir. Bu bulgu, Watts ve ark.'nın (84) yaptıkları çalışmada ortaya çıkan deneyssel kriptorşidizmin testis ağırlığına etkisinin 4 haftadan önce belirgin olmadığı sonucunu destekler niteliktedir. Shikone ve ark.'nın (28) kriptorşidizm oluşturulduktan sonraki 7. günde yaptıkları ölçümde testis ağırlığındaki artışın kontrol grubuna göre %24 azaldığını ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da testis ağırlığı kriptorşidizm yapılan ratlarda sham grubundan daha düşük saptandı; ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ve sonuç olarak erken dönemde kontrol grubu ile benzer olarak değerlendirildi. Geç dönemde ise kriptorşidizm grubunun testis ağırlığı sham grubunun ortalamasından yaklaşık olarak 4.5 kat daha düşük bulundu. Bu bulgu testisin, skrotuma göre daha yüksek ısıya maruz kaldığı karın içinde bulunduğu süre uzadıkça, gelişimi üzerindeki olumsuz etkilerin belirginleştiğini göstermektedir. Kanlanmasında herhangi bir sorun olmayan testisin karın içindeki bu gelişim duraklaması, ısının veya bilinmeyen başka değişkenlerin yol açtığı artmış apoptozise ya da henüz bilinmeyen başka faktörlere bağlı olabilir.

Deneyssel kriptorşidizm oluşturulan grubun apoptozis indeksi diğer tüm gruplardan hem erken hem geç dönemde anlamlı derecede yüksek bulundu. Bu bulgu, literatürdeki diğer çalışmalara benzerdir (28, 84). Karın içindeki ısının skrotal ısıdan fazla olmasının testis üzerinde oluşturduğu stresin

apoptozisi artırdığı (105) bilgisinden yola çıkılarak, bu yüksek ısıya daha uzun süre maruz kalan testislerde daha fazla apoptozis görüleceği düşünülebilir. Ancak bizim çalışmamızda, geç dönem orşiektomi yapılanlarda testis daha fazla karın içinde kalarak daha uzun süreli ısı artışına maruz kalmasına rağmen apoptozis indeksi erken dönemden anlamlı derecede daha az saptandı. Çelişkili gibi görünen bu durum kriptorşidizm oluşturulduğunda erken dönemde etkilenme potansiyeli olan tüm germ hücrelerinin apoptozis yolağına girmeleri ve bu toplu ölümden sonra kalan hücrelerin fizyolojik boyuttaki apoptozis sürecine devam etmeleriyle açıklanabilir. Bununla birlikte erken orşiektomi yapılanlarda, ilk operasyondaki anestezi ve cerrahi stresin devam eden etkisi nedeniyle de apoptozis indeksleri yüksek saptanmış olabilir. Buna ek olarak, sham grubunda apoptozis indeksinin erken dönemde yüksek saptanması ve zaman içinde anlamlı olarak azalması, hayatın erken dönemlerinde apoptozis yolağının fizyolojik olarak daha aktif olabileceğini de düşündürmektedir. Dunkel ve ark.'nın (62) çalışmalarında belirtildiği gibi insan kriptorşidik testisinde hayatın ilk yılı içinde germ hücre sayısı normal sınırlarda olup 2 yaş civarında en düşük düzeyine ulaşmaktadır. Ancak insanda apoptozisin zamana bağlı değişiminin ve bu değişimin germ hücre sayısı ile ilişkisinin gösterildiği bir çalışma yoktur. Öte yandan, ratlarda yapılan deneysel çalışmalarda, apoptoziste zaman içinde meydana gelen azalmanın, spermatogenez etkinliğinde artış ile ilişkili olduğu bulunmuştur (104). Sonuç olarak, kriptorşidizmde meydana gelen apoptozis artışı germ hücre havuzunu olumsuz etkileyerek yetişkin dönemdeki infertiliteye zemin hazırlıyor olabilir.

Çalışmamızda, kriptorşidizm grubunda fertilité indeksi erken dönemde kontrol grubundan düşük olmakla birlikte fark istatistiksel anlamlılığa ulaşmamış, ancak geç dönemde anlamlı hale gelmiştir. Fertilité indeksinin, zaman içinde olması gereken değerin çok altında kalması, germ hücre sayısının kriptorşidizm süresiyle orantılı şekilde azaldığını gösteren Dunkel ve ark.'nın (62) çalışmalarıyla paralellik göstermektedir. Bu bulgu, kriptorşidizmde görülen infertilite ile uyumludur.

Kriptorşidizm oluşturularak β -hCG uygulanan hormon grubundaki ratların testis ağırlığı erken dönemde kriptorşidizm ve sham grubundan yüksek bulundu. Bunun muhtemel nedeni β -hCG' nin testiste oluşturduğu kanlanma artışı ve inflamasyon benzeri durum olabilir (96). Başka bir nedenle, başlangıçta ratların farklı sayıda yavruyu emziren annelerden elde edilmesi nedeniyle, bu gruptaki ratların vücut ağırlıkları, dolayısı ile testis ağırlıkları diğer gruplardan farklı olmuş olabilir. Bununla birlikte geç dönemde, hormon verilen grup ile yalnızca kriptorşidizm oluşturulan grubun testis ağırlığı benzer bulundu. Bu durumda her iki grupta da testis gelişimini engelleyen ortak neden kriptorşidizmin kendisi gibi durmaktadır. Verilen hormon tedavisinin testisin makroskopik gelişiminde ek bir olumsuz etkisinin bulunmadığını saptadık.

Hormon grubunda apoptozis indeksi, erken dönemde sham grubundan anlamlı derecede yüksek, kriptorşidizm grubundan ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde düşük saptandı. Ancak geç dönemde bu fark anlamlı hale geldi. Bu bulgu hormon tedavisinin apoptozisi önleyici bir etkisinin bulunabileceğini, en azından yalnızca kriptorşidizmin yol açacağı apoptozisten daha fazlasına neden olmayacağını düşündürmektedir. Hormon tedavisinin, germ hücre apoptozisini artırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (95, 62). Heiskanen ve ark' nın (95) çalışması kurgusu bakımından güçlü, sonuçları yönünden de ilginçtir. Araştırmacılar, hormon tedavisi almış ve almamış olgularda, orşiopeksi sırasında iki taraflı testis biyopsisi yapmışlar ve olguları hormon tedavisiyle biyopsi arasında geçen zamana göre gruplandırmışlardır. Sonuçta, hormon tedavisinden sonraki erken dönemde spermatogonial apoptoziste artış olduğunu, ancak daha sonra bunun bazal seviyelere döndüğünü göstermişlerdir. İlginç olarak skrotal karşı testiste, inguinal testisten daha fazla apoptozis saptanmıştır. Hayvanlarda deneysel kriptorşidizm oluşturularak yapılan çalışmalardan farklı olan bu sonuç, deneysel çalışmalarda akut bir olayın, gerçekte ise kronik bir sürecin araştırılıyor olmasıyla açıklanabilir. Hormon tedavisinin testis üzerindeki etkilerinin histolojik olarak araştırıldığı başka deneysel çalışmalar da mevcuttur. β -hCG' nin testiste akut inflamasyon benzeri etkiler

oluşturduğu ve bu durumun yetişkin dönemdeki testis işlevlerini etkileyebileceği öne sürülmüştür (96). Karaman ve ark. (97) ise uygulanan hormon tedavisinin skrotal testislerde erken dönemde seminifer tübül histolojisini bozduğunu, ancak bu etkinin geri dönüşümlü olduğunu bulmuşlardır.

Hormon grubunda fertilité indeksi değerlendirildiğinde, fertilité indeksi hem erken hem de geç dönemde sham grubundan anlamlı derecede düşük saptandı. Yalnızca kriptorşidizm yapılan grupla karşılaştırıldığında ise aralarındaki fark, hormon grubunun aleyhine olmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yine zaman içinde bu grupta fertilité indeksi azalma eğilimi göstermesine rağmen bu azalma, istatistiksel anlamlılığa ulaşamadı.

Çalışmamızda fertilité indeksi ile apoptozis indeksi arasında bir ilişki olup olmadığı da araştırıldı. Bulgularımızı analiz etmeden önce ulaşmayı beklediğimiz sonuç, tüm gruplarda apoptozis indeksi ile fertilité indeksi arasında negatif bir korelasyon saptanmasıydı. Yani apoptozis indeksi arttıkça fertilité indeksinin düşmesini bekledik. Nitekim sağlıklı kontrol olarak düşünülebilecek sham grubunda hem erken hem de geç dönemde apoptozis indeksi ile fertilité indeksi arasında negatif korelasyon saptandı. Bununla birlikte bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Öte yandan, hem erken hem de geç dönem kriptorşidizm grubunda apoptozis indeksi ile fertilité indeksi arasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, pozitif korelasyon saptandı. Hormon tedavisi grubunda ise apoptozis indeksi ile fertilité indeksi arasında erken dönemde pozitif, geç dönemde negatif korelasyon saptandı. Bu korelasyonlardan erken dönemdeki istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, geç dönemdeki anlamlı bulundu. Dolayısıyla apoptozis indeksi ile fertilité indeksi arasında tutarlı bir ilişki gösterilemedi. Örneğin, geç dönemdeki fertilité indeksi ve apoptozis indeksi verileri incelendiğinde, fertilité indeksinin hormon tedavisi grubunda kriptorşidizm grubuna göre sayısal olarak düşük saptanmasına rağmen, apoptozis indeksi hem erken hem geç dönemde hormon tedavisi grubunda daha düşük saptandı. Bu nedenle, herhangi bir andaki kesitsel apoptozis indeksi

verilerinin, o bireyin fertilité indeksinin güvenilir bir göstergesi olamayacağını düşünmekteyiz. Denek sayımızın azlığı var olan bir korelasyonu ortaya koymamızı önlemiş olabilir. Ancak apoptosis fizyolojik bir süreçtir ve pek çok değişkenden etkilenebilir. Hatta çok kısa zaman dilimlerinde bile farklı değerlerde saptanabilecek kadar dinamik bir süreç olabileceği ihtimali üzerinde durmaktayız. Bunu doğrulamak için ise başka çalışmalara ihtiyaç vardır.

Yine hem erken hem de geç dönemde hormon tedavisi alanlarda fertilité indeksi sayısal olarak düşük görünmekle birlikte, kriptorşidizm yapılanlarla aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu da, hormon tedavisinin fertilité üzerinde, yalnızca kriptorşidizme göre daha fazla bir olumsuz etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Hadziselimovic (59), çocukluklarında orşiopeksi ve eşzamanlı testis biyopsisi yapılmış bir grup yetişkinin semen analizlerini incelemiş ve cerrahi sonrası hormon tedavisi de almış olanların sperm parametrelerinin (spermatozoa sayısı, motilite ve normal morfolojideki sperm sayısı) sadece cerrahi yapılanlara göre daha iyi olduğunu göstermiştir. Bu çalışma tasarımı açısından güçlü olmakla birlikte, hasta sayısının az olması zayıf yönüdür ve henüz aynı kurguda başka çalışmalarla desteklenmemiştir. Daha güncel başka bir çalışmada neoadjuvan GnRH tedavisi verilen çocukların orşiopeksi sırasında alınan biyopsiyle saptanan fertilité indekslerinin, sadece cerrahi yapılanlara göre anlamlı oranda yüksek olduğu ve bu etkinin en yüksek seviyesine, gonadotropin tedavisi erken yaşta uygulandığında ulaştığı gösterilmiştir (94). Bizim çalışmamızda ise hormon tedavisinin kriptorşidizm grubundaki fertilité indeksine anlamlı bir katkısı gösterilemedi. Gerçek řu ki, bizim çalışmamız bir deneysel inmemiş testis modeline dayanmaktadır ve konjenital inmemiş testis fizyopatolojisinde rol oynayan süreçler bizim modelimizde yer almamıştır. Hormon tedavisinin amacı, inmemiş testisli olguların en azından bir kısmında eksik olduğu düşünölen ve gonosit - Ad spermatogonium dönüşümünde önemli rol oynayan gonadotropinin eksikliğinin yerine konması ve böylece adult spermatogonium havuzundaki hücre sayısının artırılarak fertilité potansiyelinin de artırılmaya çalışılmasıdır

(59). Bizim çalışmamız ise, hormon tedavisine muhtemel yan etkileri nedeniyle yapılan itirazların araştırılması için tasarlanmış, apoptozis indeksi ve fertilité indeksi değişikliklerini normal şekilde indikten sonra karın içine yerleştirilmiş bir testis üzerindeki ilaç yan etkilerinin ölçütleri olarak kullanan, Apoptozis indeksinin fertilitéyi öngörmeye anlamlı olup olmadığını sorgulayan bir çalışmadır.

Aslında tüm bu çalışmaların temel hedefi, paterniteyi geliştirmektir. Tek taraflı inmemiş testis paternite ilişkisini araştıran en geniş çalışma Peter Lee'ye aittir (47). Bu çalışmada, 1955-1974 yılları arasında orşiopeksi yapılmış olan, 349' u tek taraflı inmemiş testisli 584 hasta ile telefon bağlantısı kurulup, fertilité ile ilgili sorular sorulmuş ve baba olma / baba olmayı deneme oranı; tek taraflı inmemiş testisli olgularda % 89.7, kontrollerde % 93.2 bulunmuş, iki oran arasında istatistiksel fark saptanmamıştır. Aynı çalışmada, tek taraflı inmemiş testisi olan belirgin sayıdaki hastada, semen analizinde kötü spermatogenez saptanmasına rağmen bu olguların baba olmayı başardıkları bildirilmiştir (47). Görüldüğü gibi baba olma (paternite) ile baba olma potansiyeli ayrı konulardır ve çalışmaların sonuçları değerlendirilirken, hangi parametrelerin irdelendiği göz önünde bulundurulmalı, sperm parametrelerinin kötü olduğu her bireyin infertil olmayabileceği ihtimali de akılda tutulmalıdır.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, deneysel kriptorşidizm modelinde gerçekleşmesi beklenen olumsuz etkiler makroskopik ve histopatolojik olarak gözlemlendi. Uygulanan hormon tedavisinin, sadece kriptorşidizme göre artmış bir olumsuz etkisi gösterilemedi.

Öte yandan çalışmamızda apoptozis indeksinin, fertilitiyi öngörmede kullanılabilir bir belirteç olmadığı sonucuna varıldı.

Kriptorşidizmde hormon tedavisinin yarar ve zararları yanında, net etkinin hangi yönde olduğu yanıt bekleyen bir sorudur. Yapılacak geniş klinik çalışmaların sonuçları alınıncaya kadar, kriptorşidizmde hormon tedavisinin uygulanması hekimin kişisel tercihine kalacak gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Wyllie, G.G., The retractile testis, *Med. J. Aust.*, 140: 403-405, 1984.
2. Huhtaniemi, I., Fetal testis: a very special endocrine organ, *Eur. J. Endocrinol.*, 130: 25-31, 1994.
3. Lee, M. M., Donahue, P.K., Müllerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions, *Endocr. Rev.*, 14: 152-164, 1993.
4. Clarnette, T. D., Hutson, J.M., Beasley, S.W., Factors affecting the development of the processus vaginalis in the rat, *J. Urol.*, 156: 1463-1466, 1996.
5. Heyns, C. F., Human, H. J., Werely, C. J., De Klerk, D. P., The glycosaminoglycans of the gubernaculum during testicular descent in the fetus, *J. Urol.*, 143: 612-617, 1990.
6. Backhouse, K. M., The gubernaculum testis Hunteri: testicular descent and maldescent, *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*, 35: 15-33, 1964.
7. Backhouse, K. M., Embryology of testicular descent and maldescent, *Urol. Clin. North. Am.*, 9: 315-325, 1982.
8. Sampaio, F. J., Favorito, L. A., Analysis of testicular migration during the fetal period in humans, *J. Urol.*, 159: 540-542, 1998.
9. Heyns, C. F., The gubernaculum during testicular descent in the human fetus, *J. Anat.* 153: 93-112, 1987.
10. Hutson, J. M., Hasthorpe, S., Heyns, C. F., Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism, *Endocr. Rev.*, 18, 259-280, 1997.
11. Kubota, Y., Temelcos, C., Bathgate, R. A., Smith, K. J., Scott, D., Zhao, C. Hutson, J. M., The role of insulin 3, testosterone, Mullerian inhibiting substance and relaxin in rat gubernacular growth, *Mol. Hum. Reprod.*, 8, 900-905, 2002.

12. Anafarta, K., Bedük, Y., Arıkan, N.: Spermatogenez, Temel Üroloji, Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, III. Baskı. Sayfa: 967-971, 2007.
13. Touchette, N., Fogle, S., Apoptosis: it chimes with mitosis, JNH. Res. 3:75, 1991.
14. Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R., Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics, Br. J. Cancer, 26: 239-245, 1972.
15. Bellamy, C. O, Malcomson, R. D., Harrison, D. J., Wyllie, A. H., Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis, Cancer Biology 6: 3-16, 1995.
16. Majno, G., Torisl, A., Apoptosis oncosis and necrosis, Am. J. Pathol., 146: 3-15, 1995.
17. Schwartzman, R. A., Cidloski, J. A., Apoptosis, the biochemistry and molecular biology of programmed cell death, Endocrine Reviews, 14: 133-144, 1993.
18. Raff, M., Cell suicide for beginners, Nature, 396: 119-122, 1998.
19. Kaufmann, S. H., Hengartner, M. O., Programmed cell death: alive and well in the new millennium, Trends Cell Biol. 11: 526-534, 2001.
20. Cohen, J. J., Apoptosis, Immunol. Today, 14: 126-130, 1993.
21. Nagata, S., Apoptotic DNA fragmentation, Exp. Cell. Res., 256: 12-18, 2000.
22. Lu, J., Ashwell, K., Ken, W. S., Waite, P., Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. Spine, 25: 1859-1866, 2000.
23. Ellis, R. E., Yuan, J., Horvitz, H. R., Mechanisms and functions of cell death, Annu. Rev. Cell Biol., 7, 663-698, 1991.

24. Braun, R. E., Every sperm is sacred-or is it?, *Nat. Genet.*, 18, 202-204, 1998.
25. Shinha, H., Swerdloff, R. S., Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis, *Rev. Reprod.*, 4, 38-47, 1999.
26. Allan, D. J., Harmon, B. V., Roberts, S. A., Spermatogonial apoptosis has there morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat, *Cell Prolif.*, 25, 241-250, 1992.
27. Kerr, J. B., Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle, *J. Reprod. Fertil.*, 95, 825-830, 1992.
28. Shikone, T., Billig, H., Hsueh, A. J. W., Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis, *Biol. Reprod.*, 51, 865-872, 1994.
29. Brinkworth, M. H., Weinbauer, G. F., Schlatt, S., Neischlag, E., J., Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats, *Reprod.Fertil.*, 105, 25-33, 1995.
30. Callard, G. V., Jorgensen, J. C., Redding, J. M., Biochemical analysis of programmed cell death during premeiotic stages of spermatogenesis in vivo and in vitro, *Dev. Genet.*, 16, 140-147, 1995.
31. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R., Cell death: the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.*, 68, 251-306, 1980.
32. Ren, Y., Savill, J., Apoptosis: the importance of being eaten, *Cell Death Differ.*, 5, 563-568, 1998.
33. Savill, J., Fadok, V., Corpse clearance defines the meaning of cell death, *Nature*, 407, 784-788, 2000.

34. Nakanishi, Y., Shiratsuchi, Phagocytic Removal of Apoptotic Spermatogenic Cells by Sertoli Cells: Mechanisms and Consequences, A., *Biol. Pharm. Bull.*, 27(1), 13-16, 2004.
35. Print, C. G., Loveland, K. L., Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis, *Bioessays*, 22: 423-430, 2000.
36. Rooij, D. G., Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells, *Reproduction*, 121: 347-354, 2001.
37. Sutton, K. A., Molecular mechanisms involved in the differentiation of spermatogenic stem cells, *Rev. Reprod.*, 5: 93-98, 2000.
38. Dunkel, L., Hirvonen, V., Erkkilä, K., Clinical aspects of male germ cell apoptosis during testis development and spermatogenesis, *Cell Death Differ.*, 4: 171-179, 1997.
39. Thonneau, P. F., Gandia, P., Mieusset, R., Cryptorchidism: incidence, risk factors, and potential role of environment; an update, *Journal of Andrology*, 24, 155–162, 2003.
40. Swerdlow, A. J., Wood, K. H., Smith, P. G., A case-control study of the aetiology of cryptorchidism, *J. Epidemiol Community Health*, 37:238–244, 1983.
41. Hjertkvist, M., Damber, J. E., Bergh, A., Cryptorchidism: a registry based study in Sweden on some factors of possible aetiological importance, *J. Epidemiol. Community Health*, 43:324-329, 1989.
42. Berkowitz, G. S., Lapinski, R. H., Godbold, J. H., Dolgin, S. E., Holzman, I. R., Maternal and neonatal risk factors for cryptorchidism, *Epidemiology*, 6: 127-131, 1995.
43. Virtanen, H. E., Tapainen, A. E., Kaleva, M. M., Suomi, A. M., Main, K. M., Skakkebaek, N. E., Toppari, J. L., Mild gestational diabetes as a risk factor for congenital cryptorchidism, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91: 4862-5, 2006.

44. Cortes, D., Thorup, J. M., Beck, B. L., Visfeldt, J. Cryptorchidism as a caudal developmental field defect. A new description of cryptorchidism associated with malformations and dysplasias of the kidneys, the ureters and the spine from T10 to S5, *APMIS*, 106: 953–958, 1998.
45. Martinez-Frias, M. L., Bermejo, E., Rodriguez-Pinilla, E., Anal atresia, vertebral, genital, and urinary tract anomalies: a primary polytopic developmental field defect identified through an epidemiological analysis of associations, *Am. J. Med. Genet.*, 95: 169-73, 2000.
46. Lee, P. A., Coughlin, M. T., Fertility after bilateral cryptorchidism. Evaluation by paternity, hormone, and semen data, *Horm. Res.*, 55: 28-32, 2001.
47. Lee, P. A., Coughlin, M. T., The single testis: paternity after presentation as unilateral cryptorchidism, *J. Urol.*, 168: 1680-2, 2002.
48. Miller, K. D., Coughlin, M.T., Lee, P. A., Fertility after unilateral cryptorchidism. Paternity, time to conception, pretreatment testicular location and size, hormone and sperm parameters. *Horm. Res.*, 55: 249-53, 2001.
49. Thorup, J., Haugen, S., Kolin, C., Lindahl, S. L., Nordenskjold, A., Taskinen, S., Surgical treatment of undescended testes, *Acta Paediatrica*, 96: 631-7, 2007.
50. Hack, W. W., Meijer, R. W., Bos, S. D., Haasnoot, K., A new clinical classification for undescended testis, *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 37: 43-7, 2003.
51. Virtanen, H. E., Bjerknes, R., Cortes, D., Jørgensen, N., Rajpert-De Meyts, E., Thorsson, A. V., Thorup, J., Main, K. M., Cryptorchidism: classification, prevalence and long-term consequences, *Acta Paediatrica*, 96 (5), 611-616, 2007.

52. Dieckmann, K. P., Pichlmeier, U., Clinical epidemiology of testicular germ cell tumors. *World J. Urol.*, 22: 2-14, 2004.
53. Skakkebaek, N. E., Raipert-de Meyts, E., Main, K. M., Testicular Dysgenesis Syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects, *Hum. Reprod.*, 16: 972-8, 2001.
54. Weir, H. K., Marrett, L. D., Kreiger, N., Darlington, G. A., Sugar, L., Pre-natal and peri-natal exposures and risk of testicular germ-cell tumour, *Int. J. Cancer*, 87: 438-43, 2000.
55. Rørth, M., Rajpert-De Meyts, E., Andersson, L., Dieckmann, K. P., Fossa, S.D., Grigor, K. M., Carcinoma in situ in the testis, *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 34 (Suppl 205): 166-86, 2000.
56. Giwercman, A., Grindsted, J., Hansen, B., Jensen, O. M., Skakkebaek, N. E., Testicular cancer risk in boys with maldescended testis, A cohort study, *J. Urol.*, 138:1214-6, 1987.
57. Carmignani, L., Morabito, A., Gadda, F., Bozzini, G., Rocco, F., Colpi, G. M., Prognostic parameters in adult impalpable ultrasonographic lesions of the testicle, *J. Urol.*, 174:1035-8, 2005.
58. Ong, C., Hasthorpe, S., Hutson, J. M., Germ cell development in the descended and cryptorchid testis and the effects of hormonal manipulation, *Pediatric Surg. Int.*, 21: 240-54, 2005.
59. Hadziselimovic, F., Herzog, B., Treatment with a luteinizing hormone-releasing hormone analogue after successful orchiopexy markedly improves the chance of fertility later in life, *J. Urol.*, 158: 1193-5, 1997.
60. Huff, D. S., Snyder, H. M., Rusnack, S. L., Zderic, S. A., Carr, M. C., Canning, D.A., Hormonal therapy for the subfertility of cryptorchidism, *Horm. Res.*, 55: 38-40, 2001.

61. Hjertkvist, M., Lackgren, G., Ploen. L., Bergh, A., Does HCG treatment induce inflammation-like changes in undescended testes in boys?, *J. Pediatr. Surg.*, 28: 254–8, 1993.
62. Dunkel, L., Taskinen, S., Hovatta, O., Tilly, J. L., Wikstrom, S., Germ cell apoptosis after treatment of cryptorchidism with human chorionic gonadotropin is associated with impaired reproductive function in the adult, *J. Clin. Invest.*, 100: 2341–6, 1997.
63. Cortes, D., Thorup, J., Visfeldt, J., Hormonal treatment may harm the germ cells in 1 to 3-year-old boys with cryptorchidism, *J. Urol.*, 163: 1290-2, 2000.
64. Taran, I., Elder, J. S., Results of orchiopexy for the undescended testis, *World J. Urol.*, 24: 231–9, 2006.
65. Lee, P. A., Coughlin, M. T., Leydig cell function after cryptorchidism: evidence of the beneficial result of early surgery, *J. Urol.*, 167: 1824–7, 2002.
66. Andersson, A. M., Jørgensen, N., Frydelund-Larsen, L., Rajpert-De Meyts, E., Skakkebaek, N. E., Impaired Leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89: 3161-7, 2004.
67. Gill, B., Kogan, S., Cryptorchidism. Current concepts, *Pediatr. Clin. North. Am.* 44: 1211-27, 1997.
68. Brush, M. D., Recourse to death. A bevy of new products harnesses the power of flow cytometry for detecting apoptosis, *The Scientist*, 14, 25–29, 2000.
69. Vermes, I., Hanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of fosfatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled AnnexinV., *J. Immunol. Meth.*, 184, 39–51, 1995.

70. Urase, K., Momoi, T., Fujita, E., Isahara, K., Uchiyama, Y., Tokunaga, A., Nakayama, K., Motoyama, N., Bcl-xL is a negative regulator of caspase-3 activation in immature neurons during development, *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 116, 69–78, 1999.
71. Frankfurt, O. S., Robb, J. A., Sugarbaker, E. V., Villa, L., Monoclonal antibody to single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis, *Exp. Cell Res.*, 226, 387–397, 1996.
72. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A., Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119, 493–501, 1992.
73. McCarthy, N. J., Evan, G. I., Methods for detecting and quantifying apoptosis, *Curr. Top. Dev. Biol.*, 36, 259–278, 1998.
74. Saikumar, P., Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J. M., Vetachalam, M. A., Apoptosis: definition, mechanisms and relevance to disease, *Am. J. Med.*, 107, 489–506, 1999.
75. Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., Yuan, J., Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β , *Nature*, 403, 98–103, 2000.
76. Takahashi, A., Alnemri, E. S., Lazebnik, Y. A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Litwack, R. D., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufman, S.H., Earnshaw, W. C., Cleavage of lamin A by Mch2a but not CPP32: multiple interleukin 1 β -converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 93, 8395–8400, 1996.
77. Enari, M., Hug, H., Nagata, S., Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis, *Nature*, 375, 78–81, 1995.
78. Saunders, P. A., Cooper, J. A., Roodell, M. M., Schroeder, D. A., Borchert, C. J., Isaacson, A. L., Schendel, M. J., Godfry, K. G., Cahil, D. R.,

- Waltz, A. M., Loegering, R. T., Gaylord, H., Woyno, I. J., Kaluyzhny, A. E., Krzyzek, R. A., Mortari, F., Tsang, M., Roff, C. F., Quantification of active caspase 3 in apoptotic cells, *Anal. Biochem.* 284, 114-124, 2000.
79. Gracia, J., Gonzales, N., Gomez, M. E., Plaza, L., Sanchez, J., Alba, J., Clinical and anatomopathological study of 2000 cryptorchid testes, *Br. J. Urol.*, 75: 697-701, 1995.
80. Nistal, M., Riestra, M. L., Paniagua, R., Correlation between testicular biopsies (prepubertal and postpubertal) and spermiogram in cryptorchid men, *Hum. Pathol.*, 31: 1022-30, 2000.
81. Yavetz, H., Harash, B., Paz, G., Yogev, A., Jaffa, A. J., Lessing, J. B., Homonnai, Z. T., Cryptorchidism: incidence and sperm quality in infertile men, *Andrologia*, 24: 293-297, 1992.
82. Ofordeme, K. G., Aslan, A. R., Nazir, T. M., Hayner-Buchan A., Kogan, B. A., Apoptosis and proliferation in human undescended testes. *BJU. Int.*, 96: 634-638, 2005.
83. Wang, Z. Q., Todani, T., Watanabe, Y., Toki, A., Ogura, K., Germ-cell degeneration in experimental unilateral cryptorchidism: role of apoptosis, *Pediatr. Surg. Int.*, 14: 9-13, 1998.
84. Watts, L. M., Hasthorpe, S., Farmer, P. J., Hutson, J. M., Apoptotic cell death and fertility in three unilateral cryptorchid rat models, *Urol. Res.*, 28: 332-337, 2000.
85. Yizhong, Y., Stahl, B. C., Dewolf, W. C., Morgentaler, A., P53 and Fas are sequential mechanisms of testicular germ cell apoptosis, *Journal of Andrology*, 23: 64-70, 2002.
86. Kim, E. D., Barqawi, A. Z., Seo, J. T., Meacham, R. B., Apoptosis: its importance in spermatogenetic dysfunction, *Urol. Clin. North Am.*, 29: 755-765, 2002.

87. Walsh, P. C., Retik, A. B., Vaughan, E. D., Wein, A. J., Campbell's Urology, Philadelphia, Saunders, Eighth Edition, 2356-2376, 2002.
88. Woong, K. H., Jang, H. K., Chang, H. H., Sang, W. H., Structural evidence against hormonal therapy for cryptorchid testis: abnormal gubernacular attachment, *J. Urol.*, 171: 2427–2429, 2004.
89. Wilkerson, M. N., Bartone, F. F., Fox, L., Hadziselimovic, F., Fertility potential: A comparison of intra-abdominal and intracanalicular testes by age groups in children, *Hormone Research*, 55: 18-20, 2001.
90. Ritzen, E., M., Bergh, A., Bjercknes, R., Christiansen, P., Cortes, D., Haugen, S. E., Jorgensen, N. Kolin, C., Lindahl, S., Lackgren, G., Main, K. M., Nordenskjold, A., Nordic consensus on treatment of undescended testes, *Acta Pædiatrica*, 96, 638-643, 2007.
91. Kaya, C. Karaman, İ. M. Pirinçci, N. Öztürk, M. Gümrükçü, Y. G. Human Chorionic Gonadotropin Deteriorates the Histology of Rat Testes, *Urologia Internationalis*, 76:274-277, 2006.
92. Hadziselimovic, F., Herzog, B., The importance of both an early orchidopexy and germ cell maturation for fertility, *Lancet*, Oct, 6;358(9288): 1156-1157, 2001.
93. McAleer, I. M., Packer, M. G., Kaplan, G. W., Scherz, H. C., Krous, H. F., Billman, G. F., Fertility index analysis in cryptorchidism, *J. Urol.*, 153(4):1255-1258, 1995.
94. Schwentner, C., Oswald, J., Kreczy, A., Lunacek, A., Bartsch, G., Deibl, M., Radmayr, C., Neoadjuvant gonadotropin-releasing hormone therapy before surgery may improve the fertility index in undescended testes: a prospective randomized trial, *J. Urol.*, 173: 974–977, 2005.
95. Heiskanen, P., Billig, H., Toppari, J., Kaleva, M., Arsallo, A., Rapola, J., Dunkel, L., Apoptotic cell death in the normal and cryptorchid human testis,

The effect of human chorionic gonadotropin on testicular cell survival, *Pediatric Research*, 40(2): 351-356, 1996.

96. Assmus, M. Svechnikov, K., Euler, M. V., Setchell, B., Sultana, T., Zetterström, C., Holst, M., Kiess, W., Söder, O., Single Subcutaneous Administration of Chorionic Gonadotropin to Rats Induces a Rapid and Transient Increase in Testicular Expression of Pro-Inflammatory Cytokines, *Pediatric Research*, Vol. 57, No. 6, 2005.

97. Karaman, İ., Kaya, C., Öztürk, M., Piriñçi, N., Gümrükçü, G. Y., Tüken, M., The effects of human chorionic gonadotropin on normal testicular tissue of rats: dose-dependence and reversibility, *BJU International*, 97 (5), 1116–1118.

98. Billig, H., Furata, I., Rivier, C., Tapanainen, J., Parvinen, M., Hsueh, A. J.W., Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective stages, *Endocrinology*, 136, 5–12, 1995.

99. Blanco-Rodriguez, J., Martinez-Garcia, C., Induction of apoptotic cell death in the seminiferous tubule of the adult rat testis: assessment of germ cell types that exhibit the ability to enter apoptosis after hormone suppression by oestradiol treatment, *International Journal of Andrology*, 19 237–247, 1996.

100. Henriksen, K., Hakovirta, H., Parvinen, M., Testosterone inhibits and induces apoptosis in rat seminiferous tubules in a stage-specific manner: in situ quantification of apoptosis in squash preparations after administration of ethane dimethane sulfonate, *Endocrinology*, 136, 3285–3291, 1995.

101. Sinha, H., Wang, C., Leung, A., Swerdloff, R.S., Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment, *Endocrinology*, 136, 2770–2775, 1995. (X115)

102. Kogan, S.J., Fertility in cryptorchidism. An overview, *Eur. J. Pediatr.*, 146: 21-24, 1987.
103. Martin, D. C., Malignancy in the cryptorchid testis., *Urol. Clin. North. Am.*, 9: 371 -376, 1982.
104. Zini, A., Abitbol, J., Schulsinger, D., Goldstein, M., Schlegel, P. N., Restoration of spermatogenesis after scrotal replacement of experimentally cryptorchid rat testis., *Urology* 53: 223-227, 1999.
105. Yizhong, Y., Dewolf, C., W., Morgentaler, A., Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-Dependent and – independent pathways in mice, *Biology of Reproduction*, 58, 492-496, 1998.

