

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Üroloji Anabilim Dalı**

**VARİKOSEL İLE İNDÜKLENEN
TESTİKÜLER HASARIN PATOGENEZİNDE
TNF RELATED APOPTOSİS INDUCING
LIGAND (TRAIL) VE RESEPTÖRLERİNİN
ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Orçun ÇELİK

Antalya,2009

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Üroloji Anabilim Dalı**

**VARİKOSEL İLE İNDÜKLENEN
TESTİKÜLER HASARIN PATOGENEZİNDE
TNF RELATED APOPTOSİS INDUCING
LIGAND (TRAIL) VE RESEPTÖRLERİNİN
ROLÜ**

UZMANLIK TEZİ

Dr.Orçun Çelik

**Tez Danışmanı
Doç.Dr.İ.Türker Köksal**

**Bu tez, 2009.04.0103.001 kodlu proje olarak
Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
desteklenmiştir.**

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2009

*Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim
Dalı'nda eğitimim süresince emeği geçen tüm
hocalarıma ve mesai arkadaşlarıma;*

*Tezime katkı ve yardımlarından dolayı, danışman hocam
Doç.Dr.İ.Türker Köksal'a ve Yrd.Doç.Dr.Ömer Kutlu'ya*

*Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı'ndan;
Doç.Dr.Çiler Çelik Özenci'ye,
Araş.Gör. Merih Tekcan'a,
Araş.Gör.Nazlı Ece Güngör'e,
Araş.Tek. Sibel Özer'e;*

*Son olarak, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan ve
desteğini esirgemeyen sevgili aileme ve eşim Dr.Sinem
Kahveci Çelik'e en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi
sunuyorum.*

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis	5
2.2. Varikosel	6
2.2.1. Testiküler Kan Akımı	7
2.2.2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi	6
2.2.3. Hipertermi	7
2.2.4. Venöz Basıncı	10
2.2.5. Renal-Adrenal Reflü	9
2.2.6. Hormonal Disfonksiyon	12
2.2.7. Otoimmünite	11
2.2.8. Akrozom Reaksiyonu	12
2.3. Apoptoz	13
2.3.1. Ekstrinsik Yolak	18
2.3.2. İntrinsik Yolak	19
2.3.3. Ekstrinsik ve İntrinsik Yolaklar arası bağlantı	21
2.3.4. Varikoselde Apoptoz	22
2.4. TRAİL	25

GEREÇ ve YÖNTEM	33
3.1. Deney Hayvanları	33
3.2. Varikozel Deney Modelinin Oluşturulması	33
3.3. Dokuların Elde Edilmesi ve Hazırlanması	34
3.4. Rutin Işık Mikroskopik Gözlemler	34
3.5. İmmunohistokimyasal gözlemler	34
3.5.1. İmmünohistokimyasal Protokol	35
3.6. SDS - Poliakrilamid Jel Elektroforezi ve İmmuno Blot	36
3.7. TUNEL Metodu	32
3.8. İstatistiksel Analizler	39
BULGULAR	34
4.1. Testis Ağırlıkları ve Ven Çapları	41
4.2. Genel Görünüm	42
4.3. İmmünohistokimya Sonuçları	39
4.4. Western Blot Sonuçları	49
4.5. TUNEL Sonuçları	50
TARTIŞMA	52
ÖZET	57Error! Bookmark not defined.Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ABSTRACT	58
KAYNAKLAR	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AEC	:	Amino-etil-karbazol kromojeni
AIF	:	Apoptoz indükleyici faktör
Aİ	:	Apoptotik İndeks
ANT	:	Adenin nükleotid geçirgeni
Apaf-1	:	Kaspaz adaptör molekül
ASA	:	Anti sperm antikor
BAX	:	Bcl-2 ile ilişkili X-Protein
BER	:	Baz kesip çıkarma
BCG	:	Bacillus Calmette Guerin
CAD	:	Kaspazın etkinlestirdigi deoksiribonükleaz
CARD	:	Kaspaz aktive eden bölge
DD	:	Ölüm bölgesi
DED	:	Ölüm oluşturan bölge
DIABLO	:	Doğrudan AIP'a bağlanan düşük pH'lı protein
DISC	:	Ölüm başlatıcı sinyalleme kompleksi
DLBCL	:	Diffuse large B-cell lymphomas
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DR	:	Death receptor
eNOS	:	Endotelial nitrik oksit sentaz
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
FADD	:	Fas associated death domain
FasL	:	Fas ligandı
FasR	:	Fas reseptörü
FSH	:	Folikül uyaran hormon
GnRh	:	Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH	:	Glutasyon
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
hCG	:	İnsan koryonik gonadotropini
HE	:	Hematoksilen Eozin
IAP	:	Apoptoz baskılayıcı protein
ICAD	:	CAD baskılayıcı
JNK	:	Janus Kinaz
K	:	Kontrol grubu

KDa	:	Kilo dalton ağırlık
LH	:	Luteinize edici hormon
MAPK	:	Mitojen Aktive edici Protein Kinaz
mRNA	:	Mesajcı ribo nükleik asit
MVP	:	Majör vault protein
NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NF-κB	:	Nükleer faktör-κB
NLS	:	Nükleer lokalizasyon sinyalleri
NO	:	Nitrik oksit
OPG		Osteoprotegrin
PBS	:	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
R	:	Reseptör
R1	:	TRAIL-R1,DR4
R2	:	TRAIL-R2,DR5
R3	:	TRAIL-R3,DcR1
R4	:	TRAIL-R4,DcR2
rFSH	:	Rekombinant Folikül uyaran hormon
rLH	:	Rekombinant Luteinize edici hormon
RNA	:	Ribonükleik asit
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
S	:	Sham grubu (Yalancı-operasyon gören grup)
SCO	:	Sertoli Cell Only “Sadece Sertoli hücresi bulunan”
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
Smac	:	İkinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü
TBS	:	Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
tBid	:	Kesik Bid
TBS-T	:	Tween-20’li Tris Tamponlu Tuz Çözeltisi
TDF	:	Testis belirleyici faktör
TNF	:	Tumor Necrosis Factor
TNFα	:	Tümör nekrosis faktör alfa
TNFR1	:	Tümör necrosis factor recepter 1
TRADD	:	TNF Receptor Associated Deat Domain
TRAF2	:	TNF reseptörü ile ilişkili faktör–2
TRAIL/APO-2L	:	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRAIL-R1/DR4	:	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand receptors 1
TRAIL-R2/DR5	:	Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand receptors 2

TRAIL-R3/DcR1	:	Decoy receptors 1
TRAIL-R4/DcR2	:	Decoy receptors 2
PLAD	:	Preligand Assembly Domain
PTPC	:	Geçisi sağlayan por kompleksi
TNF-α	:	Tümör nekroz faktör-alfa
TRF-2	:	Telomerik protein-2
TUNEL	:	Terminal d-UTP Nick-End Labeling
XIAP	:	X'e bağlı apoptozu baskılayan protein
V	:	13 haftalık varikozel grubu
VDAC	:	Voltaj bağımlı anyon kanalı
WHO	:	Dünya sağlık örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.3.1. Apoptoz yolakları	16
2.4.1. TRAIL'in kristal yapısı	32
2.4.2. TRAIL şematik görünümü	33
2.4.3. Tuzak aktivitesinin modelleri	36
2.4.4. TRAIL ve reseptörlerinin apoptotik yolaktaki görünümü	37
2.4.5. TRAIL'in reseptörleri ile etkileşimi ve anti-apoptotik mekanizma	39
3.1.1. Operasyon ile ilgili resimler	40
4.2.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarında Johnsen Skoru değerlendirilmesi	43
4.2.2. Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait testis doku kesitlerinde HE boyası ile yapılan değerlendirmeye örnek olarak tübüllerin genel görünümleri	44
4.3.1. TRAIL-L, R1, R2, R3, R4 proteinlerinin kontrol, sham ve varikozel gruplarındaki ekspresyonları	46
4.3.2. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-R1' in immun boyanma skorlaması	
4.3.3. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-R2' nin immun boyanma skorlaması	
4.3.4. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-R3' ün immun boyanma skorlaması	
4.3.5. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-R4' ün immun boyanma skorlaması	
4.3.6. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-L' in immun boyanma skorlaması	
4.4.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait dokulardaki TRAIL-L , R1, R2, R3, R4 proteinlerinin ekspresyon şiddetlerinin Beta-Aktin protein ekspresyon şiddetine oranı.	53

R2,TRAIL-R3,TRAIL-R4 ‘ün ekspresyon şiddetlerinin Beta-aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri	54
4.5.1 Kontrol, sham ve varikozel gruplarında apoptotik indeks (AI) yüzdesi	55
4.5.2. Kontrol,sham ve varikozel gruplarında TUNEL sonuçları	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
4.1.1. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki sıçanların testis ağırlıkları ve ven çapları ile ilgili istatistiksel değerlendirme	41
4.2.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarında Johnsen Skoru değerlendirilmesi	43
4.2.2 Kontrol, sham ve varikozel gruplarında TRAIL-L ve reseptörlerinin immunohistokimyasal yoğunluk skorları	45
4.2.3. Kontrol,sham ve varikozel grubundaki TRAIL-L ve reseptörlerinin dağılımları	45
4.2.4. Kontrol,sham ve varikozel grubundaki TRAIL-L ve reseptörlerinin immun boyanma skorlaması	46
4.4.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarındaki TRAIL-L, R1, R2, R3, R4 Western Blot yöntemi ile protein ekspresyonlarının şiddeti	51
4.5.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarında apoptotik indeks (AI) yüzdesi.	54

GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

- Varikosel, spermatik kordondaki pampiniform venöz pleksusun patolojik dilatasyonu olarak tanımlanmıştır ve erkek infertilitesinin en önemli sebebi olarak gösterilmektedir (1-3). Yetişkin ve ergenlik çağındaki genel popülasyonun %15'inde klinik varikosel olduğu bildirilmektedir. Bu popülasyon primer infertilitesi olan erkeklerin %35'ini, sekonder infertilitesi olan erkeklerin ise %80'ini kapsamaktadır (4-5). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, normal semen analizine sahip varikoselli bireylerin ve varikosel öncesi fertiliteye sahip bireylerin bile testiküler fonksiyon ve fertilité kaybı riskini taşıdığı gösterilmiştir (6-7).
- Günümüzde bu konuda çok sayıda yayınlanmış makale olmasına rağmen, testiküler disfonksiyon ve infertilitenin indükleyicisi olarak bilinen varikoselin patogenetik mekanizması henüz anlaşılamamıştır. Bununla birlikte; adrenal ya da renal kökenli toksik metabolitlerin çıkışı, hipotalamik gonadal dengenin bozulması, venöz stazın neden olduğu testiküler hipoksi , testiküler sıcaklığın yükselmesi ve apoptozis gibi bazı mekanizmalar öne sürülmüştür (8-11). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda apoptoz ve hipoksinin varikosel etyolojisinde kuvvetli rol oynadığı gösterilmiştir(12).Kılınç ve ark. yaptıkları çalışmada varikosel modelinde hücre düzeyinde gelişen hipoksi sonucu apoptotik indeksin artışı göstermişlerdir.(13)Lee ve ark. yaptıkları varikosel modelinde hipoksi sonucu reaktif oksijen radikallerinde artış olduğunu göstermişlerdir(14).Sonuç olarak şiddetli ve uzamış varikoselde dejeneratif değişikliklere bağlı olarak zaman içerisinde gelişen histopatolojik değişimler sonucu germinal epitelde apoptozun arttığı sonucuna varılmaktadır.(15) Son zamanlarda, varikoseli olan hastalarda oligospermi gelişiminde de apoptozisin önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. TUNEL assay kullanılan bir rat varikosel modelinde, artmış germ hücre apoptozu gösterilmiştir.(16) Bu çalışmada, seminifer tübül başına apoptotik hücre 0.27 iken, kontrol grubunda 0.14 hücre belirlenmiştir. Benzer durum insanlarda da ortaya konulmuştur. Toplam germ hücre başına her büyütme sahasındaki ortalama apoptotik hücre yüzdesinin değerlendirildiği çalışmada,

olan hastaların ejaküle edilen spermlerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada, sperm hücreleri % 10'a kadar apoptotik iken kontrol grubunda bu oran % 0.1 bulunmuştur.(18).

- Apoptozisi başlatan nedenler çeşitlidir. Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmalari) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokardda bulunur. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve “natural killer” hücrelerinde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein-protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (“death domain”) adı verilen TRADD (“TNFR-1 associated death domain”) ve FADD (“Fas associated death domain”) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. (19)
- Tümör nekroz faktör ile ilişkili apoptozis indükleyici ligand (TRAIL/Apo-2) ilk olarak 1996 yılında Ashkenazi ve ark. tarafından tanımlanan; 281 aminoasit içeren, hücre yüzeyinin C-terminal ucuna yerleşmiş ve homotrimerik alt ünite yapısına sahip bir Tip-2 transmembran proteinidir (20-22). Fas/Fas-L ile benzer yapıya sahip olmasından ötürü tümör nekroz faktör ailesinden kabul edilmiştir.
- TRAIL çeşitli hücre yüzeylerinde apoptozun indüklenmesinde rol oynayarak anti-tümör ve anti-viral immun cevapta önemli role sahiptir. TRAIL-L ; iki adet ölüm reseptörüne (death receptor) sahip olup, DR4(TRAIL-R1),DR5(TRAIL-R2) ile apoptozis indüklenmesinde hücre içine sinyal iletimini gerçekleştirir. Bu sinyallerin toplanması sonucu hücre içi kaspaz-8 - 10 ardından kaspaz-3 aktivasyonu sonucu apoptozis modülasyonu tamamlanmış olur. Sonuç olarak DNA kırıkları ve kromatin kondensasyonu, membran hasarı ile hücre ölümü gerçekleşmektedir.(23-25) Bunun yanısıra TRAIL; DcR1(TRAIL-R3) ve DcR2(TRAIL-R4-TRUNDD) tuzak reseptörlerine bağlanarak hücre içerisindeki fonksiyonel ölüm bölgelerini antagonize edebilmektedir.(26-37)
- Varikosel hakkında birçok çalışma yapılmışsa da, varikosel gelişimi ve varikosel tedavisinin şekli hakkında henüz net bir ortak karara varılamamıştır. Yakın

disfonksiyonunun sperm apoptozu ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Daha önce araştırılmamış olması dolayısı ile bütün bu bilgilerden yola çıkarak, varikozel hastalarındaki sperm disfonksiyonunun testisteki apoptozis mekanizmasında TRAIL ve/veya reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Eğer hipotezimiz doğruysa, farmakolojik ajanlar (TRAIL-L, DR1, DR2 inhibitörleri) tarafından bu yolağın inhibisyonu, semen parametrelerini geliştirerek varikozel tedavisi için ileride yeni bir terapötik yaklaşım sunabilir. Uygun medikal tedavi umut verici olabilir çünkü subklinik varikozeller için cerrahi (varikozektomi) önerilmemektedir (38). Diğer yandan varikozektomiye medikal tedavinin eklenmesi, cerrahi tedavinin etkinliğini daha da arttırabilir.

Bu çalışmanın amacı; deneysel olarak varikozel oluşturulmuş sıçanların testislerindeki TRAIL-L ve reseptör proteinlerinin dağılımlarının ve aktivasyon derecelerinin değerlendirilmesi ve varikozelli erkeklerde infertiliteye neden olan sperm disfonksiyonunun patofizyolojik mekanizmasının aydınlatılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

2.1.2. Testis

Testislerin boyutları ortalama 4.5cm x 3cm x 2.7cm'dir. Tunika vaginalisin içerisindeki boşlukta mezorsiyum aracılığıyla asılı biçimde dururlar. Skrotumun içerisinde, sol testis genellikle daha aşağıda bulunur (April 1998). Tunika albuginea adı verilen kalın bağ dokusu kılıfı, her bir testisi sarmaktadır. Tunika albugineanın bağ dokusu arka bölümden her bir testisin içine doğru uzanarak mediastinum testisi oluşturur. İnce bağ dokusundan oluşan septumlar, mediastinum testisten içeriye doğru uzanırlar ve her bir testisi, her biri 1-4 sarmal şeklindeki seminifer tübülleri

spermatogenik hücreleri ve çoğalmayan ve destek hücreleri olan Sertoli hücrelerini içeren çok katlı germinal epitel tabakasından oluşur. Seminifer tübülde, spermatogenik hücreler bölünerek sperm hücrelerine farklılaşırlar.

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

Testislerin arteriyal desteği, vazal ve kremasterik arterlerle birlikte bulunan testiküler arterlerle sağlanır. Bu arterlerin arasındaki anastomozlar testisin kanlanmasını sağlamaktadır (Fretz and Sandlow 2002). Arteria testicularis, arteria renalis'lerin altında olacak şekilde, aorta abdominalis'ten çıkar ve musculus psoas major'un ön yüzünde seyredir. Arteria testicularis anulus inguilaris profundus'tan geçerek funiculus spermaticus'a gelir ve mezorsiyum'dan testise girer.

Testislerin kollateral kanlanmaları çok zengindir. Arteria ductus deferentis, arteria iliaca interna'nın dalı olup, arteria uterina'nın eşdeğeridir. Arteria kremasterica, arteria epigastrica inferior'un bir dalıdır. Arteria pudendae externa, arteria femoralis'in dalıdır (April 1998). Bu üç arter testisin kollateral kanlanmasını sağlar.

Testislerin venöz drenajı oldukça karmaşık bir olaydır. Skrotum içerisindeki primer venöz drenajdan, sol taraftaki renal ven'e ya da sağ taraftaki vena cava'ya drene olan testiküler ven ve inferior epigastrik ven'e drene olan kremasterik ven sorumludur. Sol internal spermatic ven, sol testisin anatomik olarak daha aşağıda durmasından ve damarların açısından dolayı sağ taraftakinden 8-10 cm daha uzundur. İnternal spermatic ven, sol renal ven'e dik olarak, sağ inferior vena cava'ya ise oblik açıyla girmektedir. Bu damarlar oldukça anastomozlaşmışlardır ve böylece pampiniform pleksusu oluştururlar (Fretz and Sandlow 2002). Funiculus spermaticus'da bulunan pleksus pampiniformis birleşerek her bir vena testicularis'i meydana getirir.

böylece testislerin ısısı vücut ısısından birkaç derece düşük olarak tutulur (April 1998). Plexus pampiniformis varikoselden %80 oranında etkilenir. Tüm venöz genişlemelerin %90'ı sol taraftadır, çünkü feçes ile dolu olan sigmoid kolon sol vena testicularis'e bası yaparak lokal venöz hipertansiyona neden olur. Varikosel trombozu sıklıkla ağrılı olup, ısı düzenlenmesini etkiler ve sperm sayısında azalmaya yol açabilir (April 1998).

2.2. Varikosel

Varikosel, skrotum içerisindeki pampiniform pleksusun dilatasyonu olarak tanımlanmaktadır. Varikosel sözcüğü, ilk kez 1843'de Curling tarafından "pampiniform pleksus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu" tanımına karşılık olarak kullanılmaya başlanmıştır (Noske and Weidner 1999) ve uzun zamandır bilinmesine karşın, patofizyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Varikosel, erişkin erkek popülasyonun %15-22'sini etkileyen fiziksel bir anomalidir (Kursh 1987; Hargreave 1993). İnfertilite araştırması nedeniyle kliniklere başvuran erkeklerin ortalama %30-40'ında varikosel saptanmaktadır (Hendry, Sommerville et al. 1973; Cockett, Takihara et al. 1984). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) kapsamlı bir projesinde, anormal semen parametrelerine sahip erkeklerin %25.4, normal semen parametrelerine sahip erkeklerin ise %11.7'sinde varikoselin bulunduğu bildirilmiştir (WHO 1992). Sekonder infertilite nedeniyle kliniğe başvuran olgularda, varikosel görülme sıklığı artarak %69-81 oranına ulaşmaktadır

1993).

Varikoselin hem hayvanlarda (Harrison, Lewis et al. 1986; Salama, Bergh et al. 2003) hem de insanlarda (Sigman 1997) ilerleyici ve zamanla artan testis hasarına yol açtığı bilinmektedir. Varikoselin fertilité üzerine etkilerini irdeleyen WHO projesinde, varikoselin semen anomalileri (sayı ve motilitéde bozulma), testiküler hacimde azalma ve Leydig hücre fonksiyonunda azalmayla ilişkili olduğu açıkça vurgulanmaktadır (WHO 1992). Ayrıca bu çalışmada, varikoselin derecesi ve sperm sayısında azalma oranı arasında doğrudan bir ilişki olduğu bildirilmektedir.

*Varikozel patofizyolojisi konusundaki olası hipotezler arasında; hipertermi, testiküler kan akımı ve venöz basınç değişiklikleri, renal/adrenal ürünlerin reflüsü, nutrisyon değişimi veya interstisyel sıvı formasyonunda değişiklik ile sonuçlanan testiküler vasküler değişiklikler, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu defekti, **apoptoz** ve oksidatif stres bulunmaktadır (Sigman 1997). Mevcut verilere göre, testiküler ısı artışı ve venöz reflü en çok kabul gören faktörlerdir. Bu hipotezlerden tek tek bahsedecek olursak;*

2.2.1. Testiküler Kan Akımı

Varikoselin bir patoloji olması, patofizyolojisinin aydınlatılmasında damara yönelik pek çok çalışmanın yapılmasına yol açmıştır. Deneysel hayvan çalışmalarında, varikozel ve testiküler kan akımı değişiklikleri konusunda birbirleriyle çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Tek taraflı varikozel varlığında iki taraflı testiküler kan akımı artışını gösteren Turner ve arkadaşlarının çalışmalarına karşı olarak (Turner, Brown et al. 1993), erişkin ratlarda aynı bulguları saptayan ve varikoselektomiye izleyen kısa ve uzun dönemlerde kan akımının normale döndüğünü bildiren çalışmalar da vardır (Green, Turner et al. 1984; Hurt, Howards et al. 1986). Tek taraflı patolojinin neden iki taraflı etki yaptığı henüz tam olarak bilinmemesine karşın, nöral veya hormonal faktörlerin rol oynadığı ileri sürülmektedir.

2.2.2. Testis-İnterstisyel Sıvı İlişkisi

Testiküler interstisyel sıvı; testiküler hücreler ve dolaşım arasındaki endokrin etkileşimi ve hücreler arasındaki parakrin mekanizmaları düzenler. Bu sıvının oluşumu, testiküler kapillerlerin kan akımı ve geçirgenliği tarafından belirlenir. Varikosele bağlı olarak internal spermatik vende ortaya çıkan hidrostatik basınç

interstisyel sıvı oluşumunda değişikliğe yol açar. Yapılan çalışmalarda, deneysel varikozel oluşumundan 30 gün sonra interstisyel sıvı oluşumunda artış olduğu gösterilmiştir (Turner and Miller 1996). Seminifer tübülleri ve interstisyel dokudaki hücreleri saran bu sıvı, testis ve testis vaskülaritesi ile bağlantılıdır. Testiküler interstisyel sıvı oluşumunu kontrol eden faktörler ve bu faktörlerdeki değişiklikler, testis işlevinde önemli rol oynamaktadır. Bu faktörlerden birisi de, testis kapillerlerinin vasküler geçirgenliğinin artışı olabilir (Sharpe 1984).

2.2.3. Hipertermi

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

1- *Skrotum* : Bu bölgedeki ciltte subkutan yağ dokusu bulunmaz.

2- '*Ters akım*' ısı sistemi : Spermatik kordon içindeki pampiniform pleksus, arteriyel ve venöz kan arasında 'ters akım' ısı değişim sistemini sağlamaktadır. Arteriyel kan testise girerken soğutulmakta ve testisin düşük ısınıı sağlamaktadır. Bu ısı değişim sistemi, yalnızca venöz kan ısının testise giren arteriyel kandan daha düşük olduğunda çalışabilmektedir (Mieusset and Bujan 1995). Yani, testise girecek olan spermatik arter kanının ısısı, testisten çıkan ve pleksus pampiniformisi oluşturan venöz kan tarafından soğutulmaktadır. Varikozelin bu mekanizmayı bozduğuna inanılmaktadır.

Taşınabilir küçük dijital veri kaydedici ile skrotal ısının 24 saat sürekli kaydedilebildiği bir çalışmada, varikozeli olan infertil erkeklerin skrotal ısının normal fertil erkeklerden hafif yüksek olduğu ileri sürülmüştür. Ancak, bu bulguların aksine, varikozeli olan ve olmayan infertil erkeklerde skrotal ısı arasında fark olmadığını bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (Mieusset, Bujan et al. 1987; Lund and Nielsen 1996).

Varikozel onarımı öncesinde bilateral intraskrotal ısı artışının, tek taraflı veya iki taraflı varikozektomi sonrasında kontrol grubu düzeylerine indiği ileri

görüşler de bulunmaktadır (Lerchl, Keck et al. 1993).

Hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan varikosel modellerinde de, skrotal ısı araştırılmıştır. Tek taraflı oluşturulan iatrojenik varikoselin (renal venin kısmi ligasyonu veya testiküler vende kapakçık yapısının cerrahi olarak bozulmasıyla) ısı artışına yol açtığı gösterilmiştir. Yine, sıçanlarda ve tavşanlarda varikosel ile intraskrotal ısı artışı arasında bir ilişki ortaya konmuş ve varikosel onarımı ile ısı normal hale dönmüştür (Green, Turner et al. 1984; Sofikitis and Miyagawa 1993). Ayrıca, artmış intraskrotal ısının testiküler histolojide de anormalliklere neden olduğu ve ejakülattaki sperm kalitesini düşürdüğü bildirilmiştir (Saypol, Howards et al. 1981; Shafik, Wali et al. 1989; Sofikitis and Miyagawa 1993).

Seminifer tübül ve/veya Leydig hücre düzeyinde nükleer DNA ve RNA bağlayıcı proteinlerde doğrudan ısı hasarı sonucunda spermatogenezin etkilendiği düşünülmektedir (Fujisawa, Yoshida et al. 1989; Nishiyama, Danno et al. 1998). Ancak, kısa dönemde Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunun bozulmadığı düşünülmektedir (Namiki, Nakamura et al. 1987).

2.2.4. Venöz Basınç

. Varikosele ikincil olarak gelişen venöz basınç artışı testis kan akımını etkileyebilmektedir (Sweeney, Rozum et al. 1991; Hsu, Chang et al. 1994). Hamster testisinin subkapsüler yüzeyinde bulunan mikrodamarlardaki intravasküler basınçların direkt ölçümü, testiküler kapiller basıncın çok düşük olduğunu ve vasküler ağın arteriyel bölümü tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur. Vasküler direncin bu dağılımı, hamster modelindeki venöz basınç artışına kapiller basıncın oldukça duyarlı olabileceğine işaret etmektedir (Sweeney, Rozum et al. 1991). Venöz akımın kollaterallerinin ligasyonu ve pampiniform pleksus distalindeki ana venöz akımın kısmi oklüzyonuna bağlı olarak, venöz basınçta % 90'ın üzerindeki artış postkapiller venüllere iletilmektedir. Kronik prekapiller vazokonstriksiyon testisin beslenme kaynağına olumsuz bir etkide bulunabilir ve dolayısıyla spermatogenezi bozabilir. Ayrıca artmış venöz basınç, intratestiküler onkotik ve hidrostatik basınçlarda değişikliğe neden olabilir; önemli hormonlar için parakrin ve taşınma ortamını değiştirebilir; mikrovasküler sıvı değişimini bozabilir.

İnsanlarda, skrotumun anterolateral yüzünden pampiniform pleksusa manometre bağlanmış iğne ile girilerek, spermatik kordon venlerindeki normal

olmayanlara göre pampiniformis pleksus venöz basıncı istirahatte ortalama 19.7 mmHg, valsalva ile ortalama 22 mmHg daha yüksek çıkmaktadır. Ancak, bu çalışmada varikoselli 32 olgunun 18'inde semen parametreleri normal bulunmuştur. Aynı araştırmacılar, varikoseli olan 60 olguya varikoselektomi uyguladıklarında, olguların %88'inde cerrahi sonrasında venöz basınç değerlerinde azalma olduğunu ortaya koymuşlardır (Shafik 1983). Bu seride, 42 hastanın %70'inde hem venöz basınçta azalma hem de semen parametrelerinde iyileşme gözlenirken, bu grup için gebelik oranı %32 düzeyinde gerçekleşmiştir. Ayrıca, venöz basınçta varikozel onarımı ile azalma sağlanan olgularda, sağlanmayanlara göre sperm motilitesinde düzelme daha fazla bulunmuştur.

2.2.5. Renal-Adrenal Reflü

Varikoseli olan erkeklerin yaklaşık %50'sinde sol spermatik vende retrograd akımın olduğu bildirilmektedir (Ahlberg, Bartley et al. 1966). Ayrıca, venografik çalışmalarla venöz reflüdeki artış belgelenmiştir (Comhaire, Kunnen et al. 1981). Bu durum, varikoselli hastalarda böbrekten ve adrenal bezden katekolaminler, prostoglandin E ve F gibi metabolitlerin yüksek konsantrasyonda reflüsüne yol açmaktadır. Başlangıçta görülen kronik testiküler vazokonstriksiyon, zamanla testiküler fonksiyonu etkileyebilmektedir. Ancak, hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar yukarıdaki varsayımı henüz doğrulayamamıştır.

Deneysel varikozel modeli oluşturulan hayvanlarda sol renal vene verilen işaretlenmiş mikrosferler, ne sol ne de sağ testiste gösterilememiştir (Turner and Lopez 1989). Bir başka çalışmada, Wistar tipi ratlarda varikozel oluşturulduktan 12 hafta sonra yapılan sol adrenaletominin; azalmış testis ağırlığı, artmış testiküler ısı, fertilitede azalma, azalmış epididimal spermatozoal içerik ve motilite üzerine etkisinin olmadığı ileri sürülmüştür (Sofikitis and Miyagawa 1993).

Varikozel cerrahisi sırasında, testiküler geri akımın olduğu venlerden alınan kandaki katekolamin düzeyi periferik venlerden alınanlardan 3 kat fazla iken, kontrol grubunda 1.5 kat fazla bulunmuştur (Comhaire and Vermeulen 1974). Venlerdeki bu artmış katekolamin, “ters akım ısı değişim sistemi” yoluyla pleksus pampiniformis düzeyinde testiküler arterlere geçerek, arterlerdeki noradrenalin düzeyini artırmakta ve buna bağlı olarak arteriyollerde oluşan vazokonstriksiyon, testiküler hipoksiye katkıda bulunmaktadır..

Varikoseli olan infertil olgularda, serum testosteron konsantrasyonunda azalma olduğu düşüncesi, varikoselin Leydig hücre fonksiyonunu bozduğu ve buna bağılı olarak testosteron üretiminde azalmaya yol açtığı varsayımına yol açmıştır. Rat modelinde spermatogenezin sürdürülebilmesi için en az 20 ng/ml intratestiküler testosteron konsantrasyonu gerektiğı (Zirkin, Santulli et al. 1989) ancak varikosel modelinde serum testosteron konsantrasyonunda etkilenme olmaksızın intratestiküler testosteron düzeyinde belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir (Rajfer, Turner et al. 1987). Bir başka rat modelinde, sol varikosel sonrasında intratestiküler testosteron konsantrasyonunun bilateral (her iki testistede) azaldığı belirlenmiştir (Turner and Lopez 1990). Benzer başka bir çalışmada ise, testosteronda ipsilateral (varikosel olan taraftaki testiste) artış gözlenmiştir (Ghosh and York 1994). Ayrıca, tek taraflı varikoselin, intratestiküler testosteron konsantrasyonunda bilateral ve eşit düzeyde düşmeye yol açtığı yine bir rat modelinde belirlenmiş ve testosteron biyosentezinden sorumlu olan 17,20-dezmozolaz ve 17 α -hidroksilaz enzimlerinin düzeyinde azalma olduğu da gözlenmiştir (Rajfer, Turner et al. 1987).

Dünya Sağlık Örgütü'nün varikoselin hormonal parametreler üzerine etkisini değerlendirdiğı çok merkezli bir çalışmada, varikoseli olan 30 yaş üstü erkeklerde altındakilere göre serum serbest testosteron düzeyi anlamlı derecede düşük bulunmuştur (WHO 1992). Bu durum, varikoselin Leydig hücre fonksiyonu üzerine zaman bağımlı olarak olumsuz etki gösterdiğini düşündürmektedir. Çayan ve arkadaşlarının, mikrocerrahi varikoselektominin hormonal parametrelere etkisini değerlendirdikleri çalışmaları da bu bulguları destekler niteliktedir. Bu çalışmada, varikosel onarımının Sertoli ve Leydig hücre fonksiyonunu arttırdığı ve serum serbest testosteron düzeyindeki anlamlı artışın sperm sayı ve motilitesinde iyileşme ile paralellik gösterdiği bildirilmektedir (Cayan, Kadioglu et al. 1999).

Bir başka çalışmada, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, varikoseli olanlarda serum serbest testosteron düzeyinin daha düşük, östradiol ve steroid bağlayıcı globulin düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (Kazama 1995). hCG'ye testosteron yanıtının değerlendirildiğı çalışmanın verilerine göre varikosel, hCG'ye testosteronun erken yanıtını (1-4 saat) azaltabilmektedir (Cayan, Kadioglu et al. 1999). Bu durum büyük olasılıkla 17,20 liyaz düzeyindeki blok nedeniyle testosteron sentezindeki bozulmaya bağlıdır. Yukarıda bahsedilen bulgular, varikoseli olan bazı hastaların testislerinde, bir defekt sonucu cinsiyet steroid konsantrasyonundaki değişikliklere bağılı olabilir. Ancak bu bulguların, varikoselli hastalardaki endokrinopatiye bağılı mı, yoksa azalmış spermatogenezin etkisiyle mi

gelişen aşırı yanıt nedeniyle, varikoseli olan hastalarda endokrin profilde değişiklik olduğu ve varikoselektomi ile bunların düzelebileceğini ileri süren çalışmalar da bulunmaktadır (Kass, Freitas et al. 1993; Hudson 1996).

Tüm bu bulgulara karşın, varikoseli olan hastalardaki folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinizan hormon (LH), testosteron ve östradiol gibi hormon düzeylerinin normal sınırlarda kaldığını bildiren çalışma sayısı da azımsanmayacak ölçüdedir (Swerdloff and Walsh 1975; Schiff, Wilson et al. 1976; Hudson and McKay 1980; Hudson, Crawford et al. 1981).

Varikosel onarımının hormonal parametrelerin geri dönüşümüne etkisi konusunda da literatürde farklı bulgular bildirilmektedir. Bazı çalışmalarda, varikosel onarımı öncesi ve sonrasında testosteron konsantrasyonunun değişmediği ileri sürülmekle birlikte (Hudson, Perez-Marrero et al. 1985; Segenreich, Shmueli et al. 1986), diğer çalışmalarda özellikle preoperatif düşük testosteron düzeyine sahip hastalar olmak üzere bazı hastalarda varikosel onarımının serum testosteron düzeyini arttırdığı bildirilmektedir (Comhaire and Vermeulen 1975; Su, Goldstein et al. 1995; Cayan, Kadioglu et al. 1999).

Tüm veriler gözden geçirildiğinde, varikoselin hipotalamo-hipofizer-gonadal aksı olumsuz yönde etkilediği ve özellikle anormal Leydig hücre işlevi olan olguların varikosel onarımından yarar görmeyeceği söylenebilir.

2.2.7. Otoimmünite

Kan-testis bariyerinin bozulmasının antisperm antikor (ASA) üretimini tetiklediği düşünülmektedir. Olası etiyolojiler arasında; testis torsiyonu, duktal obstrüksiyon, epididimit, prostatit ve testis travması yanı sıra *varikosel* de bulunmaktadır (Jarow and Sanzone 1992). Fertilite durumu göz önüne alınmaksızın varikoseli olan sağlıklı erkeklerin testis biyopsisinde, Sertoli-Sertoli hücre bağlantılarının sağlam olduğu gösterilmiştir (Cameron and Snyder 1980).

Varikoselin hangi mekanizmayla kan-testis bariyerini bozmadan ASA'larını uyardığı bilinmemektedir (Turner, Jones et al. 1987). Hayvanlarda deneysel olarak oluşturulan varikosel modelinde, sham ve opere edilmeyen ratlara göre varikosel oluşturulan ratlarda daha yüksek düzeyde ASA birikimi olduğu gösterilmiştir (Shook, Nyberg et al. 1988).

ASA değerlendirmesi genel olarak 2 yöntemle yapılmaktadır. İmmunobead tekniğinde direkt spermatozoaya karşı oluşan antikorlar bakılırken, ELISA ile seminal plazmaya karşı oluşan antikorlar ölçülmektedir. Dolayısıyla, spermatozoa ve seminal plazmadaki ASA'lar ayrı ayrı değerlendirildiğinde, varikoseli olan ve olmayan infertil hastalarda ASA düzeylerinde farklılık çıkmazken, bu fraksiyonlardaki tüm ASA'lar kombine edildiğinde varikoseli olan infertil hastaların %91'inde antikor saptanırken, varikoseli olmayan infertil hastaların %41'inde antikor bulunmaktadır (Golomb, Vardinon et al. 1986). Bu farklılığın nedeni bilinmemektedir.

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

2.2.8. Akrozom Reaksiyonu

Varikoselde, sperm sayı ve morfolojisinden daha çok sperm fonksiyonunda bir defekt olduğunu ve bunun da daha çok zona pellusidaya bağlanma sırasında gelişen akrozom reaksiyonu defekti olduğu düşünülmüştür. (Rogers, Mygatt et al. 1985; Vigil, Wohler et al. 1994). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, varikosel varlığında mannoz ligand reseptörleri fertil donrlerlerle eşdeğer ekspresyon göstermektedir. Ancak, mannoz tedavisine karşılık spermatozoa akrozom reaksiyonunu gerçekleştirememekte ve zona pellusidaya penetre olamamaktadır (Benoff, Barcia et al. 1996). Aynı çalışmada, varikosel onarımının akrozom reaksiyonunda iyileşme sağlayamadığı da ileri sürülmektedir.

Varikoselli hastalardan elde edilen spermatozoanın, miyozin-benzeri epitopları tamamlaması bu hastalarda sinyal iletimini düzenleyen mekanizmalarda veya kalsiyum iyonunun içeri girişinde bir defekt olduğunu düşündürmektedir (Benoff S 1995). Eser metaller gibi bazı ko-faktörler, varikoselli hastalardaki infertil duruma katkıda bulunabilir. Bu durumun, eser metal düzenlenmesinde defekte yol açan bir genin varlığına bağlı olduğu da kabul edilmektedir (Benoff, Barcia et al. 1996; Benoff, Hurley et al. 1997). Ayrıca, varikoseli olan hastalarda akrozom reaksiyonunu olumsuz etkileyen önemli sperm plazma proteinlerinin ekspresyonunda, nitelik ve nicelik olarak gözlenen moleküler farklılıklar, fertilit üzerine değişken etki gösterebilir.

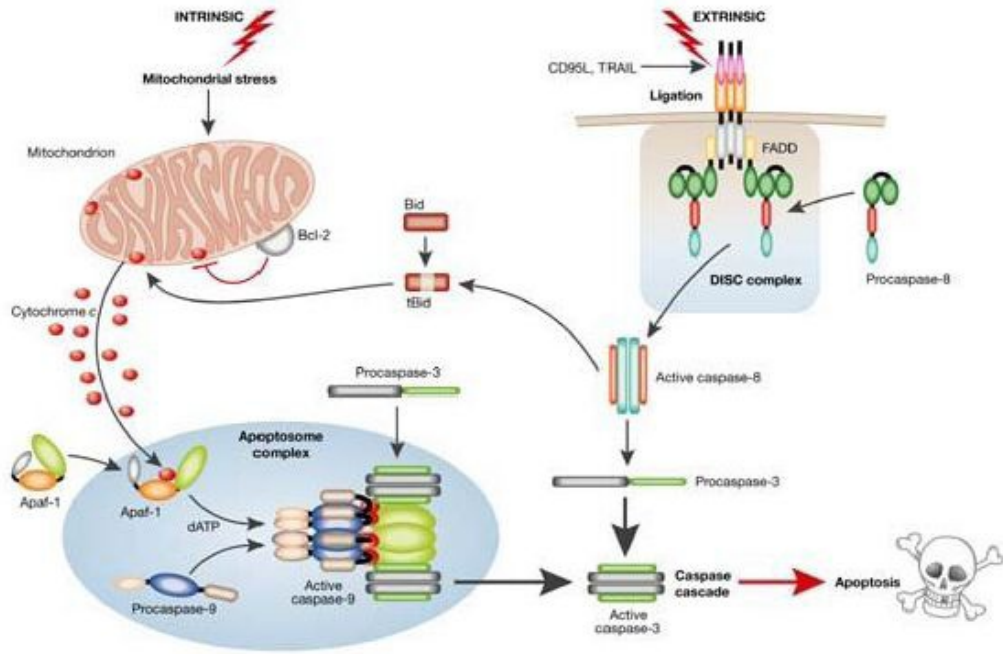
2.3. Apoptoz

Varikozel patofizyolojisinde apoptozun ne derece önemli rol oynadığı güncel çalışmalarda da gösterilmiştir. Normal testis fonksiyonu içerisinde germ hücrelerinde devam eden düzenli bir apoptoz olduğu bilinmektedir. Varikozel gibi klinik durumlarda germ hücreleri ve diğer testis hücrelerinde apoptozis artışı olduğu ve testis fonksiyonunda azalma meydana geldiği saptanmıştır.

Apoptoz kontrollü bir hücre ölüm şekli olup, çok hücreli organizmaların gelişim ve hücre içi dengelerinde merkezi bir rol oynar. Akut doku hasarı ve inflamatuvar cevabı tetikleyen nekroza kıyasla, apoptoz kontrollü ve inflamatuvar cevabı olmayan bir hücre ölüm şeklidir.

Apoptotik hücre ölümü, hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmik membran parçalanması gibi tipik morfolojik özelliklerle bağlantılıdır. Apoptotik mekanizmaların bozulması, genellikle mutasyonların oluşmasını kolaylaştırarak, hücrenin yaşam süresinin anormal şekilde uzaması ile ilişkili karsinogenez mekanizmalarında yer alır. (136).

Memeli hücrelerinde belirlenmiş iki apoptotik yol mevcuttur: (Şekil 2.3.1)



Şekil 2.3.1 Apoptoz Yolakları

Ekstrensik yolak olarak da adlandırılan ilk yolak, ölüm reseptörleriyle uyarılmakta olup, bunlar tümör nekroz faktör (TNF) reseptör ailesinin alt grubudur.

İntrensik yolak olarak adlandırılan ikinci yolak ise, mitokondri katılımlı, Bcl-2 protein ailesi tarafından ilerletilen ve kontrol edilen bir yolaktır (137-138). Her iki yolak da başlatıcı kaspazların aktivasyonuna sebep olarak, efektör kaspazlar aktive etmektedir. Kaspazlar, sistein bağımlı aspartat spesifik proteazlardır ve aktive olmaları posttranslasyonel seviyede düzenlenmektedir. İlk başta inaktif prokaspazlar olarak sentez edilirler ve bu prodomeinler, küçük altbirim ve büyük altbirimlerden oluşurlar. Başlatıcı kaspazlar, kaspaz-2 ile kaspaz-9'da olduğu gibi kaspaz aktive eden bölge (CARD), kaspaz-8 ile kaspaz-10'da olduğu gibi ölüm oluşturan bölge (DED) gibi uzun prodomeinler içerirler.

Bu prodomeinler, kaspazların diğer proteinlerle etkileşime girerek kendi aktivasyonlarının düzenlenmesine olanak sağlarlar. Buna karşılık efektör kaspazlar, çok küçük prodomeinlere sahiptirler. Kaspaz kaskadı, ölüm başlatıcı sinyalleme kompleksi (DISC) oluşumu ile sonuçlanan ölüm reseptör tetiklenmesiyle veya apoptozom adlı intrinsik protein kompleksi ile aktive edilebilmektedir. Apoptozom mitokondriden sitokrom c salınmasıyla oluşturulur, bu işlem asıl olarak Bcl-2 ailesi üyeleriyle kontrol edilir ve Apaf1 ile bağlantılıdır. Kaspaz-9 daha sonra bu protein kompleksi ile aktive edilir. Bu kaskad bir kere başlatılırsa pozitif ileri besleme sağlanır ve hücre kaçınılmaz bir şekilde apoptoza gider.

Efektör kaspazlar DNAazları aktive ederek hücre membranında değişikliklere, protein katlanmasında bozulmalara sebep olmaktadır. Bir kaspaz tarafından

etkinleştirdiği deosiribonükleazın (CAD) nükleusa girerek DNA'yı parçalara ayırmasına ve sonuçta apoptotik hücrelerde ki karakteristik "DNA merdiveni" görünümüne sebep olmaktadır (139).

2.3.1. Ektrensik Yolak

Apoptozun dış yolunda, tümör nekroz faktörü (TNF) ailesi, hücre yüzey reseptörleri ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligandlar ve Fas ligandları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar. TNF ailesi reseptörler (TNF-R1/CD120a, TNF-R2, DR3/Wsl-1/Tramp, DR4/ Trail-R1, DR5/Trail-R2, CAR-1) ve Fas (CD95/APO1) reseptörü belli bir aminoasit dizilimi ve homolojiyi paylaşırlar (140-141). Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligand bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarının kıyaslanması sonrasında, molekülde kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesinin (DD) bulunduğu gösterilmiştir. Bu bölgeler apoptozun başlaması için gerekli olan sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlandığı yerlerdir. Duyarlı ligandların bağlanmasıyla, üç tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü kompleks oluşturmak üzere bir araya gelir. TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla, TNFR'e bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD/Mort-1) adlı adaptör proteinlere bağlanırlar. Bu adaptör proteinlerden birinin ektopik yapımı apoptozu uyaramaktadır. Bu proteinlerin hem DD hem de proteazların ölüm oluşturan bölgesine (DED) bağlanabilen protein etkileşme bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar bir ölüm başlatıcı sinyalleme kompleksi (DISC) oluştururlar. Proteazların aktivasyonu apoptotik sinyali daha da iletmektedir. Apoptozu başlatma yeteneklerini hasarlayan TNFR ya da Fas mutasyonlarında, sitoplazmik ölüm domeinindeki bozulmaların apoptozun gerçekleşmemesini sağlayabilmesi, bu bölgelerin Fas ve TNFR'e bağlı apoptozda oldukça önemli rol oynadıklarının göstergesidir (142,143). TNFR sinyalleme kompleksi, en az 3 farklı fonksiyon göstererek çeşitli aktivasyon olaylarında yer almaktadır. Bunlar arasında janus kinaz (JNK) aktivasyonu, nüklear faktör kappa B(NF-kB) aktivasyonu ve apoptozun uyarılması sayılabilir. TNFR tarafından apoptozun başlatılması için TRADD ve FADD gerekirken JNK ve NF-kB aktivasyonu ile TRADD, TNF reseptörü ile ilişkili faktör-2 (TRAF2) ve RIB görev almaktadır. JNK ve NF-kB aktivasyonunun, apoptoz uyarımında etkin olmadığı, apoptozdan koruyucu yanıt oluşturmada önemli olduğu bilinmektedir. Örneğin NF-kB, apoptozu baskılayan çok sayıda antiapoptotik geni aktive etmektedir, apoptozu baskılayan proteinlerin (IAP) bunlar arasında olduğu bildirilmiştir (144).

2.3.2. İntrensik Yolak

ajanlarla başlayan sıkıntılı durumlara yanıtta da olduğu gibi, hücrenin kendi içinden başlatılarak aktive olur. İç yoldaki apoptotik sinyal iletiminde mitokondrinin temel bir rolü bulunmaktadır. İç yolda, ölüm sinyalleri mitokondrial membranın geçirgenliğini değiştirerek, apoptozun çeşitli kademelerine dahil olan proapoptotik faktörlerin salınmasına sebep olur (138). Mitokondrial salınımı Bcl-2 ailesinin üyelerinin kontrol ettiği öne sürülmektedir. Mitokondriden salınan faktörler arasında sitokrom c (146), apoptozu uyaran faktör (AIF) (147), ikinci mitokondri kaynaklı kaspaz aktivatörü/doğrudan AIP'a bağlanan düşük pH'lı protein (Smac/DIABLO) (148-149) ve endonükleaz G sayılabilir (150). Sitokrom c, mitokondriyal elektron aktarım sisteminin önemli bir parçasıdır. Normalde mitokondrinin iç ve dış zarı arasındaki bölgede yerleşmiştir. Sitokrom c, apoptoz kompleksi "apoptozom" oluşumuna katılır. Sitokrom c'nin dATP (ya da ATP) ve sitoplazmik faktör Apaf-1 ile birlikte sitoplazmaya salınımı kaspaz-9'un kendini ve sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Smac/DIABLO ise IAP(Inhibitor of Apoptosis) ailesi proteinlerini inhibe ederek kaspaz aktivasyonunu ilerletir (148-149).

AIF ve sitokrom-c salınımı, membran potansiyel kaybı ve membran geçirgenlik değişmesi gibi işlev bozukluklarına bağlı olabilmektedir (151). Büyük spesifik olmayan kanal olarak belirtilen geçisi sağlayan por kompleksi (PTPC), mitokondrinin iç ve dış zarlarının birbirine bakan yüzlerine yerleşmiş multimerik bir yapıdır. PTPC dış mitokondri zarında bulunan voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC, porin)dir. 18 kDa mitokondrial benzodiazepin reseptör ve heksokinazdan, iç zar ve matrikse bakan yüzde yerleşmiş olan adenin nükleotid geçirgeni (ANT) ve siklofilin D'den oluşmaktadır. Sitokrom c salınımının mekanizması tam olarak bilinmemektedir (151-153). Bu konu ile ilgili olarak ileri sürülen bir teoriye göre, kanallar çözünmüş proteinlerin geçeceği büyüklüktedir. Bu kanalları Bcl-2 ailesinin BAX ve Bad gibi apoptotik üyeleri oluşturabilmektedir. Bu proteinler tek başlarına por oluşumu için yetersiz kalırken BAX'ın oligomerize olması, çok yüksek iletkenlikte kanallar oluşmasını sağlayabilir. Ayrıca BAX ve tBid'in fosfolipid tabakaların stabilitesini azaltması suretiyle, mitokondri zarının doğrusal geriliminin azalmasına ve BAX ile tBid'in zar arası proteinlerin sitoplazmaya geçmesine yetecek büyüklükte protein lipid kompleksleri oluşturmaya neden olabilir. Bir başka olasılık, kanal oluşumunda BAX'ın VDAC ile birlikte çalışmasıdır. BAX ve Bad kanal açılmasını başlatırken, Bcl-XL kapanmasını kolaylaştırır(151, 152, 154, 155). Buna karşın yapılan başka bir çalışma verilerine göre, BAX' ın VDAC ile herhangi bir elektrokimyasal etkileşime girmediği, bununla birlikte diğer bir proapoptotik protein olan bid'in VDAC ile etkileşimde olduğu ileri sürülmüştür (156).

2.3.3. Ekrensik Ve İntrensik Yolaklar Arasındaki Bağlantı

Apoptozda intrensik ve ekstrensik yolaklar birbirlerinden bağımsız olarak ilerletilse de, aralarında etkileşim vardır. Aralarındaki bu etkileşim Bid proteininin kaspaz-8 ile aktive edilmiş şekli olan tBid aracılığı ile sağlanmaktadır. Sitoplazmada inaktif şekilde bulunan Bid, kaspaz-8 tarafından kırılır, böylece 15 kDa'luk bir karboksi terminal fragmanı oluşur (tBid). Oluşan tBid, BH3 bölgesine sahip olduğundan diğer proapoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri ile etkileşime girerek, normalde bulundukları sitoplazmadan mitokondriye göç etmelerine (aktivasyonlarına) neden olup, sonuçta sitokrom c salıverilmektedir Bid ayrıca diğer hücre yüzey ölüm reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşebilmektedir. Yapılan çalışmalarda, Bid'i "knock out" yapılmış fare hepatositlerinde, TNF veya anti-Fas ile apoptoz indüklenmeye çalışıldığında, bu farelerde apoptozun oluşmadığı gözlemlendiği rapor edilmiştir (157-158-139).

Bid karboksi terminal fragmanının ayrıca, bak-düzenlemeli sitokrom c salıverilmesini de aktifleştirdiği bildirilmiştir (160-161). Bid'in hücre yüzey ölüm reseptörlerinden gelen apoptotik sinyalin mitokondriye iletilmesinde rol aldığı, böylece ölüm reseptörleri ile mitokondrinin bağlantısında önem taşıyabileceği öne sürülmektedir. BAX fonksiyonu defekte uğramış insan kolon kanseri hücreleri ile yapılan çalışmalarda, TRAIL indüklü apoptozda mitokondrial salınımın gerekli olduğu gösterilmiştir. Burada asıl gerekli olan molekülün, kaspaz kaskadının negatif regülasyonunu sağlayan, X'e bağlı apoptozu baskılayan protein (XIAP, X-linked Inhibitor of Apoptosis)' in inhibisyon etkisini ortadan kaldırdığı bilinen Smac/DIABLO olduğu önerilmektedir. Yapılan çalışmalar neticesinde intrensik yol ile ekstrensik yol arasındaki bağlantıda Smac/DIABLO salınımının anahtar vazifesi görüldüğü anlaşılmaktadır (162).

2.3.4. Varikoselde Apoptoz

Varikosel ve apoptoz arasındaki ilişki, 3 olay nedeniyle birliktelik göstermektedir: ısı stresi, androjen yoksunluğu ve toksik uyaran (Marmar 2001). Varikoseldeki ısı artışı ile apoptoz arasındaki ilişki çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Lue ve arkadaşlarının çalışmasında varikoselin neden olduğu ısı artışının, hücreye ve evreye özgül olarak apoptoza neden olduğu ileri sürülmektedir (Lue, Hikim et al. 1999). Varikoselli hastalarda apoptotik yolun bir diğer nedeni, androjen yoksunluğu olabilir. Bu bağlamda rat modelinde, hipofizektomiden 4 gün sonra immatür ratlarda apoptoz indüklenirken, matür ratlarda ancak GnRH antagonistleriyle apoptoz indüklenmektedir (Tapanainen, Tilly et al. 1993; Zini, O'Bryan et al. 1996). Antagonist tedavi başlatıldıktan sonraki 5. günde preleptoten ve pakiten spermatositler ile evre VII-VIII spermatidlerde apoptoz görülmektedir. Bu ratlara, rekombinant LH (rLH) ve rekombinant FSH (rFSH) verildiğinde, rLH grubunda apoptozda %67, rFSH grubunda %79'luk azalma ortaya çıkmakta ve intratestiküler testosteron düzeyi normal seviyeye ulaşmaktadır. Apoptozla ilgili son durum ise toksik ajanlardır. 2-metoksi etanol, etilen glikol eter ve bunların yan ürünü 2-metoksiasetik asit gibi toksik maddelerin hayvan deneylerinde apoptoza yol açarak spermatosit ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Ku, Wine et al. 1995; Li, Wine et al. 1996; Brinkworth, Weinbauer et al. 1997). Ayrıca, yukarıda da belirtildiği gibi, varikoselde toksik adrenal metabolitlerin internal spermatik vene reflüsü söz konusudur.

Apoptoz, varikoselin de dahil olduğu infertilite ile ilişkili durumlar sperm sayısını olumsuz yönde etkileyebilir. Spermatogoni a, spermatosit ve spermatid olmak üzere her 3 tip germ hücresi de apoptoz tarafından olumsuz şekilde etkilenebilmektedir (Hikim and Swerdloff 1995). Ratlarda yapılan çalışmalarda, normal spermatogenez sırasında tüm preleptoten spermatositlerin %75'inin apoptoz tarafından ortadan kaldırılabilmesi ileri sürülmektedir (Huckins 1998). Yaşlı erkeklerdeki germ hücre kaybında apoptozun etken olduğu bildirilse de (Brinkworth, Weinbauer et al. 1997), diğer insan çalışmalarında hipospermatogenez ve spermatid düzeyindeki maturasyon duraklaması olan erkeklerde artmış apoptotik germ hücreleri

gözlenmemektedir (Lin, Lamb et al. 1997; Lin, Lamb et al. 1997).

Son zamanlarda, varikoseli olan hastalarda oligosperminin ortaya çıkışında apoptozun önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Sıçanlarda oluşturulan varikosel modelinde Terminal d-UTP Nick-End Labeling (TUNEL) kullanılarak artmış germ hücre apoptozu gösterilmiştir (Fujisawa, Hiramane et al. 1999). Benzer durum insanlarda da ortaya konulmuştur. Toplam germ hücre başına her büyütme sahasındaki ortalama apoptotik hücre yüzdesinin değerlendirildiği çalışmada, varikosel için %14.7, kontrol grubu için %2 oranı verilmektedir (Simsek, Turkeri et al. 1998).

Germ hücrelerindeki apoptoz spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir.(172) Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptozis gerçekleştiği bildirilmiştir(173). Apoptozis, spermatogenezde genellikle evre I, XII-XIV tübüllerde, spermatositler ve spermatogonyumlarda gerçekleşir.(171-173)

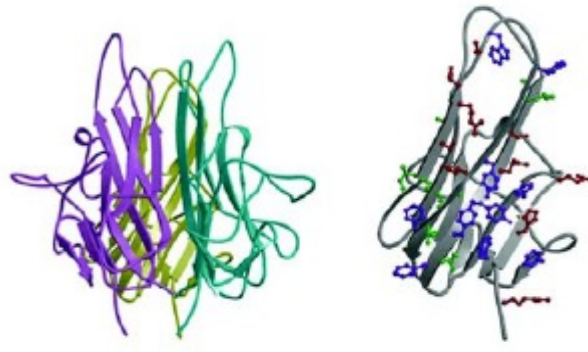
Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir.(90,172,177,178,179,180) Varikosel nedeni ile incelenen hastaların testislerinde oluşan hasarda apoptozun rolünü inceleyen bir çalışmada, testis histopatolojik incelemesinde olguların üçte birinde testiküler dokuda programlı hücre ölümünde anlamlı oranda artış saptanmıştır.(181) Bunlara karşılık apoptozun varikoselde azaldığına dair tek çalışma Fujisawa ve arkadaşlarıdır.(182) Caruso ve Walsh ise deneysel varikosel modeli ile ipsilateral testis dokusunda gözlenen apoptozun operasyon sonrası 14. günde istatistiksel olarak artış göstermeye başladığını saptamışlardır.(183)

Tesiküler apoptozu yol açan birçok mekanizma 3 noktada kontrol edilebilir görünmektedir: *Hücrel membran*, membran reseptörleri ile iletilen ölüm sinyalleri, Fas ligandı ile Fas bağlanması, kaspaz 8'in aktivasyonunu tetikler. Bir kere aktive oldu mu kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7 gibi efektör kaspazlara sinyal yollar. İmmünohistokimya ile Fas'ın germ hücreleri, Fas ligandın Sertoli hücreleri üzerinde lokalize olduğu tespit edilmiş. *Sitoplazmada* ise, kaspazlar denilen sistein proteazları içeren sinyal iletim yolları bulunur. *Nükleer seviyede*, proapoptotik Bax

apoptoz düzenleyici genler bulunur. Tüm kaspazlar birlikte, insan seminiferöz epitelinde apoptozun regülasyonunda merkezi bir rol oynarlar.(184-185-186)

2.4. TRAIL (TNF Related Apoptosis Inducing ligand)

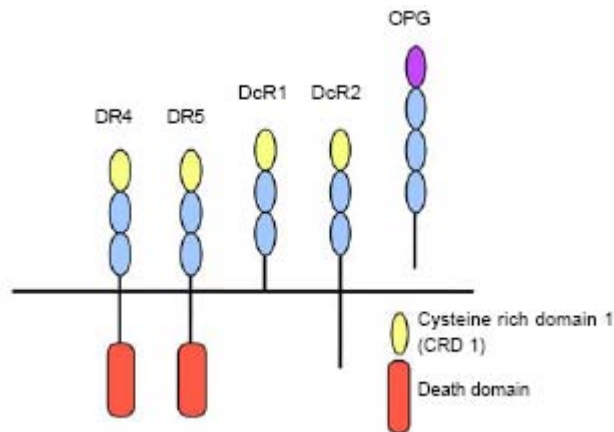
TNF süper ailesinden olan TNF ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand (TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL veya APO-2 ligand) 32 kDa moleküler ağırlığında, 281 amino asit ile kodlanan, 5 değişik reseptöre bağlanabilen kristal yapıda bir proteindir. (Şekil 2.4.1.)



Şekil 2.4.1. TRAIL'ın kristal yapısı. (A) Trimer formu, TRAIL'ın şerit yapısı (yan görünüş). (B) Trimerisasyon sonrası TRAIL'ın monomer yapısı, aromatik halkalar mor,yeşil bölgeler hidrofobik,kırmızı bölgeler polar olarak tasvir edilmiştir.

Bu protein, kısa bir stoplazmik N-terminal domaini ve uzun bir ekstraselüler reseptör bağlanma domaini ile Tip 2 transmembran proteini gibi eksprese edilmektedir.

TRAIL-L geni, 3. kromozom üzerinde 3q26 pozisyonunda lokalize olmuş, 5 ekzondan oluşan ve yaklaşık olarak 1.77 kb'lık bir mRNA kodlayan bir gendir (187-188). TRAIL-L, vücudun çeşitli patojenlerden ve prekanseröz hücrelerden korunmasında rolü olan monosit, makrofaj, dentritik hücreler, natural killer hücreleri ve sitotoksik T lenfositleri gibi hücrelerde eksprese edilmekte olup, bu hücrelerin gösterdiği sitotoksik etkiye aracılık ettiği bilinmektedir (189-192). TRAIL, TNF-alfa ve FasL den farklı olarak selektif olarak kanser hücrelerinde apoptozu indüklemesiyle oldukça ilgi çekici bir moleküldür (193). TRAIL-L , iki apoptoz indükleyici reseptör TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5, Killer), bunun yanında dekok reseptör olarak da adlandırılan, apoptoz sinyali göndermede yetersiz kalan iki hücre bağlı reseptör olan TRAIL-R3 (DcR1), TRAIL-R4 (TRUNDD, DcR2) ve çözünebilir bir reseptör olan osteoprotegrin (OPG) olarak adlandırılan bir diğer reseptörle de bağlanabilmektedir.(Şekil 2.4.2.)



Şekil 2.4.2. TRAIL reseptörünün şematik görünümü. Hücre dışı sistin zengin bölgeler (cysteine-rich domains). Sarı oval birinci bölgede kısmi sistein vardır. Diğer mavi oval bölgeler sisteinle doludur .

TRAIL-R1 (188) ve TRAIL-R2 (194,195,196), %58 oranında dizi homolojisi gösterirler. Bu reseptörlerin, TNFR süperailisinin tüm üyelerinde bulunan ve ölüm domeini (DD) olarak adlandırılan domeinle karakterize olduğu ve sitoplazmik domeinlerin yüksek derecede homoloji gösterdiği bilinmektedir. TRAIL-R1'deki bazı mutasyonlar çeşitli kanserlerle alakalandırılmıştır, örneğin ligand bağlanma bölgesindeki bir polimorfizm mesane kanserindeki yüksek insidansla alakalı gösterilmiştir (197). Dekoy reseptör olarak da adlandırılan TRAIL-R3 ve TRAIL-R4 apoptoz sinyali oluşturmazlar, ancak bunların apoptoz indükleyen reseptörlerle ekstraselüler kısımlarının yüksek homoloji gösterdiği bilinir. Bununla birlikte, TRAIL-R3, intraselüler domein ve transmembran domeinden yoksundur. TRAIL duyarlı hücrelerde TRAIL-R3'ün overekspresyonunun apoptozu engelleyebileceği yapılan çalışmalarda öne sürülmüştür. TRAIL-R4, sitozolde yalnızca kısalmış bir ölüm bölgesi (DD) içerir. TRAIL-R4'ün overekspresyon olduğu durumlarda, anti-apoptotik genleri indükleyen NF- κ B'yi aktive ettiği öne sürülmektedir. Söz konusu bu mekanizma ile hücrelerin TRAIL indüklü apoptozdan korunuyor olmaları düşünülmektedir (198) . Osteoprotegrin (OPG), TRAIL'in beşinci reseptörü olarak rapor edilmiştir (199), OPG bir salgı proteini olup, büyüme düzenleyicisi gibi işlev görür ve kemik şeklinin değişmesinde osteoklastların aktivasyonunu sağlar. OPG'nin bu aktivitesinin TRAIL-L etkileşimi ile alakalı olmadığı düşünülmekte olup, TRAIL-OPG interaksiyonunun önemi hala bilinmemektedir (197).

TRAIL-R1 ve TRAIL-R2'nin dokularda yaygın olarak sentez edildiği bilinir, fakat aktive lenfositlerden güçlü şekilde kontrol edilir (200). TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 reseptörlerinin doku homeostazından sorumlu olabilecekleri düşünülmüştür. Literatürde TRAIL-L sensitiv kanser hücre hatları ile yapılan çalışmalarda DNA harap edici kanser terapisinde TRAIL-R2 nin arttığı tespit edilmiştir. Ek olarak kaybolmuş TRAIL-R2 fonksiyonu sonucu azalmış apoptotik aktivite ve baş, boyun ve mide kanserlerinde kontrol edilemeyen proliferasyon rapor edilmiştir (201). p53 apoptozda DNA harabiyeti oluşturacak gen varyasyonlarının olduğu gen bölgesini hapseder. İlerlemiş çalışmalar fonksiyonel p53 bağlanma bölgesinin TRAIL-R2 için promoter olduğunu ortaya koymuştur ve TRAIL-R2 apoptotik ölüm sinyalini direk olarak kaybolmuş p53'ü hedef alarak uygular. Buna bağlı olarak kaybolmuş p53 ve

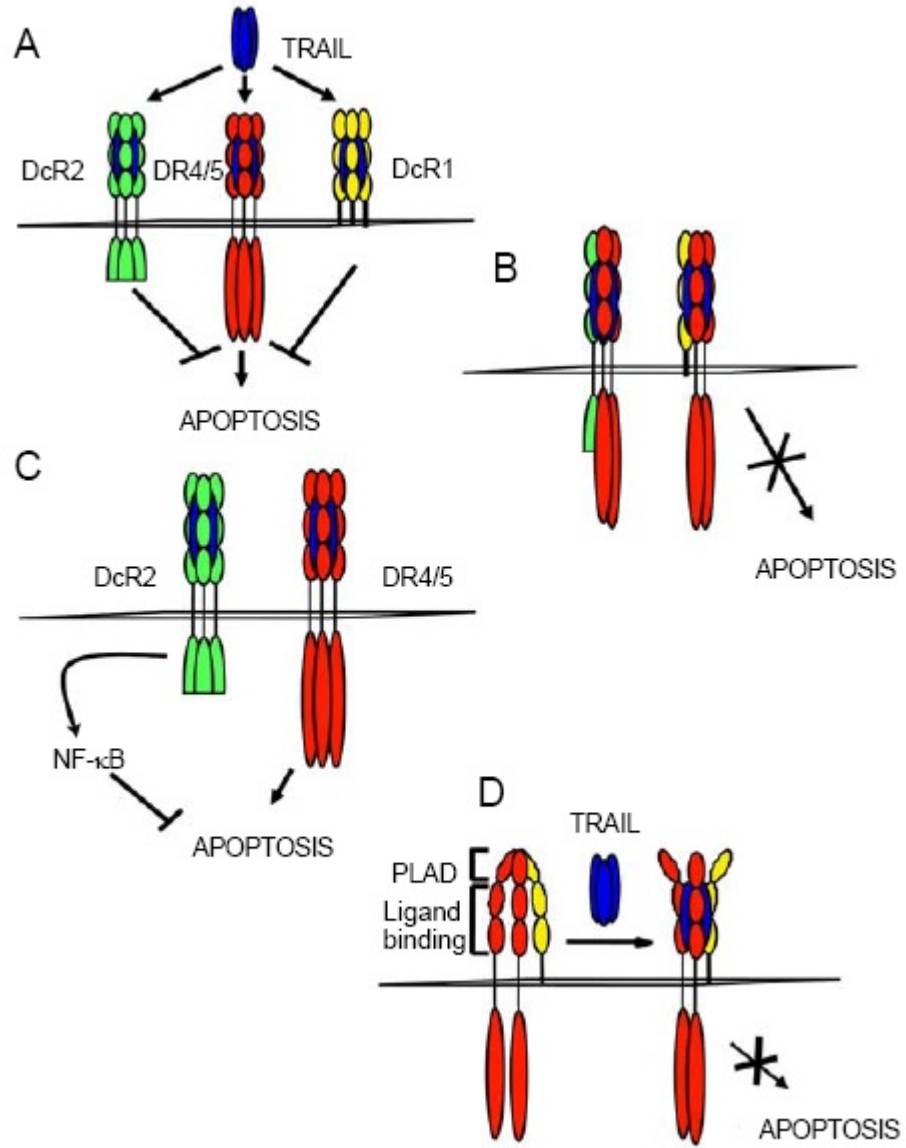
görülmektedir (202). Bu transkripsiyon faktörünün (p53) iki kontrol mekanizması olup bunlar mitokondriumdan reaktif oksijen radikalleriyle ve TRAIL-R2 reseptör uyarılım yoluyla olan mekanizmalardır. Yapılan çalışmalarda γ -radyasyonu uygulanması sonucu özellikle dalakta ve ince barsakta TRAIL-R2 artışı gözlenmiştir, bu p53 uyarılımlı bir olaydır. p53'ün cevabında TRAIL-R2 nin destekleyici görev gördüğü gösterilmiştir. Özellikle sinovial fibroblastlarda TRAIL-R2 uyarılımlı apoptosis tespit edilmiştir. Romatoid artirit patolojisinde proliferasyon olmuş transforme hücrelere benzer özellikler gösteren sinovial fibroblastlar rol oynamaktadır ve bunlar metalloproteinaz sekrete ederek eklemlerde anormal inflamasyonlar meydana getirirler. Bu hücrelerde TRAIL-R4 reseptörünün upregule olduğu ve TRAIL ilişkili apoptosisten kurtulmakta oldukları görülmektedir. Fakat TRAIL-R2 monoklonal antikorlarına hedef olarak efektif şekilde ölmektedirler (203).

TRAIL-R1 reseptöründe yapı ve fonksiyon olarak TRAIL-R2'e benzer kanser hücrelerinde bir çok mutasyonları gösterilmiştir. Özellikle mesane kanserinde ligand bağlanma bölgesinde yüksek polimorfizm insidansı gösterilmiştir (204). Kolon kanserlerinde TRAIL-R1 gösterilmesi iyi prognoz ile ilişkilidir. TRAIL-R1 de R2 gibi p-53 ile ilişkilidir.

TRAIL-R3 decoy (tuzak) reseptörüdür. Diğer TRAIL reseptörlerinden çok daha az sentezlenir. Predominant olarak periferik kan hücrelerinde transkripte edilir. Minimal bir sinyal kapasitesi gösterilmiştir, artışı apoptosise neden olmaz, onun yerine bloke eder. TRAIL-R3 mRNA'nın normal hücrelerde, transforme olmuş hücrelere göre daha yüksek oranda olması, normal hücrelerin TRAIL ilişkili apoptosise daha dirençli olmasında rol oynayabilir (205). Bu yüzden TRAIL reseptör varyasyonlarının dağılım seviyelerinin TRAIL ilişkili apoptosiste regulasyon sağladığı düşünülmektedir. DcR1-Fc(TRAIL-R3) transfeksiyonu TRAIL uyarılımlı apoptosisi inhibe ettiği gösterilmiştir (206). TRAIL-R4 reseptörü, diğer TRAIL reseptörleri yüksek derecede homoloji gösterir. Yaygın olarak ekspresse edilir. 3 potansiyel N-glikolizasyon bölgesi ve bir kesilmiş hücre içi alanı bulunmaktadır. Artmış ekspresyonu hücre ölümüne değil NF- κ B indüksiyonunu sağladığı gösterilmiştir (206-207).

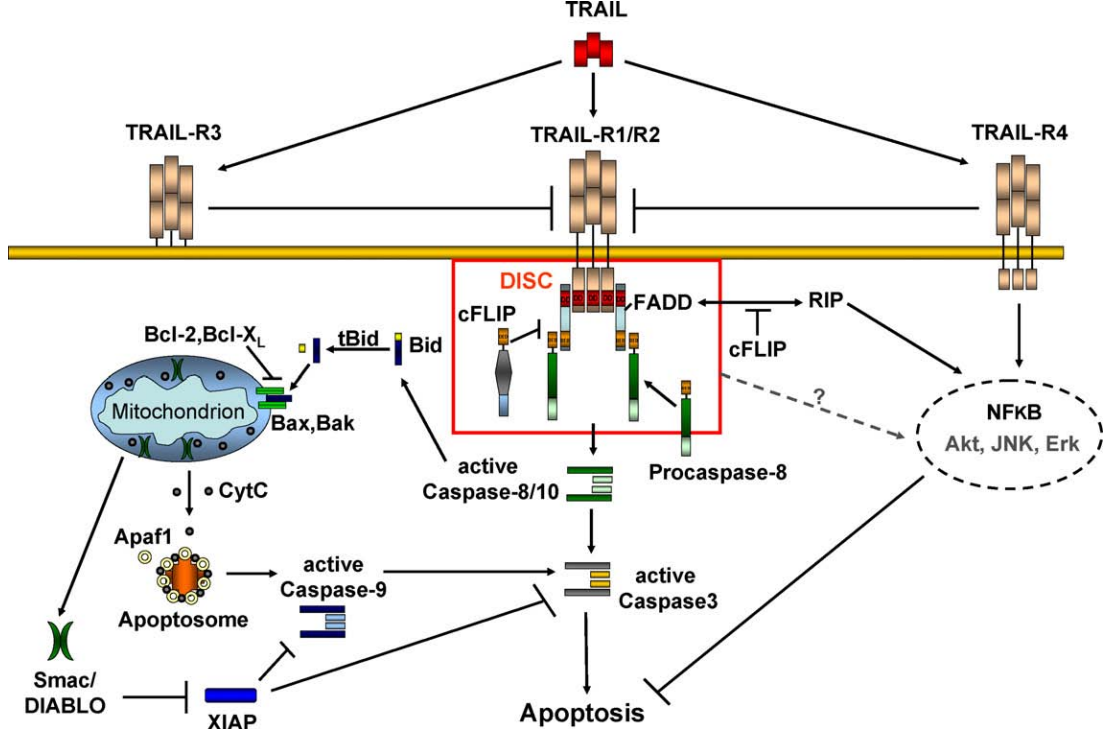
Bu reseptörler arasında hücreleri apoptoza yada proliferasyona götüren ilişkiler günümüzde net olarak belirlenememiştir, fakat en çok kabul gören 4 hipotez mevcuttur. Birincisi geleneksel *kompetisyon teorisi*: ölüm reseptörleri ile tuzak reseptörleri arasında ligand affinitesi sonucu gelişir. İkincisi ölüm reseptörü ile tuzak reseptörlerinin birleşerek farklı *bir formasyon oluşturması* bu formasyonunda

sonra *NF- κ B* ' nin antiapoptotik sinyaller yollayarak apoptosisi inhibe edebilmesi, dördüncüsü preligand assembly domain (PLAD) proteini tarafından TRAIL-L reseptörlerinin karışık bir kompleks oluşturarak TRAIL-L sinyallerini bloke etmesi (208) (Şekil 2.4.3.).



Şekil 2.4.3.: Tuzak aktivitesinin modelleri (A) Klasik tuzak reseptörü, ölüm reseptörü arasındaki kompetisyon. (B) Tuzak ve ölüm reseptörlerinin birleşerek inaktif olması. (C) TRAIL-R4'ün NFκB'yi aktive ederek antiapoptotik sinyalleri uyarması. (D) PLAD proteini TRAIL reseptörlerinin inaktif olması.

fazla üretilerek olabileceğini düşünmek doğru olmayabilir. Yapılan çalışmalarda hücrel yerleşiminde önemli olabileceğini, insan melanomasında TRAIL-R1 ve TRAIL-R2 nin internalize olduğunu buna karşılık TRAIL-R3 ve TRAIL-4'ün çekirdekten hücre yüzeyine doğru hareket ettiği gösterilmiştir (209).

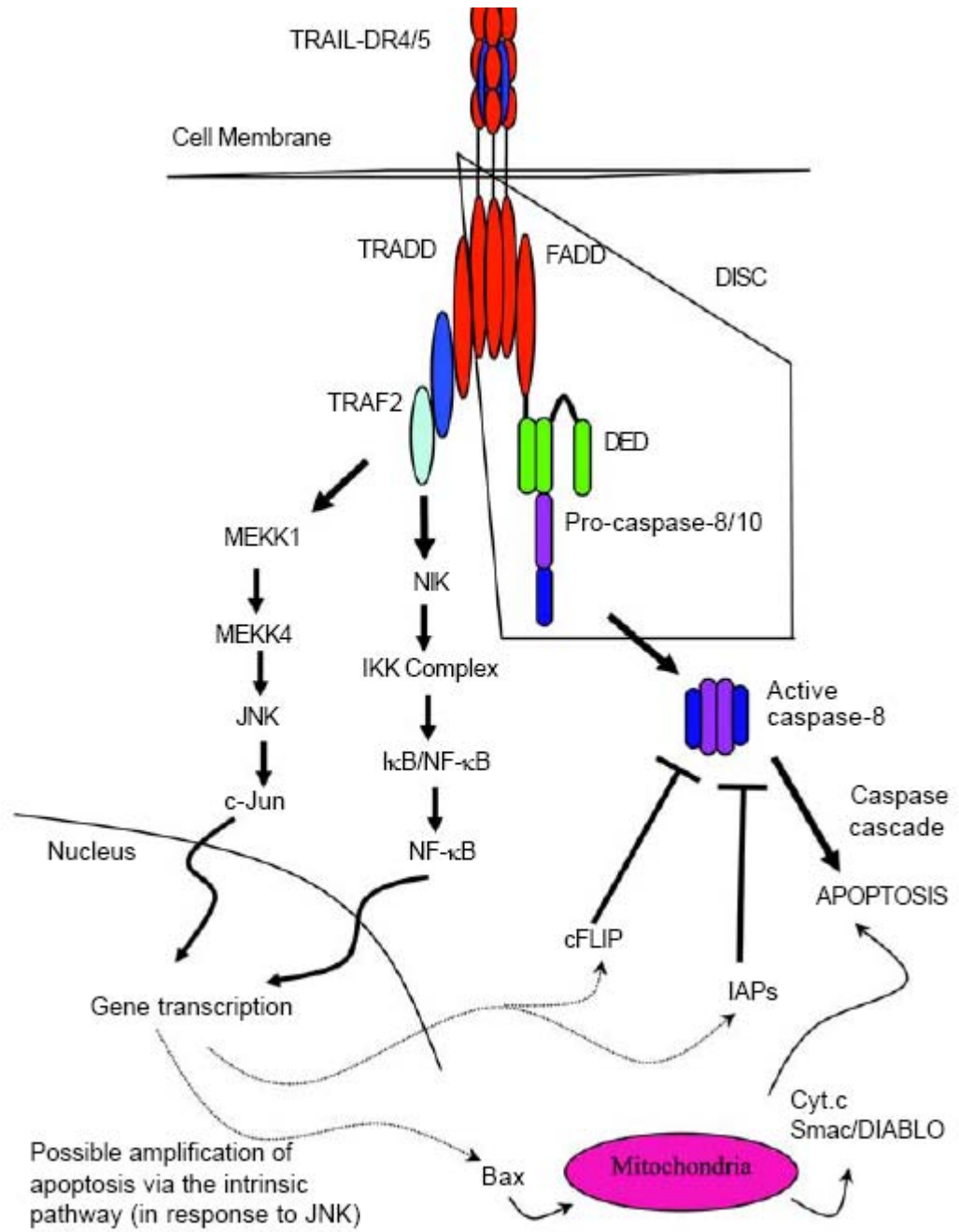


Şekil 2.4.4. TRAIL ve reseptörlerinin apoptotik yolaktaki görünümü

Yukarıdaki şekilde gösterildiği gibi, TRAIL-L , TRAIL-R1 yada TRAIL-R2 reseptörlerine bağlandığında fas – associated death domain proteininin (FADD) komplekse eklendiği bilinmektedir. Bu kompleksin N-terminal ucunda death effector domain (DED) ve prokaspaz 8 eklenir, fakat erken dönemde yapılan çalışmalarda FADD'ın TRAIL-R1 ve R2 sinyalizasyonunda rol oynamadığı düşünülürken FADD negatif ratlarda TRAIL-R1 uyarılımlı ölüme direnç gelişmesinin gösterilmesi FADD'ın önemli bir rol oynadığını göstermiştir. FADD kompleksine prokaspaz 8'in eklenmesi ile beraber DISC kompanenti oluşur . Prokaspazın aktif hale gelebilmesi için de kaspaz 10'a ihtiyacı vardır. Böylece aktif apoptotik süreç başlamış olur (210).

zamanda transkripsiyon faktörü NF-κB yolu ile aktif yaşam sinyalleri de gönderir. NF-κB antiapoptotik genleri up-regule eder. NF-κB'nin indüksiyonunun ikincil olarak apoptoz sinyalleri de gönderebileceği gösterilmiştir. TNFR1 (tümör necrosis factor receptor 1) reseptörlerinin TRAIL reseptörlerinden çok daha az NF-κB üretmesi bunu desteklemektedir. Ayrıca diğer çalışmalarda da TRAIL-R4 ve R5 yolu ile olan apoptosisin inhibisyonunun sadece NF-κB aktivasyonu ile olmadığı rapor edilmiştir (211).

TRAIL-L bağlanmasından sonra diğer sinyal yolunda ikincil transkripsiyon faktörü olarak c-Jun rol oynamakta olup pro yada antiapoptoz sinyallerinden hangisini uyardığı tam olarak bilinmemektedir. TRAIL-L reseptöre bağlandıktan sonra birinci basamak adaptör protein TRADD' a ihtiyaç vardır. TRADD, (TNF receptor associated deat domain) FADD ile aynı bölgeye bağlanır daha sonra başka bir adaptör proteinine daha ihtiyaç vardır reseptör interacting protein (RIP). RIP'in otofosforilasyonu ile TRAF-2 meydana gelir. Bu kompanent 2 yol için asıl kompanenttir (212) . Bundan sonra c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK), MEKK1/MKK4 yolu ile uyarılır yada NFκB, NIK7/IKK kompleksi yolu ile uyarılır. *TRAIL'ın JNK yolu ile hem kaspaz bağımsız yolu hemde kaspaz bağımlı yolu aktive edebildiği gösterilmiştir.* JNK yolunun induksiyonu ile TRAIL uyarılımlı apoptosisin intrinsek yoldan amplifiye olabileceği gösterilmiştir (213). (Şekil 2.4.5.)



Şekil 2.4.5. : TRAIL'ın reseptöre bağlanması ile başlayan major apoptotik yol. Bununla beraber c-Jun ve NF-κB uyarılması ile pro-survival genlerin up regulasyonu sonrası gelişen anti-apoptotik aktivite şematize edilmiştir.

TRAIL-R1 yada TRAIL-R2'nin uyarılması aynı zamanda NF-κB ve JNK'i de aktive eder. Buna ek olarak NF-κB nin de regülatör bir rol oynadığı experimental çalışmalarda gösterilmiştir... Böylece NF-κB, TRAIL etkili apoptotik kaskatı farklı hücresel yolları uyararak aktive edebileceği gösterilmiştir (48). Bu çalışmalardan farklı olarak, NF-κB aktivasyonu ile TRAIL-R3'ün upregüle olduğunda gösterilmiştir (49). (Şekil 2.4.5.)

3.1. Deney Hayvanları

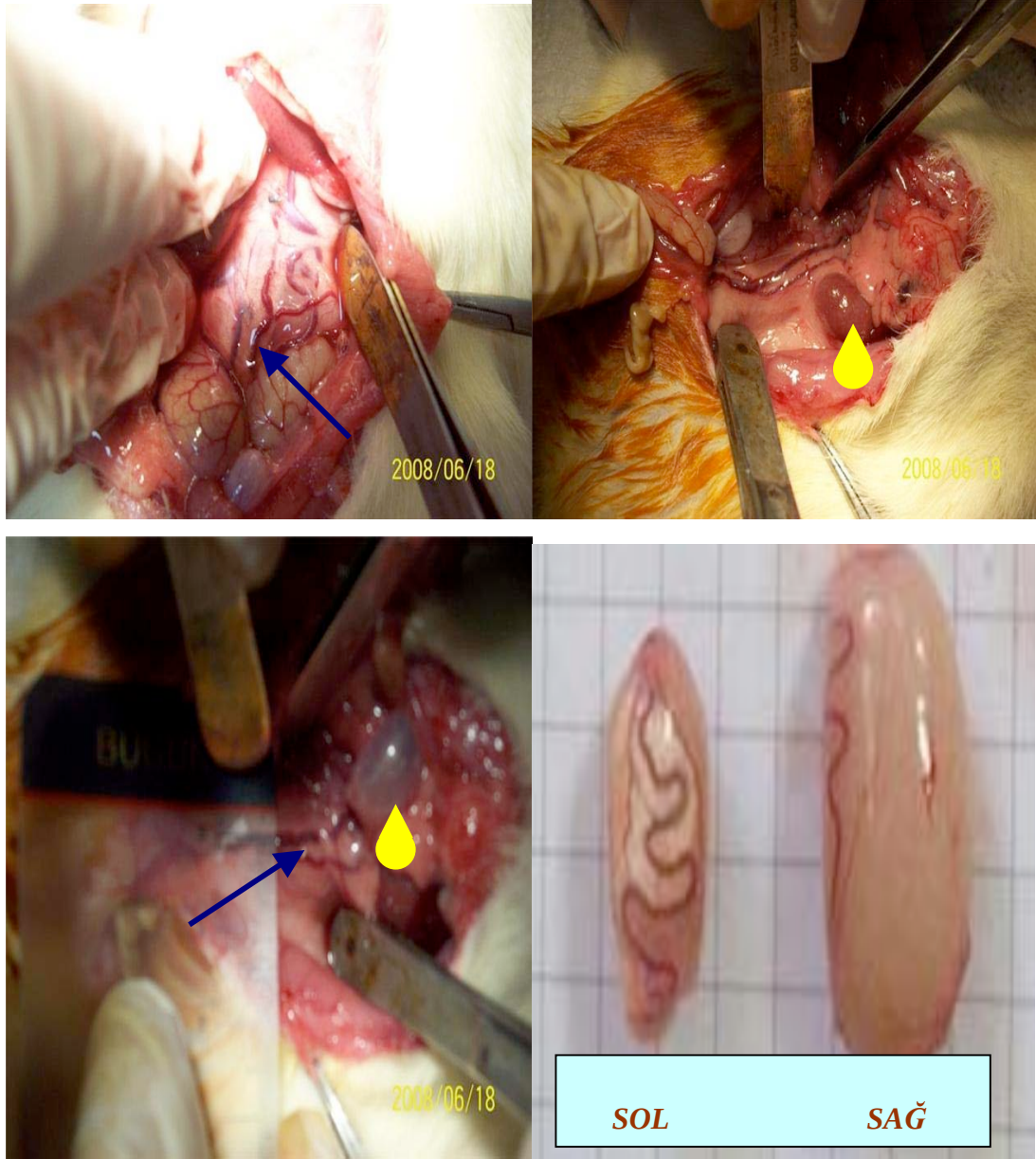
Çalışmada, Akdeniz Üniversitesi “Deney Hayvanları Ünitesi”nden temin edilen toplam 30 adet *Rattus norvegicus* (Wistar) ırkı erkek sıçanlar kullanılmıştır. Tüm sıçanlar standart laboratuvar koşullarında, standart diyet ve musluk suyu ile beslenmiştir. Yedi haftalık ve ağırlıkları 250-350 gr olan yetişkin sıçanlar rastgele olarak 3 gruba ayrılmıştır. 1.Grup sıçanlar kontrol grubu, (n=6) , 2.Grup sıçanlarda sham operasyonu (n=6) gerçekleştirilmiştir. 3.Grup sıçanlar ise varikozel grubunu oluşturmuştur (n=6). Deneysel varikozel modelinin indüklenmesinden sonra tüm sıçanlar, 13. hafta (n=18) sonunda kurban edilmişlerdir.

3.2. Varikozel Deney Modelinin Oluşturulması

Deneysel varikozel modeli, Terry TURNER tarafından tanımlanan model uygulanarak oluşturulmuştur (Turner 2001). Xylasin (Rompun®, Bayer AG, 15mg/kg, i.m.) ve ketamin (Ketalar®, Parke Davis, 75 mg/kg, i.m.) anestezi için kullanılmıştır. Üst sol abdominal bölgeye orta hattan laparotomi insizyonu ile ulaşılmıştır. İç organlar sağa çekilerek sol böbrek, adrenal ve renal venler ile sol spermatik venin sol renal vene girişi görünür hale getirilmiştir. Dikkatli bir diseksiyon ile spermatik ve adrenal venlerin sol renal vene girdiği medial yüz yağ ve bağ dokularından temizlenmiştir. Renal ven ligasyonunun yapılacağı bölüme 4.0 ipek sütür yerleştirilmiştir. 0.85 mm çaplı metal tel üzerinde daraltılarak ve böylece ven daraltıldıktan sonra tel çekilerek, damarın dış çapı 1 mm’ye düşürülmüştür. On mg/ml Gentamisin sülfat ile abdominal boşluğun hijyeni sağlandıktan sonra, abdominal duvar ve ön abdominal kaslar 4.0 kromik katküt ile ayrı ayrı dikilmiştir. Yukarıda belirtildiği şekilde sol testiste varikozel oluşturulduktan 13 hafta sonra, anestezi altında varikozel varlığı tanımlanan sıçanlardan sol ve sağ testisler alınmıştır. Varikozeli tanımlamak için sol spermatik ven çapı metal mikrometre ile ölçülmüştür. Sol spermatik ven varikozel çapı 1mm’den az olan sıçanlar, varikozel olgusu olarak kabul edilmeyerek deney grubuna dahil edilmemiştir. Sham operasyonu uygulanan sıçanlarda, yukarıda belirtilen işlemler uygulanarak sol renal ven diseke edilmiş, fakat daraltılmamıştır. Kontrol grubundaki deney hayvanlarına

büyütmesi altında yapılmıştır. (Şekil 3.1.1)

Deney protokolü, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bakım ve Kullanım Komitesi tarafından Helsinki protokolüne uygun olarak 2008-06-05 numara ile onaylanmıştır.



Şekil 3.1.1. Operasyon ile ilgili resimler

Sağ alt köşedeki resimde boyutları azalmış sol testis görülmektedir. Varikozel modeli oluşturulan grupta sol testis ağırlığının istatistiksel olarak azaldığı gösterilmiştir. Sarı ok böbrek, mavi ok spermatik veni göstermektedir. Sol renal venin parsiyel ligasyonu sonrasında 1 mm ve üzerinde ven çapı bulunan deneklerde varikozel modelinin olduğu kabul edilmiştir. Varikozel grubundaki ven çapının artışın istatistiksel anlamlı olarak arttığı da gösterilmiştir.

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

3.4. Rutin Işık Mikroskopik Gözlemler

Her üç gruba ait sol testis doku örnekleri, Bouin fiksatifinde fikse edildikten sonra rutin parafin teknikleri uygulanarak ve 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Hematoksilen-Eozin (HE) boyaması yapılarak (Demir 2001) varikozel modelinin oluşup oluşmadığı ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir.

3.5. İmmunohistokimyasal gözlemler

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

3.5.1. İmmunohistokimyasal Protokol

Beş µm kalınlığındaki parafin kesitler, pozitif yüklü lamalar (Superfrost) üzerine alınarak bir gece 45 °C'lik etüvde bekletilmiştir. Deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirildikten sonra, her birinde beşer dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiştir. Daha sonra, distile suda çalkalanarak, fosfat tuzu tamponunda (PBS; pH: 7.2-7.4) üç kere beşer dakika yıkanmıştır. Antijenik maskenin giderilmesi amacıyla kesitler 200ml sitrat tamponu (pH:6.0) içerisinde mikrodalga fırında 15 dakika muamele edildikten sonra 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılmıştır. Çevresi hidrofobik kalemle çizilen kesitler, distile su ve PBS'ten geçirilmiştir. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edilmiştir. Distile suda çalkalanıp PBS'te yıkanan kesitler, oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin (Ig) bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu (Lab Vision) ile 7 dakika muamele edilmiştir. Serumun fazlası alındıktan sonra, tavşan poliklonal anti- TRAIL((1:500 dilüsyon) , anti-DR1 (1:750 dilüsyon) , anti-DR2 (1:3000 dilüsyon) ,anti-DR3 (1:1000 dilüsyon) ,anti-DR4 (1:600dilüsyon) [ABCAM, Kat No: ab2435, ab8414, ab8416, ab2087, ab2019] ile + 4°C'de, gece boyu oda ısısında, 2 saat kesitler inkübe edilmişlerdir.

içeren Fare IgG (Vector) izotip kontrolü veya normal vektör uygulanmıştır. Kesitler, inkübasyon sonunda PBS ile üç defa beşer dakika yıkanmıştır.

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

Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait dokulardaki TRAIL ve reseptör antikorlarının immunoboyanması pozitif olan hücre oranlarının değerlendirilmesine göre sonuçlar belirlenmiştir. İmmunohistokimyasal tekniklerle boyanan bütün kesitler Axioplan mikroskopunda (Zeiss) değerlendirilmiştir. Boyanmalar, kesitteki özel boyanmanın yoğunluğu temel alınarak semikantitatif olarak skorlanırken, alandaki tüm hücreler aşağıda verilen yoğunluk kategorilerinden birisine dahil edilmiştir : 0 (boyanma yok), 1 (zayıf fakat kontrole göre görülebilir), 2 (boyanma belirgin), 3 (boyanma yoğun).

3.6. SDS - Poliakrilamid Jel Elektrofrez ve İmmuno Blot

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

Elektrofrezden önce numuneler 5 dakika 100 °C'de suda kaynatılmıştır. Örneklerin hedef proteinlerinin moleküler ağırlıklarına uygun olarak, TRAIL-L ve reseptörleri için % 10'luk poliakrilamid jeller hazırlanmıştır. BCA testine göre yapılmış protein konsantrasyonu hesaplamaları baz alınarak her bir antikor için yüklenecek protein konsantrasyonu belirlenmiştir. TRAIL-L, DR1, DR2, DR3, DR4 antikorları için 100µg protein yüklenmiştir. Her kuyucuğa 20 mikrolitre numune,

tankının içine yerleştirilmiştir. Mini protean sistem III tankına “yürütme solusyonu” eklenerek tank güç kaynağına bağlanmıştır. Proteinler güç kaynağı aracılığı ile 80 Volt, 30 Miliamperde 90-100 dakika elektroforez edilmiştir.

Bu sırada, PVDF membran (Biorad), üstte ve altta 3'er adet filtre kağıdı olacak şekilde sandviç biçiminde hazırlanmıştır. Jelde yürütülen proteinler, hazırlanan sandviçte PVDF membranın üzerine alınarak tekrar mini protean III sistemindeki tank blot içerisine alınmıştır. Mini protean III tankına “transfer solüsyonu” eklenerek +4 °C'de gece boyu proteinlerin membrana transfer olması sağlanmıştır. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, membran 1 saat süre ile oda ısında pH'sı 7.2-7.4 olan 0.14 mol/l tris tuz solüsyonu (TBS) ile hazırlanan ve ek olarak % 0.1 Tween-20 (Sigma) ilave edilen (TBS-T), %5 lik yağsız kuru süt tozu (Biorad) ile bloklanmıştır. Membranlar {(anti- TRAIL-L (1:50) , anti-DR1 (1:500) , anti-DR2 (1:500) , anti-DR3 (1:200) , anti-DR4 (1:200) } bloklama solüsyonu ile dilue edilmiş antikorlarla gece boyu, +4°C'de, karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 1 saat boyunca 5'er dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek, yıkama yapılmıştır. Membranlar, 1:5000 oranında bloklama solüsyonu ile dilue edilmiş, peroksidazla işaretlenmiş anti-fare IgG ve peroksidazla işaretlenmiş anti-tavşan IgG (Vector) sekonder antikoruyla oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında TBS-T ile 30 dakika boyunca 5'er dakikada bir TBS-T solüsyonu yenilenerek yıkama yapılmıştır. Membranlar SuperSignal Chemiluminisans (CL)-HRP substrat sistemi (Pierce) ile 5 dakika inkübe edildikten sonra karanlık oda içerisinde hiperfilme (Amersham Pharmacia Biotech) aktarılmıştır. Film görüntüleme amacıyla developer ve fiksatiften geçirilmiş ve distile su ile yıkanarak kurutulmuştur.

İnternal kontrol olarak(proteinlerin eşit yüklendiğini belirlemek için) , fare monoklonal Beta-aktin antikorı [Abcam, Kat No Ab6276] kullanılmıştır. Western blot sonuçlarının kantitatif değerlendirmelerini yapmak amacıyla DigiDoc 1000 programı kullanılmıştır.

3.7. TUNEL Metodu

Testis dokusundaki apoptoz, DNA iplikçiklerindeki kırılmaların TUNEL yöntemi ile enzimatik olarak işaretlenmesiyle belirlenmiştir. TUNEL metodu ile

üreticinin önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

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

TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan apoptotik hücrelerin testis dokusundaki sayısının belirlenmesi için her bir seminifer tübülde, TUNEL yöntemiyle pozitif boyanan apoptotik hücreler sayılmıştır. Değerlendirme yapılırken kesit düzeyi yuvarlak olan ve lümeni net olarak görünen seminifer tübüller dikkate alınmıştır. TUNEL pozitif sinyal taşıyan hücrelerin bulunduğu seminifer tübüllerin, testisteki toplam tübül sayısı oranı belirlenip 100 ile çarpılmış ve Apoptotik İndeks (AI) elde edilmiştir (Kondo, Shono et al. 2006).

3.8. İstatistiksel Analizler

Elde edilen tüm sonuçlar, Prism Version 3.0 (GraphPad Software Inc.) bilgisayar programı yardımı ile One Way Anova Testi ve Newman-Keuls testleri kullanılarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak anlamlılık derecesi p<0.05 olarak alınmıştır. 13 haftalık varikozel gruplarının sonuçları, kontrol ve sham grubu sonuçları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

BULGULAR

4.1.1. Testis Ağırlıkları ve Ven Çapları

Onüç haftalık varikozel modeli sonunda, kontrol sham ve varikozel grubundaki hayvanların her iki testis ağırlıkları, vücut ağırlıkları ve gonadal ven çapları ölçülmüştür. Varikozel grubundaki hayvanlarda ortalama sağ testis ağırlığında anlamlı değişiklik saptanmazken , sol testis ağırlığı anlamlı olarak azalmıştır. Varikozel grubundaki hayvanların gonadal ven çapları da kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak artmış saptanmıştır.($p<0,05$)

(Çizelge 4.1.1.)

	Kontrol (n:6)	Sham (n:6)	Varikozel (n:6)	p
Vücut ağırlığı (gr)	379,8±27,06 (340-416)	362,5±51,55 (290-425)	338,2±31,72 (290-381)	0,2002
Sağ testis ağırlığı (gr)	2,01±0,13 (1,86-2,19)	1,94±0,14 (1,80-2,15)	1,56±0,16 (1,35-1,85)	0,0002*
Sol testis ağırlığı (gr)	2,02±0,10 (1,94-2,17)	1,91±0,12 (1,80-2,10)	1,44±0,18 (1,10-1,60)	<0.0001*
Ven çapı (mm)	0,13±0,05 (0,10-0,20)	0,15±0,05 (0,10-0,20)	1,03±0,08 (1,0-1,2)	<0.0001*

Çizelge 4.1.1. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki hayvanların vücut ağırlığı, sol testis ağırlığı , sağ testis ağırlığı ve ven çaplarının istatistiksel değerlendirmesi Ortalama $\pm$ SD (* $p<0.05$).

4.2.Genel Görünüm

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

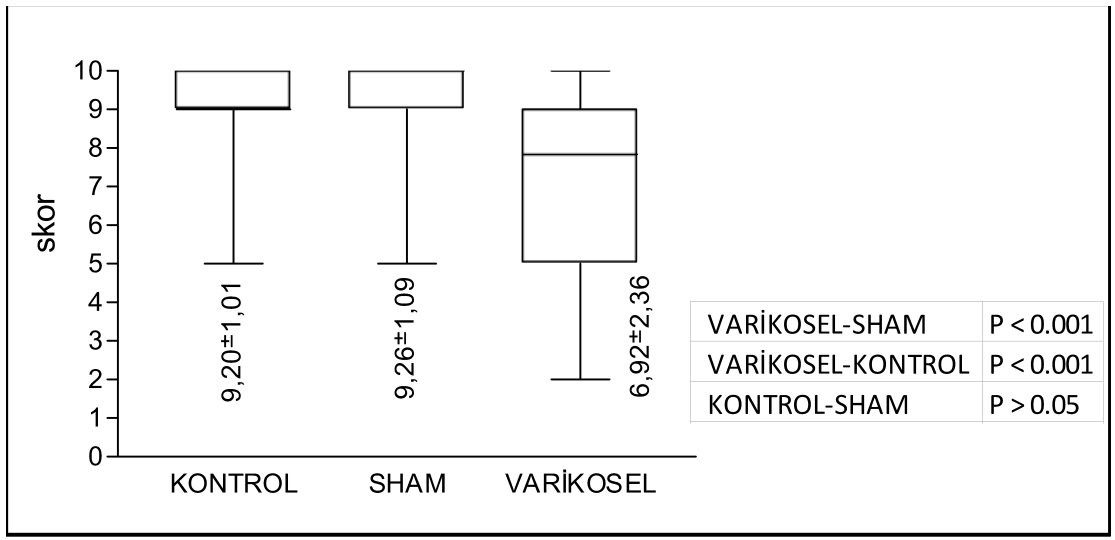
Kontrol ve sham gruplarına ait testis kesitleri incelendiğinde; tüm seminifer tübül evrelerindeki spermatogenik hücre tiplerinin normal şekilde düzenlendiği ve tübülün germinal epitelinin de tam ve bozulmamış olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kesit geneline bakıldığında hasarlı tübüllere kontrol ve sham gruplarında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

Varikozel gruplarına ait testis dokusu örneklerinde ise,sağlam tübüllerin yanı sıra sağlıklı,hasarlı tübüllere rastlandı.Örneğin ;bazı tübüllerde primer spermatosit evresinde duraklamış spermatogenez izlenirken bazı tübüllerde ise yuvarlak spermatid aşamasında duraklamış spermatogenez izlendi.Varikozel grubunda içinde germ hücresi olmayan sadece Sertoli hücresi içeren dejenere tübüllere rastlandı.

Tüm bu veriler deney modelimizin gerçekleştiğini ve varikozelin testis üzerinde patolojik etkisinin oluştuğunu kanıtladı. (Şekil 4.2.2). Bu hasarın derecesi Johnsen Skoru kriterlerine göre değerlendirildiğinde varikozel gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$) (Çizelge 4.2.1, Şekil 4.2.1).

GRUPLAR	Kontrol (n=6)	Sham (n=6)	Varikozel (n=6)
Johnsen Skoru	9.2 ± 1,01	9.2 ± 1,09	6,92 ± 2,36*
Değerlendirilen tübül sayısı	401 ± 33	413 ± 16	403 ± 31

Çizelge 4.2.1. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki kesitlerde değerlendirilen tübül sayıları Ve Johnsen Skorları ortalaması ± SD (* $p<0.05$).



Şekil 4.2.1. Kontrol, sham ve varikösel gruplarında Johnsen Skoru değerlendirilmesi
Ortalama $\pm$ SD (*p<0.05).



Şekil 4.2.2 Kontrol, sham ve varikösel gruplarına ait testis doku kesitlerinde HE boyası ile yapılan değerlendirmeye örnek olarak tübüllerin genel görünümleri (40X büyütme sahası)
(siyah oklar normal seminifer tübül yapısını, mavi oklar varikösel modeline bağlı hasarlı tübül yapısını göstermektedir.)

4.3. İmmünohistokimya

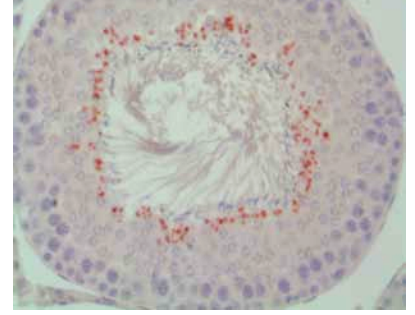
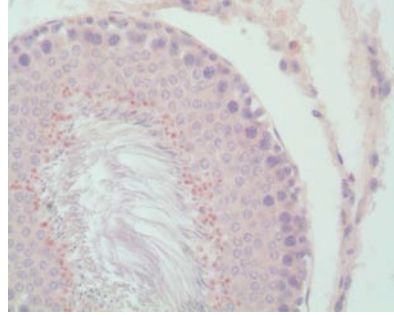
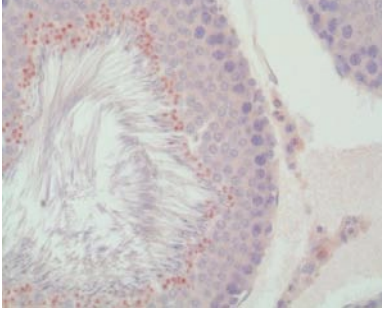
Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait sol testis kesitlerinde TRAIL-L , R1, R2,R3,R4 proteinlerinin ekspresyonları değerlendirilmiştir. (Şekil 4.3.1.)

K

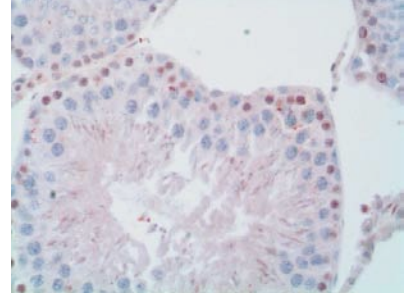
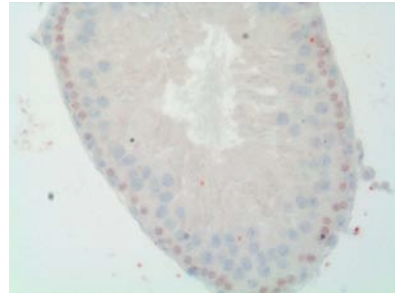
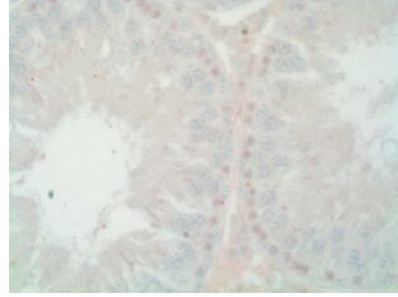
S

V

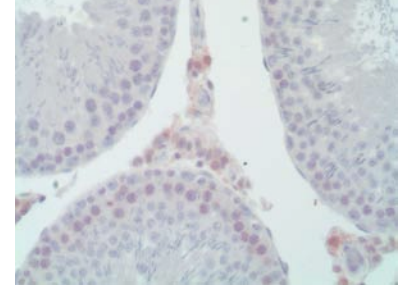
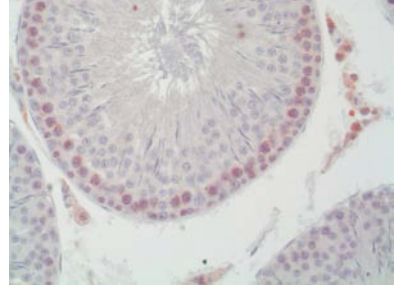
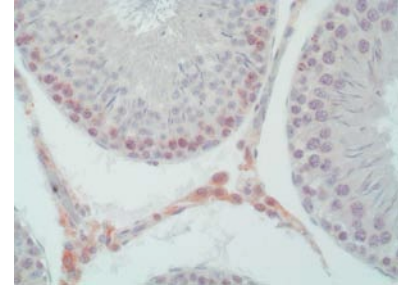
TRAIL-L



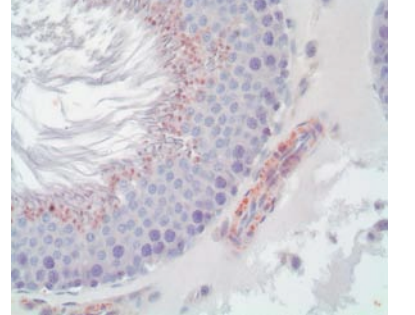
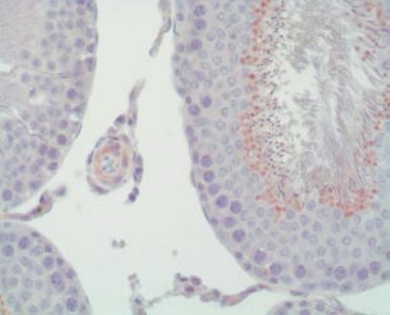
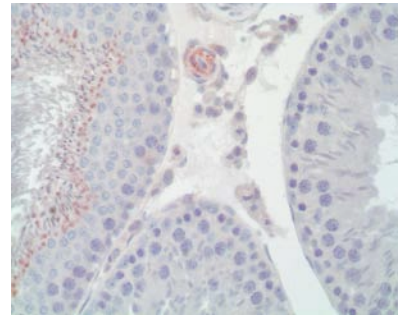
R-1



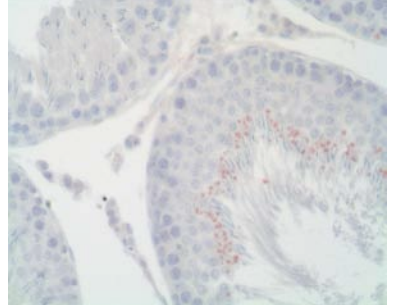
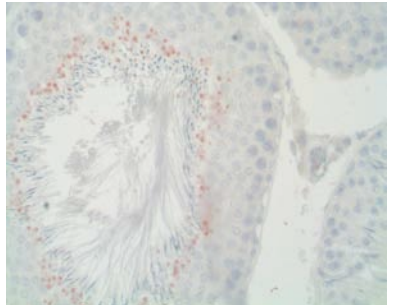
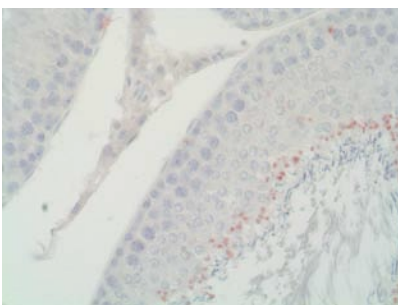
R-2



R-3



R-4



İmmunohistokimyasal incelemede; kontrol , sham ve varikozel grubundaki hayvanlarda TRAIL-L ve reseptörlerinin immunohistokimyasal yoğunluk skorları, dağılım oranları (% olarak) ve immunohistokimyasal boyanma skorları ayrı ayrı değerlendirilerek istatistiksel analizleri yapılmıştır. (Çizelge 4.2.2. , Çizelge 4.2.3. , Çizelge 4.2.4.)

	Kontrol (n:6)	Sham (n:6)	Varikozel (n:6)	p
R1	1,33±0,51 (1-2)	1,50±0,54 (1-2)	2,83±0,40 (2-3)	0,0002*
R2	2,16±0,40 (2-3)	2,50±0,54 (2-3)	1,66±0,51 (1-2)	0,0330*
R3	1,83±0,40 (1-2)	2,00±0,63 (1-3)	2,33±0,51 (2-3)	0,2770
R4	1,33±0,51 (1-2)	1,33±0,51 (1-2)	2,50±0,54 (2-3)	0,0019*
TRAIL-L	0,66±0,51 (0-1)	0,66±0,51 (0-1)	0,83±0,40 (0-1)	0,7911

Çizelge 4.2.2. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-L ve reseptörlerinin immunohistokimyasal yoğunluk skorları ortalaması ± SD (*p<0.05).

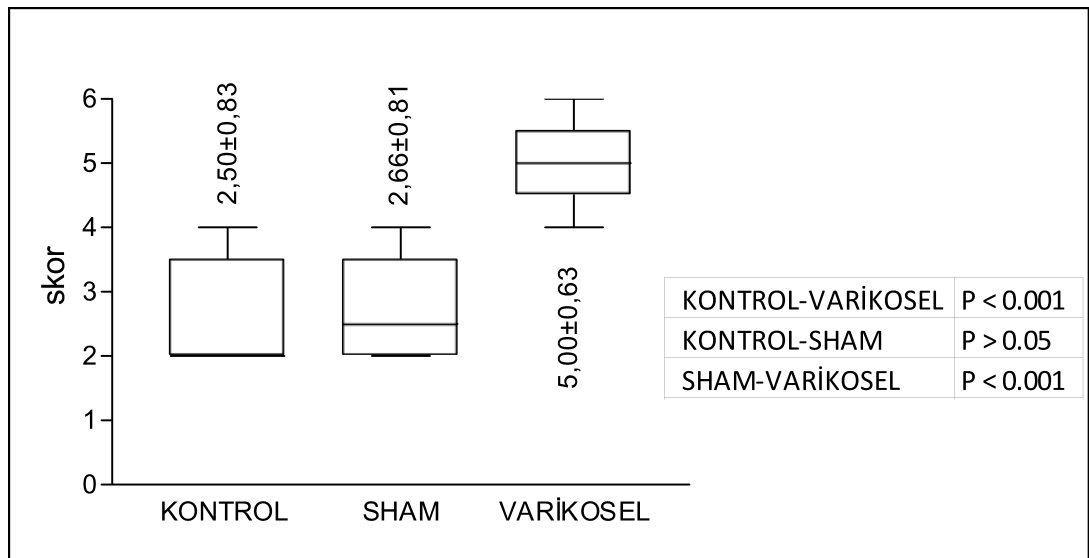
	Kontrol (n:6)	Sham (n:6)	Varikozel (n:6)	p
R1	27,50±8,21 (15-40)	30,00±8,94 (15-40)	59,17±6,64 (50-70)	<0.0001*
R2	49,17±6,64 (40-60)	54,17±6,64 (45-60)	40,00±8,94 (30-50)	0,0160*
R3	40,83±6,64 (30-50)	38,33±7,52 (30-50)	40,00±8,94 (30-50)	0,8525
R4	18,33±4,08 (15-25)	17,50±5,24 (10-25)	30,83±3,76 (25-35)	0,0001*
TRAIL	25,00±10,49 (15-40)	23,33±6,83 (15-35)	24,17±5,84 (15-30)	0,9369

Çizelge 4.2.3. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-L ve reseptörlerinin dağılımları (%) skorlaması ortalama± SD (*p<0.05).

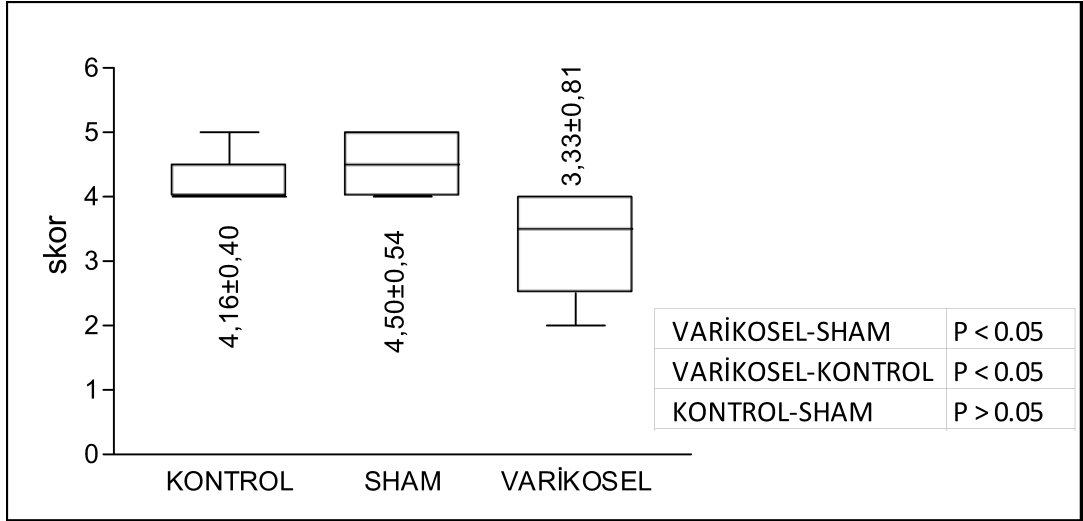
	Kontrol (n:6)	Sham (n:6)	Varikosek (n:6)	p
R1	2,50±0,83 (2-4)	2,66±0,81 (2-4)	5,00±0,63 (4-6)	<0.0001*
R2	4,16±0,40 (4-5)	4,50±0,54 (4-5)	3,33±0,81 (2-4)	0,0141*
R3	3,66±0,81 (2-4)	3,66±0,51 (3-4)	4,00±0,89 (3-5)	0,6872
R4	2,33±0,51 (2-3)	2,16±0,75 (1-3)	3,50±0,54 (3-4)	0,0036*
TRAIL	1,83±0,75 (1-3)	1,66±0,51 (1-2)	1,83±0,40 (1-2)	0,8480

Çizelge 4.2.4. Kontrol, sham ve varikosek grubundaki TRAIL-L ve reseptörlerinin immun boyanma skorlaması ortalama± SD (*p<0.05).

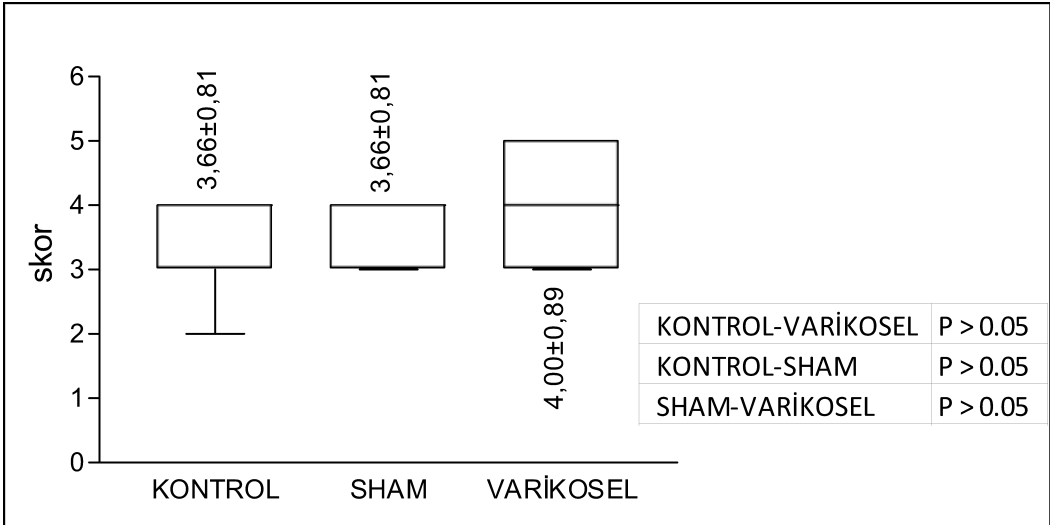
İmmun boyanma skorlarının istatistiksel analizlerini TRAIL-L ve reseptörler için ayrı ayrı grafiksel olarak gösterecek olursak;



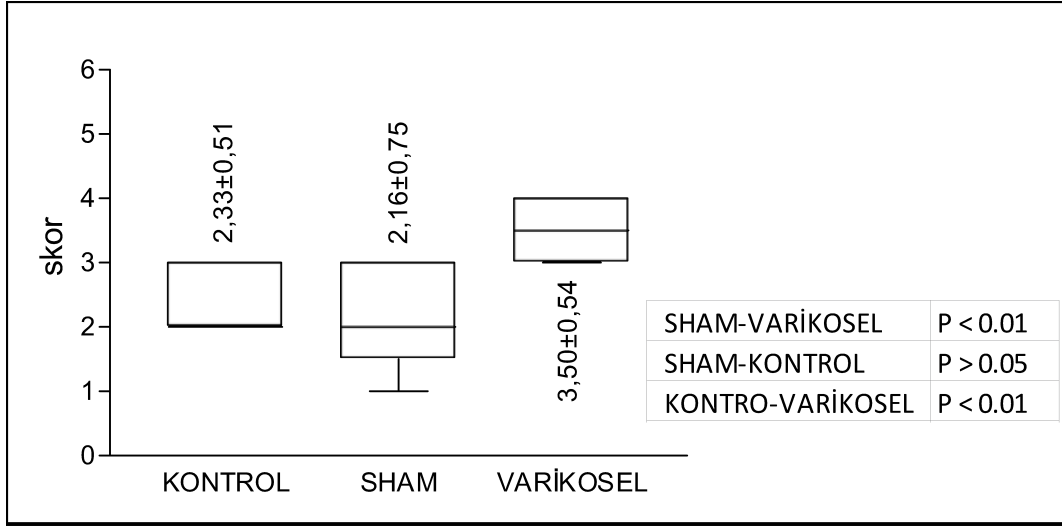
Şekil 4.3.2. Kontrol, sham ve varikosek grubundaki TRAIL-R1' in immun boyanma skorlaması ortalama± SD (*p<0.05).



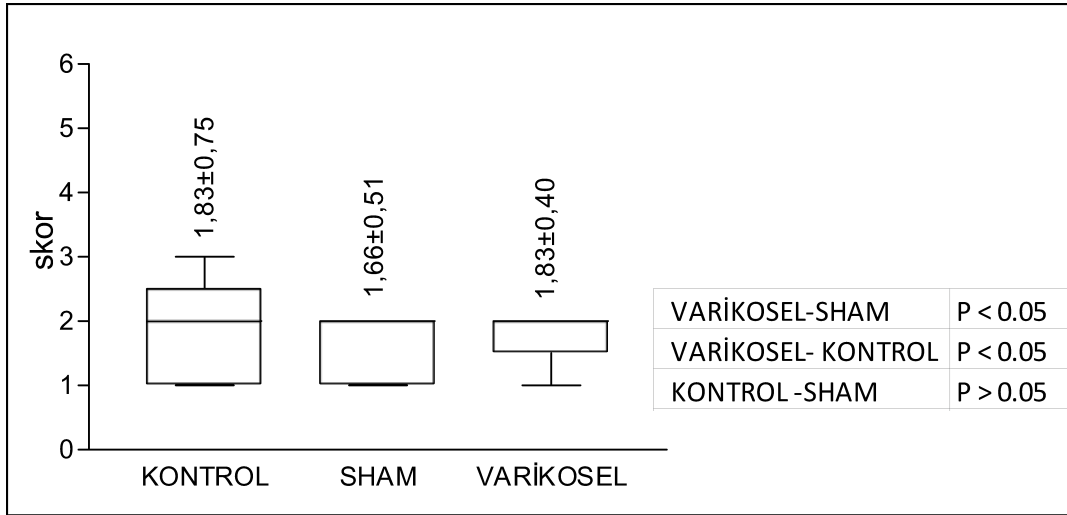
Şekil 4.3.3. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-R2' in immun boyanma skorlaması ortalama± SD (*p<0.05).



Şekil 4.3.4. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-R3' in immun boyanma skorlaması ortalama± SD (*p<0.05).



Şekil 4.3.5. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-R4' in immun boyanma skorlaması ortalama± SD (*p<0.05).



Şekil 4.3.6. Kontrol, sham ve varikozel grubundaki TRAIL-L' in immun boyanma skorlaması ortalama± SD (*p<0.05).

TRAIL-L; kontrol ($1,83 \pm 0,75$) ve sham grubunda ($1,66 \pm 0,51$) VIII. ve IX., X.cu evrelerdeki tübüllerin sitoplazmik artıklarında ve Leyding hücrelerinde izlenmiştir. TRAIL-L varikozel grubunda da aynı hücre gruplarında izlenmektedir. İstatiksel anlamlı artmış ekspresyonu görülmemiştir. ($1,83 \pm 0,40$) - ($p > 0,05$)

R1; ölüm reseptörü kontrol ($2,50 \pm 0,83$) ve sham grubunda ($2,66 \pm 0,81$), V. ve VI. evredeki tübüllerin spermatogoniumlarında, XI. evredeki spermatositlerde, VIII. evredeki sitoplazmik atıklarda izlenmiştir. R1 varikozel grubunda ($5,00 \pm 0,63$) istatiksel anlamlı artmış olarak görülmüştür. ($p < 0,05$)

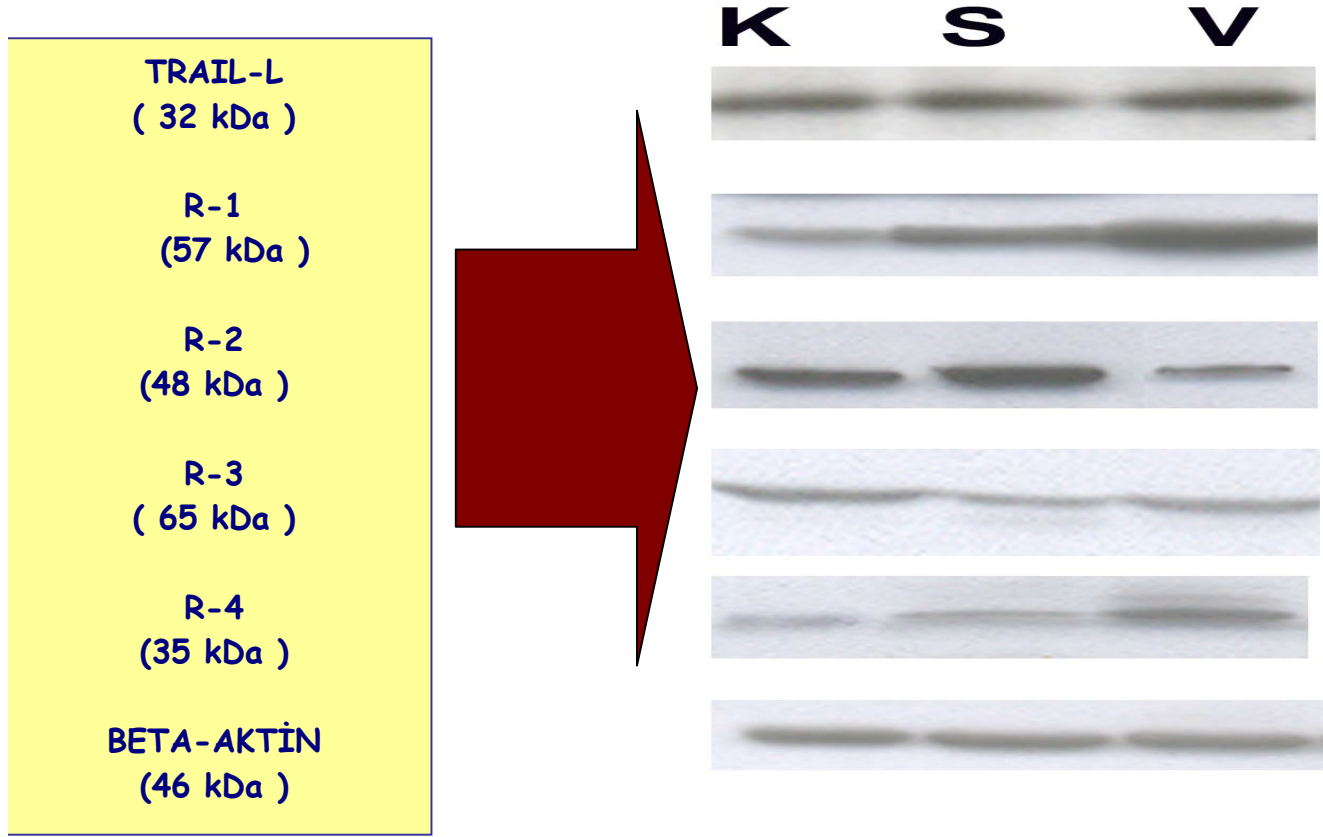
R2 ; kontrol ($4,16 \pm 0,40$) ve sham grubunda ($4,50 \pm 0,54$) Leydig hücrelerinde VIII. evre sitoplazmik atıklarda, V. ve VI. evre spermatositlerde izlenmiştir. R2 varikozel grubunda ($3,33 \pm 0,81$) da aynı hücre gruplarında izlenmiş olup; anlamlı azalmış olarak görülmüştür. ($p < 0,05$)

R3; kontrol ($3,66 \pm 0,81$) ve sham grubunda ($3,66 \pm 0,51$) VIII. evredeki sitoplazmik atıklarda, interstisyel alandaki damar duvarlarında boyanmış olup, varikozel grubunda ($4,00 \pm 0,89$) anlamlı değişiklik görülmemiştir. ($p > 0,05$)

R4; kontrol ($2,33 \pm 0,51$) ve sham grubunda ($2,16 \pm 0,75$) VIII. evre sitoplazma atıklarında izlenmiştir. Varikozel grubunda ($3,50 \pm 0,54$) da benzer bulgular görülmüş olup immün boyanma skoru varikozel grubunda anlamlı olarak artmıştır. ($p < 0,05$)

4.4. Western Blot Sonuçları

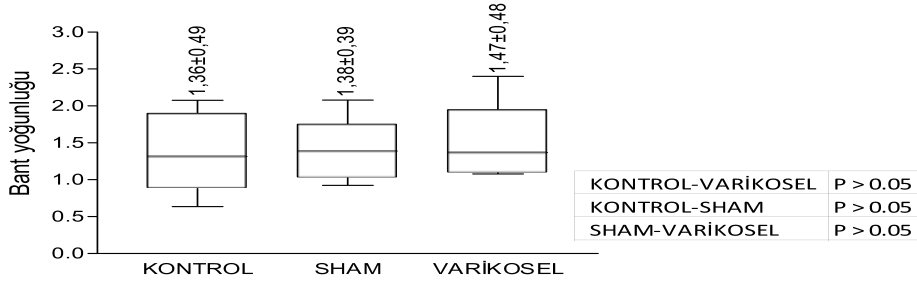
Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait dokulardaki TRAIL-L , R1, R2, R3, R4 proteinlerinin ekspresyon şiddetleri ölçülerek, internal kontrol olarak kullanılan Beta-aktin proteininin ekspresyon şiddetine oranlanmıştır. (Şekil 4.4.1 , Şekil 4.4.2. ,Çizelge 4.4.1.)



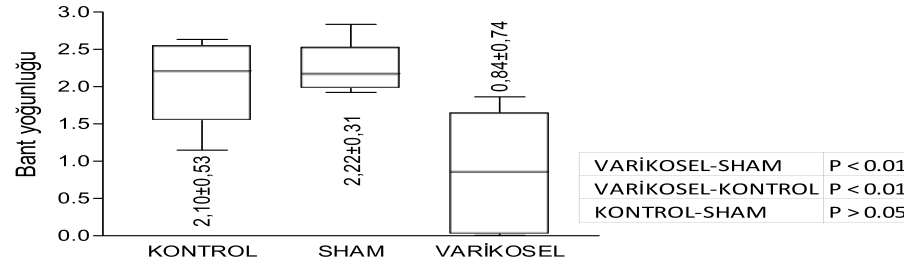
Şekil 4.4.1 Kontrol, sham ve varikozel gruplarına ait dokulardaki TRAIL-L , R1, R2, R3, R4 proteinlerinin ekspresyon şiddetlerinin Beta-Aktin protein ekspresyon şiddetine oranı.

Çizelge 4.4.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarındaki TRAIL-L, R1, R2, R3, R4 protein ekspresyonlarının şiddeti. Ortalama $\pm$ SD (*p<0.05).

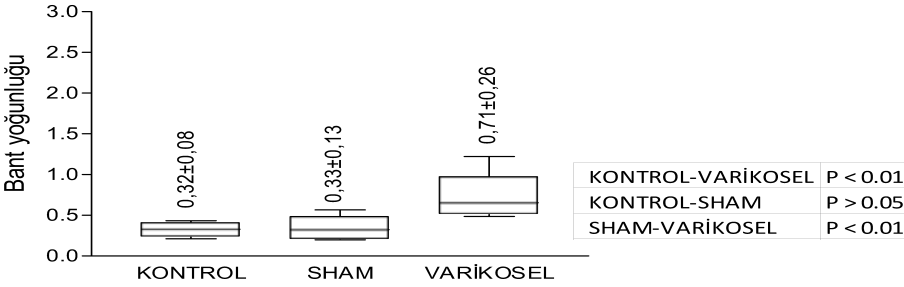
Proteinler	Kontrol (n:6)	Sham (n:6)	Varikozel (n:6)	p
R1	0,32 $\pm$ 0,08 (0,21-0,43)	0,33 $\pm$ 0,13 (0,19-0,56)	0,71 $\pm$ 0,26 (0,48-1,22)	0,0026*
R2	2,10 $\pm$ 0,53 (1,14-2,63)	2,22 $\pm$ 0,31 (1,92-2,83)	0,84 $\pm$ 0,74 (0,006-1,86)	0,0010*
R3	1,09 $\pm$ 0,52 (0,35-1,81)	1,11 $\pm$ 0,40 (0,72-1,80)	1,02 $\pm$ 0,49 (0,54-1,88)	0,9393
R4	0,26 $\pm$ 0,13 (0,15-0,48)	0,36 $\pm$ 0,14 (0,13-0,56)	1,06 $\pm$ 0,23 (0,78-1,33)	<0.0001*
TRAIL	1,36 $\pm$ 0,49 (0,63-2,07)	1,38 $\pm$ 0,39 (0,92-2,08)	1,47 $\pm$ 0,48 (1,07-2,40)	0,9184



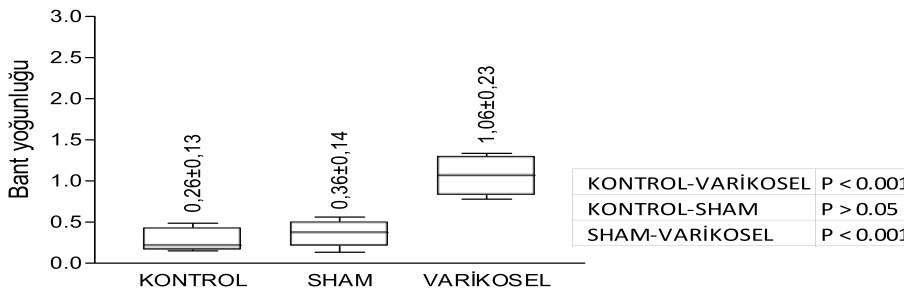
TRAIL-L ekspresyonu anlamlı olarak değişmemiştir. ($p>0,05$)



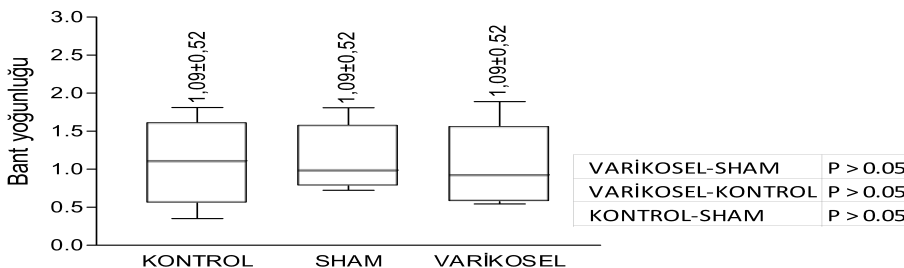
TRAIL-R1 ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır. ($p<0,05$)



TRAIL-R2 ekspresyonu anlamlı olarak azalmıştır. ($p<0,05$)



TRAIL-R3 ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır. ($p<0,05$)



TRAIL-R4 ekspresyonu anlamlı olarak değişmemiştir. ($p>0,05$)

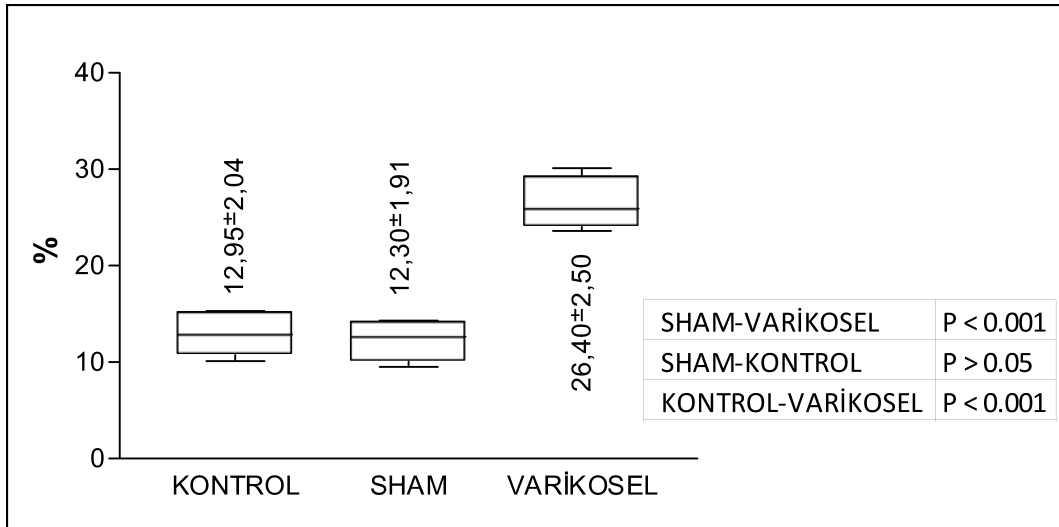
Şekil 4.4.2.:Kontrol,sham ve varikozel gruplarında TRAIL-L,TRAIL-R1,TRAIL-R2,TRAIL-R3,TRAIL-R4 'ün ekspresyon şiddetlerinin Beta-aktin ekspresyon şiddetine oranlanarak elde edilmiş ortalama değerleri Ortalama + SD (* $n<0.05$).

4.5. TUNEL Sonuçları

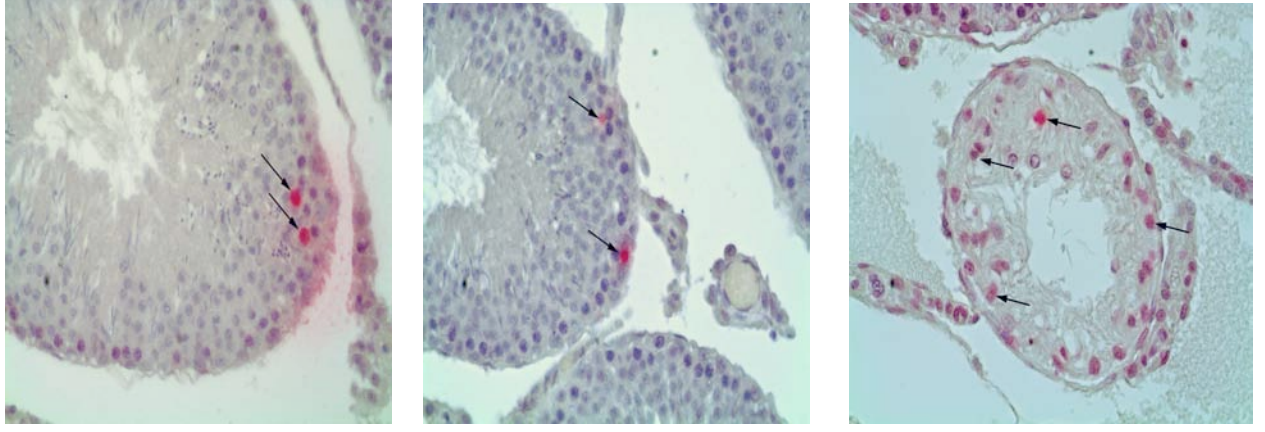
Kontrol, sham ve varikozel gruplarındaki apoptotik hücre indeksi karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.5.1. , Şekil 4.5.1. ,Şekil 4.5.2.). Varikozel gruplarında TUNEL pozitif hücrelerin anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir ($p<0.05$).

Çizelge 4.5.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarında apoptotik indeks (AI) yüzdesi.
Ortalama $\pm$ SD (* $p<0.05$).

Gruplar	AI (%)
Kontrol	12.9 $\pm$ 2,04
Sham	12,3 $\pm$ 1,91
Varikozel	26,4 $\pm$ 2.5*



Şekil 4.5.1. Kontrol, sham ve varikozel gruplarında apoptotik indeks (AI) yüzdesi ($p<0,05$)



Şekil 4.5.2 Kontrol,sham ve varikozel gruplarında TUNEL sonuçları:K:Kontrol,S:Sham,V:Varikozel,kırmızı sinyaller ve siyah oklar apoptotik hücreleri göstermektedir.(40X büyütme ile)

TARTIŞMA

Varikoselin ortaya çıkış sıklığı primer infertilitesi olan erkeklerde %20 ile %40 arasında iken, sekonder infertilitesi olan erkeklerde bu oran oldukça yükselmekte ve %80'lere kadar çıkmaktadır (Jarow 2001). Bu yüksek oranlar, varikoseli infertilitenin bilinen en önemli sebebi yapmaktadır. Dolayısıyla, son yıllarda varikoselin tedavisi ile ilgili araştırmalar oldukça artmakta ve dikkatler moleküler düzeyde yapılan çalışmalara çekilmektedir.

Varikosel doğal olarak (kendiliğinden) sadece insanlarda ve koçlarda meydana gelmektedir (Murray 1969; Watt 1978). Ancak, yapılan deneylerde insan materyalinin kullanımında karşılaşılan güçlükler araştırmacıları deneysel varikosel modeli oluşturmaya sevk etmiştir. Sol renal venin parsiyel ligasyonu ile oluşturulan deneysel varikosel modelleri histolojik olarak da incelenerek doğrulanmaktadır. Hayvan modelleriyle elde edilen önemli sonuçlar varikosel hakkında bilinmeyenlerin çoğunu aydınlatmıştır ve aydınlatmaya devam etmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda, varikosel sonucunda testiste ortaya çıkan olumsuz etkilerle ilişkili bağlantılar araştırılmaktadır.

Artan ısıнын apoptoz artışından sorumlu olduğunu gösteren çalışmalar olsa da, hipoksi-indükleyen faktör-1 α 'nın varikoselde belirlenmesi hipoksiyi en önemli faktör haline getirmiştir. p53 düzeyi, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve neoanjiyogenez, pro-inflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen türleri, nitrik oksit düzeyi ve lipid peroksidasyonunun artması ile anti-oksidan savunmanın azalması varikoselin sonuçlarındandır (Lee, Jeng et al. 2006). Bu nedenlerle, yapılan çoğu çalışma germ hücre apoptozunu desteklemektedir.

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

Bu çalışmada; son yıllarda önemli bir araştırma konusu olan ve hücre ölüm yollarıyla doğrudan ilişkisi bulunan TRAIL-L mekanizmasının ve varikosel patolojisinin ortak noktalarından yola çıkarak, TRAIL-L yolağının araştırılması

hedeflenmiştir. Bizim çalışmamızda, varikosel modeli başarılı bir şekilde oluşturulmuştur. Tübül hasarı, histopatolojik olarak belirlenmiştir. Histopatolojik değerlendirmelerde; primer spermatosit evresinde duraklamış tübüller, yuvarlak spermatid aşamasında duraklamış tübüller, sadece Sertoli hücrelerini içeren tübüller ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda TRAIL-L seviyesi değişmezken ,ölüm reseptörlerinden TRAIL-R1 artışı TRAIL-L ilişkili yolakların başlamasında etkili olabileceğini düşündürmektedir.Diğer bir ölüm reseptörü olan TRAIL-R2'nin azalması ise kendisinin tuzak reseptörü olan TRAIL-R4'ün artışı ile ilişkilendirilebilir. Bunun yanı sıra diğer ölüm reseptörü olan TRAIL-R1'in tuzak reseptörü TRAIL-R3'ün değişmemesi ise bu moleküldeki artışı destekler niteliktedir.

TRAIL-L miktarı değişmese bile ölüm reseptörü olan TRAIL-R1 'in artışı, ölümü indükleyen sinyal kompleksinin oluşarak bu yolağın varikosel patofizyolojisi ile olan ilişkisini işaret etmektedir.

Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak varikosel ile indüklenen testiküler patogeneizde TRAIL-L aracılı ölüm yollarının özellikle TRAIL-R1 üzerinden gerçekleştiği söylenebilir.Bunu destekleyen ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır ve bu yolağın alt sinyal yolları ile olan ilişkisinin araştırılması literatürde bilinen varikoseldeki apoptoz artış mekanizmasının aydınlatılmasına ışık tutacaktır. Bizim çalışmamız literatürde ilk defa TRAIL-L aracılı ölüm yollarının esasen TRAIL-R1 reseptörü üzerinden başlatılarak ilerleyebileceğini ortaya koymuştur.

Ayrıca, TUNEL sonuçlarımız da apoptoza giden hücre artışını göstererek bu bulguları desteklemiştir.

Sonuç olarak; TRAIL-L ve reseptörlerinin varikoselli testisteki rolünü değerlendiren bu çalışmanın, varikosel mekanizmasına moleküler düzeydeki katkısı oldukça önemlidir. Testisten elde edilen moleküler bilgiler, varikoselin spermatogeneze olan olumsuz etkilerinin giderilmesi amacıyla ileride kullanılması gündeme gelebilecek medikal tedaviler için temel oluşturmaktadır. Çalışmamız, varikoselde ortaya çıkan apoptotik süreçte TRAIL-L ve reseptörlerinin ilişkisini ilk defa ortaya koymuştur ve böylece TRAIL-L yolağının inhibisyonunun varikosel tedavisinde kullanılıp kullanılmaması ile ilgili tartışmaları başlatmıştır. Bütün bunlarla ilişkili olarak; deneysel varikosel modellerinde TRAIL veya DR4/DR5 inhibitörleri kullanarak, varikosel patogenezinin değerlendirilmesiyle ilgili çalışmaların yapılması gerekliliği gündeme gelmiştir.

ÖZET

Varikosel erkek infertilitesinin en önemli sebebi olarak gösterilmektedir, ancak testiküler disfonksiyonu ve infertiliteyi indükleyen varikoselin patogenetik mekanizması henüz anlaşılamamıştır. Varikoselin patofizyolojisinde rol oynayan mekanizmalar sonucunda testisin germ hücrelerinde apoptozis artmakta ve testiküler disfonksiyon ortaya çıkmaktadır. Testiküler disfonksiyonun ana etmenlerinden olan apoptoziste; sinyalizasyon mekanizmasında rol oynayan ve indüksiyon mekanizmasında da anahtar role sahip olan TRAIL-L ve reseptörlerinin, hücre membranı üzerindeki uyarımlarının varikosel patofizyolojisinde rol oynayan mekanizmalar sonucu artması ile birlikte testiküler disfonksiyona yol açan apoptozis sürecinin başladığını düşünmekteyiz. Bu sebeple apoptozis oluşumunda çoğu hücre üzerinde etkin rolü olan TRAIL-L ve reseptörlerinin varikosel patofizyolojisindeki rolünü bu çalışmada araştırmayı amaçlamaktayız. Eğer hipotezimiz doğru ise, farmakolojik ajanlar (TRAIL-L, DR1, DR2 inhibitörleri) tarafından bu yolağın inhibisyonu varikoselin medikal tedavisi için yeni bir terapötik yaklaşım sunabilir.

Yedi haftalık yetişkin *Rattus norvegicus* (Wistar) ırkı erkek sıçanlar rastgele olarak 3 gruba ayrılmıştır. 1.Grup sıçanların (13 haftalık, n=10) sol testislerinde deneysel varikosel modeli ve 2.Grup sıçanlarda sham operasyonu (n=10) gerçekleştirilmiştir. 3.Grup sıçanlar ise kontrol grubunu oluşturmuştur (n=10). Deneysel varikosel modelinin indüklenmesinden sonra tüm gruplardaki sıçanlar kurban edilmiştir. Sol testis dokularında; TRAIL-L ve reseptör proteinlerinin immünohistokimyasal ve western blot analizleri ile apoptozun belirlenmesi için TUNEL analizleri gerçekleştirilmiştir.

Varikosel oluşturulan testislerin ağırlıkları belirgin olarak azalmış ve bu testislerde seminifer tübül hasarı belirgin olarak artmıştır. Western blot analizleri TRAIL-L ve reseptörlerinin ekspresyonlarını ortaya koymuştur. İmmünohistokimya ve western blot analizleri sonucunda; TRAIL-L ve reseptörlerinin kontrol ve sham gruplarında ekspre olduğu, ancak varikosel gruplarındaki ekspresyon düzeylerinin değiştiği gözlenmiştir. Özellikle ölüm reseptörü olan DR1 ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır. Tüm bunlara ek olarak, varikoselli testislerde apoptotik germ hücre sayısı belirgin olarak artmıştır.

Sonuç olarak, varikosel nedeniyle testiste oluşan apoptoziste TRAIL yolağının aktive olduğu ve germ hücre apoptozunu indüklediği ilk defa ortaya konmuştur. Genellikle varikoselli bireyin ürettiği sperm hücrelerini değerlendiren literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında, bu çalışma, varikosel mekanizmasına moleküler düzeyde önemli bir katkı sağlamaktadır. Bütün bunlarla ilişkili olarak; deneysel varikosel modellerinde farmakolojik TRAIL-L, DR1, DR2 inhibitörleri kullanarak, varikosel patogenezinin TRAIL-L yolağı ve reseptörleri ile ilişkisinin değerlendirileceği çalışmaların planlanmasına hızla devam etmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Sıçan, varikosel, TRAIL-L, TRAIL reseptörleri, apoptoz

ABSTRACT

Adult varicocele has long been implicated as a major cause of male infertility. However, pathogenetic mechanisms by which varicocele induces testicular dysfunction and infertility are not fully understood. The pathophysiologic factors of varicocele effected by germ cells on the testis and increased apoptosis, testicular dysfunction. Apoptosis is one of the main pathophysiologic mechanism of testicular dysfunction. We aimed that TRAIL-L and its receptors which has keyrole of apoptosis signalization and induction mechanism on the cell tissue layer effected by ethiologic factors of varicocele starting testicular dysfunction with apoptosis. Thus, inhibition of these pathways by pharmacological agents may represent a novel therapeutic approach for the medical treatment of varicocele. Animals, which were 7-weeks-old, were randomly separated into three groups. First group rats were used as control group (n:10), second group rats underwent a sham operation (n:10) and third group rats were used for experimental groups and underwent partial ligation of renal vein (n:10). Rats in all groups were sacrificed after induction of experimental varicocele. Western blot and immunohistochemical analysis of TRAIL-L and receptors in left testicular tissues were done. TUNEL analysis was performed for apoptotic cell evaluation.

The tissue weights of varicocele induced testes decreased significantly, whereas, tubule degeneration was significant in these testes. Western blot analyses have confirmed increased apoptosis in varicocele groups. Both western blot and immunohistochemical analysis have confirmed that TRAIL-L and receptors expressions changed in all germ cell types. Especially DR1 expression increased significantly. Moreover, the ratio of apoptotic germ cells in varicocele groups were significantly higher when compared to control and sham groups.

By evaluating the role of TRAIL pathway in varicocele testes, this study contributes very much to molecular mechanisms of varicocele pathogenesis when compared to studies that generally evaluate the sperm cells of varicocele patients. Studies regarding the effects of pharmacological TRAIL-L, DR1, DR2 inhibition to experimental varicocele are in progress in our laboratory.

Key words: Rat, varicocele, TRAIL-L, TRAIL receptors, apoptosis

KAYNAKLAR

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

11. Benoff SH, Millan C, Hurley IR, Napolitano B, Marmar JL. Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium in infertile men with left varicocele. *Hum Reprod* 2004;19(3):616-27.
12. Barbieri ER, Hidalgo ME, Venegas A, Smith R, Lissi EA. Varicocele-associated decrease in antioxidant defenses. *J Androl* 1999;20(6):713-7.
13. Meucci E, Milardi D, Mordente A, et al. Total antioxidant capacity in patients with varicoceles. *Fertil Steril* 2003;79 Suppl 3:1577-83.
14. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 1999;161(6):1831-4.
15. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000;73(3):459-64.
16. Zini A, Defreitas G, Freeman M, Hechter S, Jarvi K. Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. *Fertil Steril* 2000;74(3):461-4.
17. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update* 2003;9(4):331-45.
18. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59(5):1037-46.
19. Wiley S.R. et al (1995) *Immunity* 3,673-82
20. Wiley, S.R. et al. (1995) *Immunity* 3, 673-82.
21. Pitti, R.M. et al. (1996) *J Biol Chem* 271, 12687-90.

22. Almasan, A. and Ashkenazi, A. Cytokine Growth Factor Rev 14, 337-48.
23. Pan, G. et al. (1997) Science 276, 111-3.
24. Walczak, H. et al. (1997) EMBO J 16, 5386-97.
25. MacFarlane, M. et al. (1997) J Biol Chem 272, 25417-20.
26. Chaudhary, P.M. et al. (1997) Immunity 7, 821-30.
27. Schneider, P. et al. (1997) FEBS Lett 416, 329-34.
28. Shetty, S. et al. (2002) Apoptosis 7, 413-20.
29. Sheridan, J.P. et al. (1997) Science 277, 818-21.
30. Degli-Esposti, M.A. et al. (1997) J Exp Med 186, 1165-70.
31. MacFarlane, M. et al. (1997) J Biol Chem 272, 25417-20.
32. Schneider, P. et al. (1997) FEBS Lett 416, 329-34.
33. Pan, G. et al. (1998) FEBS Lett 424, 41-5.
34. Marsters, S.A. et al. (1997) Curr Biol 7, 1003-6.
35. Kelley, S.K. et al. (2001) J Pharmacol Exp Ther 299, 31-8.
36. Walczak, H. et al. (1999) Nat Med 5, 157-63.
37. Ashkenazi, A. et al. (1999) J Clin Invest 104, 155-62.
38. Jarow JP. Effects of Varicocele on male Infertility. Hum Reprod Update 2001;7(1):59-64

39. April EW. NMS Klinik Anatomi; 1998.
40. Fretz PC, Sandlow JI. Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. Urol Clin North Am 2002;29(4):921-37.
41. Pettersson S, Soderholm B, Persson JE, Eriksson S, Fritjofsson A. Testicular blood flow in man measured with venous occlusion plethysmography and xenon133. Scand J Urol Nephrol 1973;7(2):115-9.
42. Steinberger E, Tjioe DY. Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. Fertil Steril 1969;20(4):639-49.
43. Chehval MJ, Purcell MH. Deterioration of semen parameters over time in men with untreated varicocele: evidence of progressive testicular damage. Fertil Steril 1992;57(1):174-7.
44. Silber SJ. Microsurgical aspects of varicocele. Fertil Steril 1979;31(2):230-2.
45. Shafik A, Moftah A, Olfat S, Mohi-el-Din M, el-Sayed A. Testicular veins: anatomy and role in varicocelogenesis and other pathologic conditions. Urology 1990;35(2):175-82.
46. Harrison RJ. The vascular supply to the human testis. J Anat 1949;83(Pt. 1):61.
47. Bayard F, Boulard PY, Huc A, Pontonnier F. Arterio-venous transfer of testosterone in the spermatic cord of man. J Clin Endocrinol Metab 1975;40(2):345-6.
48. Agger P. Scrotal and testicular temperature: its relation to sperm count before and after operation for varicocele. Fertil Steril 1971;22(5):286-97.
49. Gökçimen DA. Erkek Genital Sistem Histolojisi. In: Histoloji ve Embriyoloji Ders Sunusu. SDÜ Tıp Fakültesi, Isparta; 2008.
50. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi "Patolojiye Giriş". Ankara:

Palme Yayınevi; 2007.

51. Noske HD, Weidner W. Varicocele--a historical perspective. *World J Urol* 1999;17(3):151-7.
52. Kendirci M BU, Miroğlu C. Andrologic surgery of the 15th century. In *Cerrahiyyetü'l Haniyye. The History of Male-Female Sexuality and Fertility in Asia Minor (Today's Turkey)*. İstanbul; 2003.
53. Kursh ED. What is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril* 1987;48(3):510-1.
54. Hargreave TB. Varicocele--a clinical enigma. *Br J Urol* 1993;72(4):401-8.
55. Hendry WF, Sommerville IF, Hall RR, Pugh RC. Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol* 1973;45(6):684-92.
56. Cockett AT, Takihara H, Cosentino MJ. The varicocele. *Fertil Steril* 1984;41(1):5-11.
57. Nieschlag E, Hertle L, Fischedick A, Behre HM. Treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod* 1995;10(2):347-53.
58. Gorelick JJ, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* 1993;59(3):613-6..
59. Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED, Jr. Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 1981;68(1):39-45.
60. Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP. Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. *J Urol* 1994;152(2 Pt 2):788-90.
61. J O. Varicoceles in children and adolescents. *Scand J Urol Nephrol* 1973;5:27-32.

62. Akbay E, Cayan S, Doruk E, Duce MN, Bozlu M. The prevalence of varicocele and varicocele-related testicular atrophy in Turkish children and adolescents. *BJU Int* 2000;86(4):490-3.
63. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001;7(5):473-81.
64. Kohler FP. On the etiology of varicocele. *J Urol* 1967;97(4):741-2.
65. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N, Fritjofsson A. Phlebography in varicocele scroti. *Acta Radiol Diagn (Stockh)* 1966;4(5):517-28.
66. Coolsaet BL. The varicocele syndrome: venography determining the optimal level for surgical management. *J Urol* 1980;124(6):833-9.
67. 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.
68. Dennison AR, Tibbs DJ. Varicocele and varicose veins compared. A basis for logical surgery. *Urology* 1986;28(3):211-7.
69. Wishahi MM. Detailed anatomy of the internal spermatic vein and the ovarian vein. Human cadaver study and operative spermatic venography: clinical aspects. *J Urol* 1991;145(4):780-4.
70. Grillo-Lopez AJ. Primary right varicocele. *J Urol* 1971;105(4):540-1.
71. Dubin L, Amelar RD. Varicocelectomy: 986 cases in a twelve-year study. *Urology* 1977;10(5):446-9.
72. Hargreave TB. Debate on the pros and cons of varicocele treatment--in favour of varicocele treatment. *Hum Reprod* 1995;10 Suppl 1:151-7.
73. Comhaire F, Zalata A, Schoonjans F. Varicocele: indications for treatment. *Int J Androl* 1995;18 Suppl 2:67-71.

74. Etriby AA, Ibrahim AA, Mahmoud KZ, Elhaggar S. Subfertility and varicocele. I. Venogram demonstration of anastomosis sites in subfertile men. *Fertil Steril* 1975;26(10):1013-7.
75. Tanji N, Fujiwara T, Kaji H, Nishio S, Yokoyama M. Histologic evaluation of spermatic veins in patients with varicocele. *Int J Urol* 1999;6(7):355-60.
76. 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.
77. Salama N, Bergh A, Damber JE. The changes in testicular vascular permeability during progression of the experimental varicocele. *Eur Urol* 2003;43(1):84-91.
78. Sigman M. Male infertility. *Med Health R I* 1997;80(12):406-9.
79. Turner TT, Brown KJ, Spann CL. Testicular intravascular volume and microvessel mitotic activity: effect of experimental varicocele. *J Androl* 1993;14(3):180-6.
80. 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.
81. Hurt GS, Howards SS, Turner TT. Repair of experimental varicoceles in the rat. Long-term effects on testicular blood flow and temperature and cauda epididymidal sperm concentration and motility. *J Androl* 1986;7(5):271-6.
82. 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.
83. 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.

- 84.** Sharpe RM. Intratesticular factors controlling testicular function. *Biol Reprod* 1984;30(1):29-49.
- 85.** Lipshultz LI, Corriere JN, Jr. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol* 1977;117(2):175-6.
- 86.** Dahl HV HJ. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg Gynecol Obstet* 1959;108:697-705.
- 87.** Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *Int J Androl* 1995;18(4):169-84.
- 88.** Zorgniotti AW, Macleod J. Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril* 1973;24(11):854-63.
- 89.** Goldstein M, Eid JF. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. *J Urol* 1989;142(3):743-5.
- 90.** Mieusset R, Bujan L, Mondinat C, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril* 1987;48(6):1006-11.
- 91.** Lund L, Nielsen KT. Varicocele testis and testicular temperature. *Br J Urol* 1996;78(1):113-5.
- 92.** Salisz JA, Kass EJ, Steinert BW. The significance of elevated scrotal temperature in an adolescent with a varicocele. *Adv Exp Med Biol* 1991;286:245-51.
- 93..** Wright EJ, Young GP, Goldstein M. Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology* 1997;50(2):257-9.
- 94.** Lerchl A, Keck C, Spiteri-Grech J, Nieschlag E. Diurnal variations in scrotal temperature of normal men and patients with varicocele before and after treatment. *Int J Androl* 1993;16(3):195-200.

95. Sofikitis N, Miyagawa I. Left adrenalectomy in varicocelized rats does not inhibit the development of varicocele-related physiologic alterations. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1993;38(4):250-5.
96. Shafik A, Wali MA, Abdel Azis YE, et al. Experimental model of varicocele. *Eur Urol* 1989;16(4):298-303.
97. Nishiyama H, Danno S, Kaneko Y, et al. Decreased expression of cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) in male germ cells at elevated temperature. *Am J Pathol* 1998;152(1):289-96.
98. Namiki M, Nakamura M, Okuyama A, et al. Influence of temperature on the function of Sertoli and Leydig cells of human testes. *Fertil Steril* 1987;47(3):475-80.
99. 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.
100. 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.
101. Hsu HS, Wei YH, Li AF, Chen MT, Chang LS. Defective mitochondrial oxidative phosphorylation in varicocele-bearing testicles. *Urology* 1995;46(4):545-9.
102. Shafik A. Venous tension patterns in cord veins. II. After varicocele correction. *J Urol* 1983;129(4):749-51.
103. Turner TT, Lopez TJ. Effects of experimental varicocele require neither adrenal contribution nor venous reflux. *J Urol* 1989;142(5):1372-5.
104. Comhaire F, Vermeulen A. Varicocele sterility: cortisol and catecholamines. *Fertil Steril* 1974;25(1):88-95.

105. Steeno O, Koumans J, De Moor P. Adrenal cortical hormones in the spermatic vein of 95 patients with left varicocele. *Andrologia* 1976;8(2):101-4.
106. Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology* 1989;124(6):3043-9.
107. Rajfer J, Turner TT, Rivera F, Howards SS, Sikka SC. Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. *Biol Reprod* 1987;36(4):933-7.
108. Turner TT, Lopez TJ. Testicular blood flow in peripubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to the unilateral lesion. *J Urol* 1990;144(4):1018-21.
109. Ghosh PK, York JP. Changes in testicular testosterone and acid and alkaline phosphatase activity in testis and accessory sex organs after induction of varicocele in Noble rats. *J Surg Res* 1994;56(3):271-6.
110. Sofikitis N, Miyagawa I. Bilateral effect of unilateral varicocele on testicular metabolism in the rabbit. *Int J Fertil Menopausal Stud* 1994;39(4):239-47.
111. Kazama T. [Effect of experimental left varicocele on rat Leydig cell function]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 1995;86(2):308-15.
112. Cayan S, Kadioglu A, Orhan I, Kandirali E, Tefekli A, Tellaloglu S. The effect of microsurgical varicocelectomy on serum follicle stimulating hormone, testosterone and free testosterone levels in infertile men with varicocele. *BJU Int* 1999;84(9):1046-9.
113. Hudson RW. Free sex steroid and sex hormone-binding globulin levels in oligozoospermic men with varicoceles. *Fertil Steril* 1996;66(2):299-304.
114. Kass EJ, Freitas JE, Salisz JA, Steinert BW. Pituitary gonadal dysfunction in

adolescents with varicocele. *Urology* 1993;42(2):179-81.

115. Sirvent JJ, Bernat R, Navarro MA, Rodriguez Tolra J, Guspi R, Bosch R. Leydig cell in idiopathic varicocele. *Eur Urol* 1990;17(3):257-61.
116. Su LM, Goldstein M, Schlegel PN. The effect of varicocelectomy on serum testosterone levels in infertile men with varicoceles. *J Urol* 1995;154(5):1752-5.
117. Swerdloff RS, Walsh PC. Pituitary and gonadal hormones in patients with varicocele. *Fertil Steril* 1975;26(10):1006-12.
118. Schiff I, Wilson E, Newton R, et al. Serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and testosterone responses to gonadotropin-releasing factor in males with varicoceles. *Fertil Steril* 1976;27(9):1059-61.
119. Hudson RW, McKay DE. The gonadotropin response of men with varicoceles to gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 1980;33(4):427-32.
120. Hudson RW, Crawford VA, McKay DE. The gonadotropin response of men with varicoceles to a four-hour infusion of gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 1981;36(5):633-7.
121. Hudson RW, Perez-Marrero RA, Crawford VA, McKay DE. Hormonal parameters of men with varicoceles before and after varicocelectomy. *Fertil Steril* 1985;43(6):905-10.
122. Segenreich E, Shmueli H, Singer R, Servadio C. Andrological parameters in patients with varicocele and fertility disorders treated by high ligation of the left spermatic vein. *Int J Fertil* 1986;31(3):200-3.
123. Comhaire F, Vermeulen A. Plasma testosterone in patients with varicocele and sexual inadequacy. *J Clin Endocrinol Metab* 1975;40(5):824-9.
124. Fujisawa M, Hayashi A, Imanishi O, et al. The significance of gonadotropin-releasing hormone test for predicting fertility after varicocelectomy. *Fertil*

Steril 1994;61(4):779-82.

125. Hadziselimovic F, Leibundgut B, Da Rugna D, Buser MW. The value of testicular biopsy in patients with varicocele. *J Urol* 1986;135(4):707-10.
126. Jarow JP, Sanzone JJ. Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol* 1992;148(6):1805-7.
127. Cameron DF, Snyder FE. The blood-testis barrier in men with varicocele: a lanthanum tracer study. *Fertil Steril* 1980;34(3):255-8.
128. Turner TT, Jones CE, Roddy MS. Experimental varicocele does not affect the blood-testis barrier, epididymal electrolyte concentrations, or testicular blood gas concentrations. *Biol Reprod* 1987;36(4):926-32.
129. 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.
130. Golomb J, Vardinon N, Homonnai ZT, Braf Z, Yust I. Demonstration of antispermatozoal antibodies in varicocele-related infertility with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Fertil Steril* 1986;45(3):397-402.
131. 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.
132. 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.
133. 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.
134. Benoff S CG, Hurley IR Calcium-ion channel blockers and sperm

fertilization. Assist Reprod Rev 1995;5:2-13.

- 135.** Benoff S, Hurley IR, Barcia M, Mandel FS, Cooper GW, Hershlag A. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. Fertil Steril 1997;67(2):336-47.
- 136..** Rudin CM and Thompson C.B.: Apoptosis ana disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. Annu Rev. Med; 1997: 48, 267-281
- 137.** Ashkenazi, A. And Dixit, V.M. Death receptors: Signaling and modulation. Science; 1998: 281, 1305-1308.
- 138.** Gren, D.R. and Reed , J.C., Mitochondria and apoptosis. Science; 1998. 281:1309-1312
- 139.** Widlak P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. Acta Biochim. Pol.; 2000; 47(4), 1037–1044
- 140.** Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and ist relatives. Trends Cell Biol 2001;11(9): 372-7.
- 141.** Porter AG. Protein translocation in apoptosis. Trends Cell Biol 1999;9:394-401.
- 142.** Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. N Engl J Med 1996; 334:1717-25
- 143.** Nagata S. Fas-mediated apoptosis. In: Gorin N, Foa R, MannucciPM(eds). "EducationProgramme1996 - Meet the Expert Sessions of the 2nd Meeting of the European Haematology Association, 29 May–1 June, Paris, France", Blackwell Science Ltd, Glasgow,1996: 61-2.
- 144.** Ivy SP, Lugo TG, Bernstein ML, Smith MA. Evolving molecular and targeted therapies. In: Pizzo PA, Poplack DG(eds): Principles and Practice of Pediatric Oncology. Fourthedition, Lippincott-Williams&Wilkins, Philadelphia, 2002; pp309
- 145.** Gren, D.R. and Reed , J.C., Mitochondria and apoptosis. Science; 1998. 281:1309-1312
- 146.** Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., and Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. Cell; 1996: 86:147–15769
- 147.** Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M.,Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature; 1999. 397: 441–446.
- 148.** Du C., Fang M., Li Y., Li L., and Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell; 2000: 102: 33–42

- 149.** Verhagen A.M., Ekert P.G., Pakusch M., Silke J., Connolly L.M., Reid G.E., Moritz R.L., Simpson R.J., and Vaux D.L. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*; 2000;02: 43–53
- 150.** Li K., Li Y., Shelton J.M., Richardson J.A., Spencer E., Chen Z.J., Wang X., and Williams R.S. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 2000. 101: 389–399
- 151.** Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. Mitochondrion as a novel target chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1042-5
- 152.** Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000;10:369-77.
- 153.** Nasr P, Gursahani HI, Pang Z, Bandana V, et al. Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid. *Neurochem Int* 2003;43: 89-99.
- 154.** Cohen I, Castedo M, Kroemer G. Tantalizing Thanatos: unexpected links in death pathways. *Trends Cell Biol* 2002;12(7):293-5
- 155.** Lepik D, Jaks V, Kadaja L, Värvi S, Maimets T. Electroporation and carrier DNACause p53 activation, cell cycle arrest, and apoptosis. *Anal Biochem* 2003;318:52-9
- 156.** Rostovtseva TK, Antonsson B, Suzuki M, Youle RJ, Colombini M, Bezrukov SM. Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. *J Biol Chem.* 2004 Apr 2;279(14):13575– 83
- 157.** Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491–501.
- 158.** Luo X., Budihardjo I., Zou H., Slaughter C., and Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*; 1998. 94: 481–490
- 159.** Sprick M. R., & Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004: 1644(2/3), 125–132
- 160.** Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39 (7-8):1462-75.
- 161.** Deng Yibin, Lin Y., and Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes and Development.* 2002
- 162.** Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipshultz LI, Kim ED.
Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 1997;158(5):1791-3.
- 163.** 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.

- 164.** 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.
- 165.** 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.
- 166.** Brinkworth MH, Weinbauer GF, Bergmann M, Nieschlag E. Apoptosis as a mechanism of germ cell loss in elderly men. *Int J Androl* 1997;20(4):222-8
- 167.** 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.
- 168.** 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.
- 169.** Arama E, Agapite J and Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell* 2003; 4: 687-697.
- 170.** Said TM, Paasch U, Glander HJ and Agarwal A. Role of caspases in male infertility. *Hum Reprod* 2004; 10: 39-51.
- 171.** Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU et al. Apoptosis Regulation in the Testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development*. 56: 353-359, 2000.
- 172.** Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol*. 86: 598-606, 2000.

173. Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 95: 825-830, 1992.
174. 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.
175. 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.
176. Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 1996;28(4):587-96
177. Davis JR, Firlit CF. The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril*. 1986;17: 187-200.
178. Heiskanen P, Billig H, Toppari J et al. Apoptotic Cell Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*. 1996; 40: 351-356.
179. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr*. 1999; 61:393-399.
180. Yin Y, Hawkins K L, Devvolf W C, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl*. 1997; 18: 159-165.
181. Adams JM and Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326.
182. Fujisawa M, Hiramane T and Kamidono S. Decrease of apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol* 1999; 17: 296-300.
183. Caruso A, Walsh R, Ross L, Trummer H and Meacham R. Experimental varicocele induces testicular germ cell apoptosis in the rat. *J Urol* 1999; 161: 280 (A: 1083).
184. Brill A, Torchinsky A, Carp H et al. The role of apoptosis in normal and abnormal embryonic development. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16: 512-519.
185. Lee J, Richburg JH, Shipp EB et al. The fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis is differentially up-regulated in Sertoli versus germ cell injury of the testis. *Endocrinol* 1999; 140: 852-858.
186. Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.

187. Wiley SR., Schooley K., Smolak P.J., et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*; 1995;3, 373-382
188. Pan G., O'Rourke K., Chinnaian A.M., Gentz R., Ebner R., Ni J., and Dixit V.M. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*; 1997;276: 111-113.
189. Fanger NA, Maliszewski CR, Schootey K, Grifith TS, Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Exp Med*. 1999;190:1155–1164 71
190. Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med*. 1999;189:1343–1354
191. Halaas O, Vik R, Ashkenazi A, Espevik T. Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scand J Immunol*. 200;51:244-250
192. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Okamura K, Yagita H. Expression and function of the TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *J Immunol* 1999;163:1906- 1913
193. French L.E. and Tschoop J. the TRAIL to selective tumor death. *Nat. Med*. 1999;5: 146-147.
194. Pan G., Ni J., Wei Y. F., Yu G., Gentz R., & Dixit V. M An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*; 1997: 277(5327), 815–818
195. Screaton G. R., Mongkolsapaya J., Xu X. N., Cowper A. E., McMichael A. J., & Bell J. I. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr. Bio*;1997;7(9), 693–696
196. Sheridan J. P., Marsters S. A., Pitti R. M., Gurney A., Skubatch M., Baldwin D., et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*; 1997;277(5327), 818–821

- 197.** Kimberley F. C., & Screaton G. R. Following a TRAIL: Update on a ligand and its five receptors. *Cell Res*; 2004; 14(5), 359–372

- 198.** Degli-Esposti, M. To die or not to die—The quest of the TRAIL receptors. *J. Leukoc. Biol*; 1999, 65(5), 535–542

- 199.** Emery J. G., McDonnell P., Burke M. B., Deen K.C., Lyn S., Silverman C., et al. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J. Biol. Chem*; 1998: 273(23), 14363–14367.

- 200.** Wen J, Ramadevi N, Nguyen D, Perkins C, Worthington E, Bhalla K. Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood*. 2000 Dec 1;96(12):3900-6.

- 201.** Pai SI, Wu GS, Ozören N, Wu L, Jen J, Sidransky D, El-Deiry WS Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer Res*. 1998 Aug 15;58(16):3513-8.

- 202.** Takimoto R, El-Deiry WS. Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*. 2000 30;19(14):1735-43.

- 203.** Ichikawa K, Liu W, Fleck M, Zhang H, Zhao L, Ohtsuka T, Wang Z, Liu D, Mountz JD, Ohtsuki M, Koopman WJ, Kimberly R, Zhou T. TRAIL-R2 (DR5) mediates apoptosis of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis.

- 204.** Hazra A, Chamberlain RM, Grossman HB, Zhu Y, Spitz MR, Wu X. Death receptor 4 and bladder cancer risk. *Cancer Res*. 2003 15;63(6):1157-9.

- 205.** Wu XX, Kakehi Y, Mizutani Y, Nishiyama H, Kamoto T, Megumi Y, Ito N, Ogawa O. Enhancement of TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis by adriamycin through inducing DR4 and DR5 in renal cell carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2003 Apr 20;104(4):409-17.

- 206.**Meng RD, McDonald ER 3rd, Sheikh MS, Fornace AJ Jr, El-Deiry WS. The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL-, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis.Mol Ther. 2000 Feb;1(2):130-44.
- 207.**Hu WH, Johnson H, Shu HB. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. J Biol Chem. 1999 Oct 22;274(43):30603-10.
- 208.**Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors.Cell Res. 2004 Oct;14(5):359-72. Review.
- 209.**Zhang XD, Franco AV, Nguyen T, Gray CP, Hersey P. Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells. J Immunol. 2000 Apr 15;164(8):3961-70.
- 210.**Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. Immunity. 1997 Dec;7(6):821-30.
- 211.**Muhlenbeck F, Haas E, Schwenzer R, Schubert G, Grell M, Smith C, Scheurich P, Wajant H. TRAIL/Apo2L activates c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) via caspase-dependent and caspase-independent pathways. J Biol Chem. 1998 4;273(49):33091-8.
- 212.**Herr I, Wilhelm D, Bohler T, Angel P, Debatin KM. JNK/SAPK activity is not sufficient for anticancer therapy-induced apoptosis involving CD95-L, TRAIL and TNF-alpha.
- 213.**Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, Zeng Q, Mookerjee B, Gelinas C, Fuchs EJ, Bedi A. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB.Nat Cell Biol. 2001 Apr;3(4):409-16.
- 214.**Bernard D, Quatannens B, Vandenbunder B, Abbadie C. Rel/NF-kappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-

inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1. J Biol Chem. 2001 20;276(29):27322-8.

215.Marsters SA, Pitti RA, Sheridan JP, Ashkenazi A. Control of apoptosis signaling by Apo2 ligand.Recent Prog Horm Res. 1999;54:225-34. Review.