



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLAR ÜZERİNDE OLUŞTURULAN DENEYSEL VARİKOSEL
MODELİNDE TADALAFİLİN SPERM PARAMETRELERİ VE TESTİSİN
KORUNMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Melih YETEMEN

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2024



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLAR ÜZERİNDE OLUŞTURULAN DENEYSEL VARİKOSEL
MODELİNDE TADALAFİLİN SPERM PARAMETRELERİ VE TESTİSİN
KORUNMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Melih YETEMEN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Mehmet Çağatay ÇİÇEK

BURSA – 2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
SUMMARY	iv
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER	2
I. İnternal ve Eksternal Genital Organ Embriyoloji	2
II. Testis Anatomisi	3
III. Testis Histolojisi	4
III.A. Seminifer Tübül	4
III.B. Sertoli Hücreleri	5
III.C. Leydig Hücreleri	5
IV. Spermatogenez	6
V. Spermiyogenez.....	7
VI. Varikozel Epidemiyolojisi.....	8
VI.A. Sıklık.....	9
VI.B. Anatomik Özellikler ve Patofizyoloji	9
VI.C. Etiyoloji.....	10
VII. Varikozel ve Testiküler Hasar	11
VII.A. Oksijen Radikalleri.....	11
VII.B. Isı Stresi	12
VII.C. Hipoksi	13
VII.D. Renal Adrenal Venöz Reflü	13
VII.E. Mikrovasküler Kan Akımı	14
VII.F. Hormonal Değişiklikler	14
VII.G. Kan Testis Bariyerinin Bozulması	14
VII.H. Apoptozis	15
VIII. Varikozelin Testis Histolojisi Üzerine Etkisi	15
IX. Varikozel Tanısı	16
X. Varikozelde Tedavi	17
X.A. Varikozelin Cerrahi Tedavisi	17
X.B. Varikozelin Medikal Tedavisi.....	18
GEREÇ VE YÖNTEM.....	21

I. Deney Hayvanları.....	21
II. Çalışma Grupları	21
III. Testis Dokusu Histolojik Prosedür ve Değerlendirme İşlemi	25
III.A. Modifiye Johnsen Skorunun Değerlendirilmesi.....	25
IV. Apoptozis Değerlendirilmesi.....	26
IV.A. Apoptotik İndeksin Değerlendirilmesi	27
V. Testis İçerisinde Venlerin Değerlendirilmesi.....	27
VI. Semen Örneklerinin Alınması	28
VII. Semen Örneklerinin Değerlendirilmesi	28
VIII. İstatistiksel Analiz.....	29
BULGULAR	30
I. Modifiye Johnsen Skoruması.....	30
II. TUNEL Boyaması ile Apoptozisin Değerlendirilmesi.....	32
II.A. Apoptotik İndeks	35
III. Testis İçerisindeki Venlerin Değerlendirilmesi.....	36
IV. Sperm Parametreleri	39
TARTIŞMA	40
SONUÇ	46
KAYNAKÇA.....	47
TEŞEKKÜR	54
ÖZGEÇMİŞ	55

ÖZET

Güncel tedavisi cerrahi olan varikoselin tedavisinde antioksidan etkili tadalafilli deneysel varikosel modeli oluşturulan sıçanlar üzerinde kullandık. Tadalafilin testis ve sperm parametreleri üzerine etkisini araştırdık.

Çalışmada 24 erkek sıçan kullandık. Grup 1 Sham grubu, grup 2 sol varikosel grubu, grup 3 sol varikosel oluşturulup tadalafil başlanan grup olarak üçe ayrıldı. Yetmiş beş günlük takip sonrası denekler sakrifiye edildi. Sol testis dokuları histopatolojik ve apoptotik inceleme için çıkarıldı. Sol epididim dokularından semen örneği elde edildi.

Modifiye Johnsen skorları karşılaştırıldığında grup 2'nin skoru, grup 1'e göre daha düşük olduğu saptandı ($p=0,005$). Grup 2 ve grup 3'ün ve grup 3 ile grup 1'in bu skorları arasında fark saptanmadı ($p>0,05$). Testis içerisindeki venlerin tunika media ölçümlerinde varikosel oluşturulan gruplarda grup 1'e göre bu kalınlık anlamlı artmıştı (sırasıyla $p=0,008$, $p=0,004$). Grupların apoptotik indeks analizlerinde tüm gruplar arasında fark saptandı (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,002$, $p=0,004$) ve Grup 3'te Leydig hücrelerinde apoptoz grup 2'ye göre daha az görüldü. Motilite ortalamaları grup 1 ve grup 3'ün benzer sonuçlanırken grup 2'ye göre anlamlı yüksek saptandı ($p<0,05$). Morfolojik defekt oranlarına göre grup 1 ve grup 2'nin ortalama ölçümleri grup 3'e göre daha düşük saptandı ($p<0,05$). Grup 3'ün ortalama sperm sayısı grup 1 ve grup 2'den daha yüksek ve grup 2'nin ortalama sperm sayısı da grup 1'den yüksek saptandı ($p<0,05$).

Çalışmamızda tadalafilin varikosele bağlı gelişen histopatolojik değişikliklere karşı testisi koruyabileceği, varikoselin testis içi venler üzerine etki gösterdiği, varikosele bağlı artmış apoptozis oranlarını azaltabileceği ve sperm parametrelerinin başta motilite olmak üzere korunmasını sağlayarak gelişebilecek subfertiliteyi engelleyebileceği gösterildi.

Anahtar Kelimeler: Varikosel, Tadalafil, Testis, İnfertilite

SUMMARY

Investigation of The Effect of Tadalafil on Sperm Parameters and Testicular Protection in an Experimental Varicocele Model Created on Rats.

In the treatment of varicocele, the current treatment of which is surgery, we used the antioxidant tadalafil on rats that created an experimental varicocele model. We investigated the effect of tadalafil on testicular and sperm parameters.

24 male rats were used in the study. This study consists of 3 groups. Group 1 was Sham group, group 2 the left varicocele group, and group 3 the group in which left varicocele was created and tadalafil was given. After 75 days of follow-up, the subjects were sacrificed. Left testicular tissues were prepared for histopathological and apoptotic examination. A semen sample was obtained from the left epididymal tissues.

When the modified Johnsen scores were compared, the score of group 2 was found to be lower than that of group 1 ($p = 0.005$). There was no difference between these scores of group 2 and group 3, and between group 3 and group 1 ($p > 0.05$). Tunica media measurements of the veins within the testicles revealed a significant increase in the thickness of the varicocele-created groups compared to group 1 ($p = 0.008$, $p = 0.004$). In the apoptotic index analysis of the groups, a difference was detected between all groups ($p < 0.001$, $p = 0.002$, $p = 0.004$) and the protective effect of tadalafil on Leydig cells was demonstrated. While the motility averages of group 1 and group 3 were similar, they were found to be significantly higher than group 2 ($p < 0.05$). According to morphological defect rates, the mean measurements of group 1 and group 2 were found to be higher than group 3 ($p < 0.05$). Among the groups, the average sperm count of group 3 was higher than group 1 and group 2, and the average sperm count of group 2 was higher than group 1 ($p < 0.05$).

Our study has shown that tadalafil can protect against histopathological changes in the testicle due to varicocele, that varicocele affects the intratesticular veins, that it can reduce the increased rates of apoptosis due to varicocele, and that it may prevent possible subfertility by preserving sperm parameters, especially motility.

Keywords: Varicocele, Tadalafil, Testicle, Infertility



GİRİŞ

Varikozel erkeklerin dörtte birinde mevcut olup, düzeltilebilir erkek faktörlü infertilitenin literatürde ilk sıradaki sebebi olarak bilinmektedir. Sol testiste daha sık görülmektedir (1).Varikozeli olan hastalarda testiste oluşan ısı artışı, oksijen radikallerinin süreye bağlı olarak sperm parametrelerini ve testis histolojisini bozduğu düşünülmektedir, testis yapısındaki bu bozulma ve apoptozis, histolojik olarak da izlenmektedir (2). Bu değişikliklere bağlı olarak sperm parametrelerinde bozulmalar; sayı, motilite ve morfolojik değişiklikler meydana gelebilmektedir. Varikozel tedavisinde tanımlanmış birçok cerrahi yöntem vardır; subinguinal varikoselektomi, yüksek retroperitoneal varikoselektomi, inguinal varikoselektomi, skrotal varikoselektomi, laparoskopik varikoselektomi ve radyolojik embolizasyon yöntemleri tanımlanmıştır.

Fosfodiesteraz 5 (PDE5) inhibitör ilaç gurubu vücuttaki 3'-5'-siklik guanozin monofosfat (cGMP), parçalanmasını önleyerek pulmoner arteriyel hipertansiyon ve erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılmaktadır. Üroloji poliklinik pratiğimizde oral preparat olması nedeniyle ve yan etkilerinin çok düşük olması nedeniyle ilk tercih ettiğimiz tedavi seçeneğidir (3). Araştırmada kullanmayı planladığımız tadalafil etken maddeli ilaç PDE5 inhibitör ilaç grubunda yer alır. Yarı ömrü PDE5 inhibitörleri arasında en uzun olan ilaçtır. İlacın antiapoptotik ve antioksidan etkisi üzerine olumlu araştırmalar literatürde mevcuttur (4). Araştırmada hayvanlara deneysel sol varikozel modeli oluşturulacaktır (5). Deneysel varikozel modeli uygulanan deneklerin bir grubuna tadalafil oral olarak uygulanacaktır. Literatür taramasında antioksidan ve antiapoptotik etkisi bulunan tadalafilin varikozel tedavisinde kullanımına dair çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmadaki amacımız tadalafilin varikozele bağlı gelişebilecek histolojik ve sperm parametrelerindeki bozulmanın üzerine olumlu etkisinin olup olmadığının araştırılmasıdır.

GENEL BİLGİLER

I. İnternal ve Eksternal Genital Organ Embriyoloji

Embriyonel gelişimin beşinci haftasında mezonefrozun medialinde, korteks ve medullası olan bipotansiyel gonad oluşur. Bu gelişimden Wilms Tümörü geni (WT1) ve steryodojenik faktör 1 (SF-1) gibi genlerin aktivasyonu sorumludur. Gelişimin altıncı haftası ve sonrasında germ hücreleri genital kabarıklıklara göç ederler. Germ hücre göçü gerçekleşmezse gonadlar gelişemez. Embriyonel gelişimin yedinci haftasında Y kromozomu üzerinde sex-determining region Y (SRY) genin yönlendirmesi ile primordial germ hücrelerine dönüşüm başlar (6). Gonadlarda bulunan transkripsiyon faktörü Sox9 geni upregülasyonu ile testis dokusuna ilerler, SRY geninin yönlendirmesi olmadığında gonad over yönelimi gösterir (7). Gonadın korteks dokusu gerileyerek medüller testiküler yapılar gelişir. Yolk sac duvarında bulunan primordial germ hücreleri dorsal mezenter üzerinde genişleyerek gonadı oluşturur. Embriyoda mezonefroz içerisinde hem wolffian hem de müllerian kanallar bulunur. Sertoli hücrelerinden Antimülleryen hormon (AMH), Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron hormonu ile wolffian kanalının gelişimi devam ederken müllerian kanalları geriler (8). Antimülleryen Hormon, AMH reseptörü 2 (AMHR2) bağlanarak ve apoptozu indükler ve müllerian kanalları geriler. Wolffian kanalından erkek üreme sisteminin temel yapıları; epididim, duktus deferens, ampulla ve seminal veziküller gelişir, bu yapılar gonad ile birleşerek erkek üreme sistemini oluşturur.

Erkek dış genital organlarının ve prostatın gelişimi için dokularda 5 alfa redüktaz tip-2 enziminin testosteronu dihidrotestosterona dönüştürmesi gerekir (9). Seks kromozomları ile belirlenen internal ve eksternal genital organlar, diferansiye olmuş gonadın hormonal sentezine göre belirlenmektedir. Hormonal sentez ve hormon reseptör uyum

mekanizmasında aksaklık gelişirse dişi tip farklılaşma veya anormal erkek tip gelişim olabilir.

Erkeklerde sperm üretiminin olması için her iki testisin karın içerisinden, skrotum içerisine inmesi gerekir. Bunun nedeni vücut içi sıcaklığından testislerin korunmasını sağlamaktır. Vücut içi sıcaklıktan 2-3°C düşük sıcaklıkta sperm üretimi optimum sağlanmaktadır. Skrotum içerisine testislerin intrabdominal seviyeden skrotuma inmesi hormonal ve mekanik etkilere bağlı olarak 2 evrede gerçekleşir. Bunlar transabdominal ve inguinokrotal evreler olarak isimlendirilir.

Transabdominal evre testis içinden Leydig hücrelerinden salınan İnsülin-benzeri faktör-3 (INSL3) kontrolündedir. Süspansör ligament dejenere olur ve gubernakular şişme reaksiyonu gerçekleşir. İkinci evre olan inguinokrotal evre ise androjen bağımlıdır. Testislerin iniş süreci INSL3 ve androjenler dışında, Sertoli hücrelerinden salınan AMH, genitofemoral sinir uçlarından salınan Kalsitonin gen-bağımlı peptid (CGRP), peritoneal bir divertikül yapısında olan vajinal proses, meme hattı altındaki Meme yağ yastıkçığı (MFP) ile Hox genlerinin rol oynadığı kompleks bir süreçtir (10). Testislerin skrotum içerisine inemediği durumlarda; infertilite ve testiküler kanser nedenleri arasında sayılan anorşi, retraktıl testis, kriptorşidizm ve ektopik testis görülebilir.

II. Testis Anatomisi

Testisler skrotum içerisinde bulunan ekzokrin ve endokrin fonksiyonları olan ovoid bir çift organdır. Testislerin fonksiyonlarının devamlılığı açısından skrotum içi sıcaklık, vücut sıcaklığından 2-3°C daha düşük olmalıdır. Testisi dıştan saran ve üç tabaka vardır bunlar; tunika vajinalisin visseral tabakası, tunika albuginea ve tunika vaskülozadır. Tunika albuginea ve tunika vasculoza birlikte testis içine uzanan septalar vererek organ içi lobulüsler oluşturur. Lobulüsler içinde seminifer tübüller bulunur ve seminifer tübüllerde rete testis ile birleşir. Rete testisler duktuli efferentler epididim başı ile birleşerek epididim lobüllerini oluştururlar. Duktus deferens yaklaşık 6 metre boyunda bir kanaldır. Vas deferens; duktus defens olarak da adlandırılır ve

prostat bezine girmeden önce ampulla denen bir genişlemeyi oluşturur. Prostat ve mesane komşuluğunda yer alan seminal veziküller, ampulla ile birleşerek prostat girişine açılırlar ortak ejakulator kanal yapıları ile prostat içerisinde ilerleyerek prostatın veru bölgesine ve üretraya açılır. Seminal total ejakülatın %50'den fazlasını oluşturur (11).

III. Testis Histolojisi

Testisler skrotum içerisinde bulunan ekzokrin ve endokrin fonksiyonları olan ovoid bir çift organdır. Testis dokusunu dıştan çevreleyen bağ dokusundan oluşan tunika albuginea bulunur. Mikroskop altında tunika albugineanın komşuluğunda tunika vasculoza bulunur. Tunika albuginea ve tunika vasculoza birlikte testis içine uzanan septalar vererek organ içi lobülüsler oluşur. Lobuli testisler içerisinde seminifer tübüller bulunmaktadır. Seminifer tübül yapıları puberteye kadar solid yapıdadır, Puberteyle birlikte tübül yapıları lümenleri açılarak seminifer tübülleri oluşturur. Her seminifer tübül 30-80 cm uzunluğunda boyunda 150-250 mikron metre çapında yapılardır (12). Seminifer tübül iç yapısında bazal laminanın üzerinde Sertoli hücreleri ve spermatogonyum hücreleri bulunur. Spermatik hücreler için gerekli besini ve desteği Sertoli hücreleri sağlar. Birbirleri ile yaptıkları sıkı bağlantılar ile kan testis bariyerini oluşturarak testis dokusunu otoimmüniteden korumuş olur (13). Spermatogonyumlar seminifer tübül içerisinde bir dizi mitoz ve mayoz bölünmenin ardından spermatidleri oluşturur, n kromozom sahiptirler. Oluşan spermatidler kuyruk oluşumu sonrası spermiyum olarak lümene atılırlar. Seminifer tübüller arasında interstisyel alan olarak bilinen bölüm vardır. İntertisyel alan içinde damar yapıları, lenfatikler, makrofajlar, fibroblastlar ve testisin hormonal salgı görevinden sorumlu Leydig hücreleri bulunmaktadır. Leydig hücrelerinden sperm üretiminde ve vücutta sekonder erkek karakterin oluşumundan sorumlu olan testosteron hormonu salgılanmaktadır.

III.A. Seminifer Tübül

Testislerin içerisinde uzanan sperm üretimi ve hormonal fonksiyonlarında sağlandığı testisi oluşturan 250-1000 adet arasında değişen kıvrımlı tübül yapılarıdır. Spermatozoaların üretimi bu yapılar içerisinde

gerçekleşir. Seminifer tübüllerin duvarında Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar bulunmaktadır. Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan sıkı bağlantılar kan testis bariyerini oluşturur ve üretilen spermleri otoimmünite gelişmesine karşı bir engel olur. Seminifer tübül yapıları arasında bulunan Leydig hücrelerinde androjen sentezi gerçekleşir. Seminifer tübül yapılarının çevresinde lamina propria içerisinde fibroblast içeren katman bulunur. Bazal lamina içerisinde düz kas yapısında miyoid hücrelerde bulunur. Tübül içinde oluşan spermatidler tübüler bağlantılar ile rete testise açılır.

III.B. Sertoli Hücreleri

Destek hücreleri olarak da bilinen Sertoli hücreleri, spermatozoaları destekler ve onların olgunlaşmasında görev alır. Sertoli hücreleri puberteden sonra mitoz bölünme gerçekleştirmez puberte öncesi hızlı bir bölünme dönemi ile 10-20 kata kadar artabilir ve spermatik hücreler için besin desteğini sağlar. Sıçanlarda da doğumdan sonraki 18. günde Sertoli hücre bölünmesi tamamlanır (14).

Birbirleri ile yaptıkları sıkı bağlantılar ile kan testis bariyerini oluşturur, testis dokusunu otoimmüniteye karşı korur. Işık mikroskobu ile sınırları net olmayan karakteristik olarak üç kısımlı çekirdekleri ve çentikli çekirdekçiği görülebilir. Elektron mikroskopisinde daha net değerlendirilebilen bu hücreler tübül tabanından lümene uzanır ve kadeh şeklinde yapısı vardır (15).

Spermatidler Sertoli hücrelerinin apikal yüzüne oturmuştur. Seçici geçirgen yapıdaki kan-testis bariyeri seminifer epitelden spermatidlere gerekli besin ve iyon geçişini sağlarken, otoimmüniteden korunmasını sağlar.

Sertoli hücreleri Folikül Stimülant Hormon (FSH) ile uyarılır ve spermatozoa oluşumunu başlatır ve sürdürür. Bu uyarının olmaması halinde sperm üretimi gerçekleşmez.

III.C. Leydig Hücreleri

İnterstisyel alanda bulunması sebebiyle interstisyel hücreler olarak da adlandırılır. Poligonal şekilli eozinofilik hücrelerdir. Sitoplazmasında bulunan

lipit damlacıkları tipiktir. Sitoplazmik Reinke kristalleri yine bu hücre için tipik yapılardır. Testosteronun salgılanması embriyonik gelişim, cinsel yönelim ve gelişimi, üreme fonksiyonu için gereklidir (16). Luteinize edici hormon (LH) Leydig hücre yüzeyindeki LH reseptörleri üzerinden testosteron sentezini arttırarak, sperm hücre sentezine indirekt bir etki oluşturur.

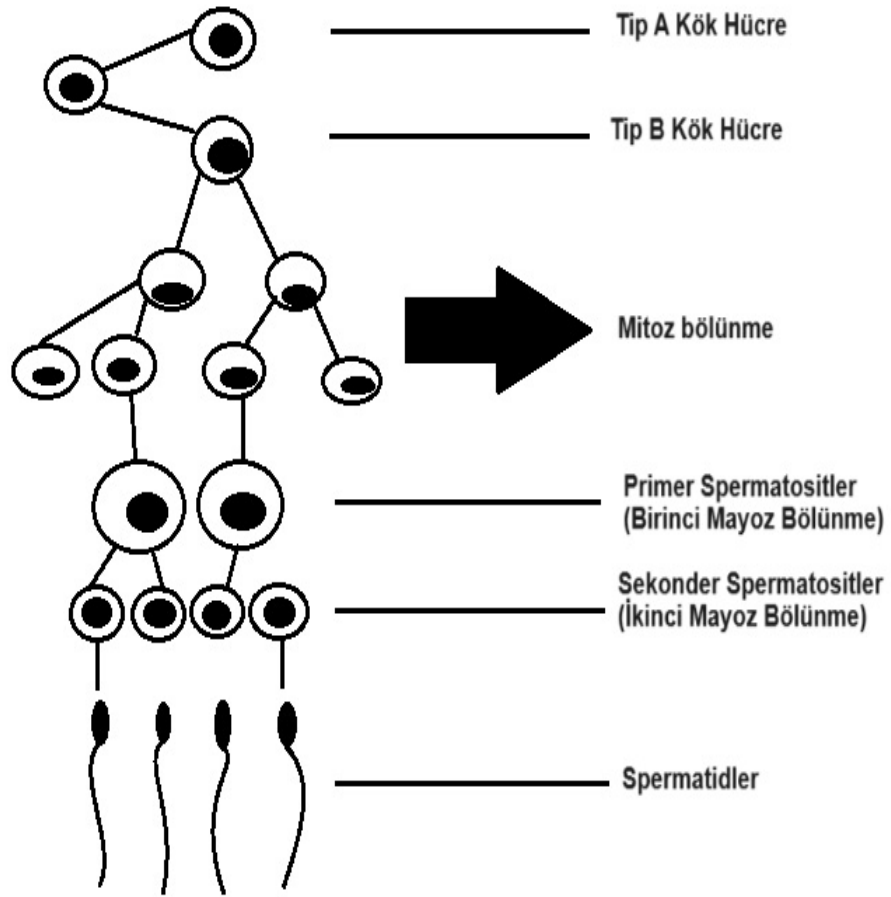
Plazmada testosteron düzeyinin belirli bir düzeyin üstünde artması hipotalamusta nörosekretuvar hücreleri etkiler, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgısını azaltır ve LH salgısı azaltır. Bu aksın FSH üzerine etkisi bulunmaz.

IV. Spermatogenez

Spermatogenez; Sertoli, Leydig, peritübüler ve germ hücrelerini içeren ve endokrin ve parakrin hormonların rol oynadığı, kompleks bir süreçtir. Leydig hücrelerinin hormon sentezi için LH, Sertoli hücrelerinin hormon sentezi için FSH gereklidir. İntratestiküler testosteron üretimi ve spermatogenez, bu iki pitüiter hormonun yönetimindedir.

Spermatogenez $2n$ kromozom sayısının haploid kromozom olan spermatozoaya dönüştüğü ve erkek üreme sistemi boyunca ilerler. Sperm üretimi yetmiş dört gün sürmektedir (17). Sperm üretimi tübüllerin bazal membrana yakın bölümünde kök hücrelerin mitoz bölünmesi ile başlar. Spermatogonyal kök hücreler olarak isimlendirilir. Kök hücreler A tipi ve B tipi hücre olarak ikiye ayrılır. A tipi hücre kök hücre olarak, B tipi hücre spermatosit hücrelere dönüşür (Şekil-1). Mayoz bölünmenin birinci ve ikinci aşamaları gerçekleşir sonuçta n kromozom sayısında spermatid hücreler oluşur. Bu bölünme bazal hücrelerden lümene ilerler (18).

Sertoli hücreleri spermatogenez için destekleyici bir role sahiptir. Sıkı bağlantıları ile kan testis bariyerini oluşturur ve sperm hücrelerinin beslenmesini sağlar.



Şekil-1: Spermatogenez

V. Spermiyogenez

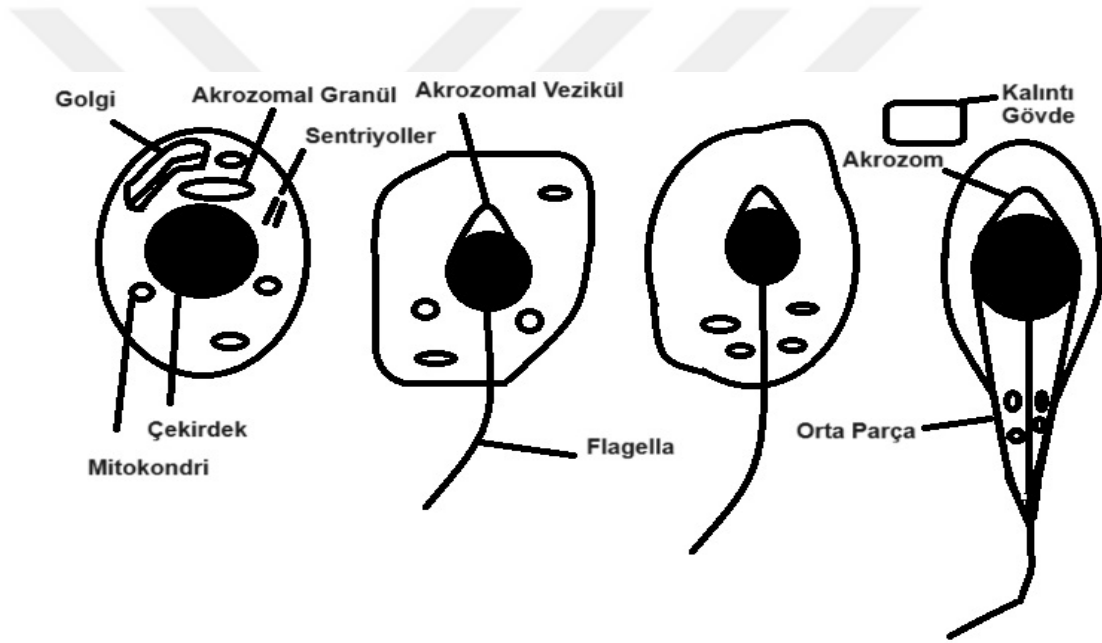
Spermiyogenez; spermatidlerin spermatozalara doğru olgunlaştığı ve hareket kazandığı spermatogenezin son aşamasıdır (19). Mayoz bölünme sonrası oluşan spermatidler spermiyogenez süreci dört aşamaya ayrılır:

1. Golgi aşaması: Çok sayıdaki küçük veziküller içerisinde bulunan granüller, tek bir granüle, akrozomu oluşturmak için birleşir. Hücre içerisinde golgi aygıtı, spermatozalarda akrozomu meydana getirecek enzimleri oluşturur ve birleşir. Akrozomun olduğu kısmın diğer ucunda, mitokondrinin toplandığı ve distal sentriolün bir aksonem oluşturmaya başladığı, kalın bir parça gelişir.

2. Akrozom aşaması: Akrozomal vezikül, nükleer membran yüzeyi üzerinde genişler, nükleer yüzeyi örter. Akrozom içinde; hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir.

3. Flagella oluşumu: Hücre sentriollerinin bir kısmının uzaması ile flagella oluşur. Spermatogonyum hareketi için gereklidir. 9+2 merkezi mikrotübül çekirdek yapısı ve bir aksonomu vardır.

4. Olgunlaşma aşaması: Rezidüel cisimcikler olarak bilinen fazla sitoplazma, seminifer tübül içinde Sertoli hücreleri yardımı ile fagosit edilir (Şekil-2).



Şekil-2: Spermiyogenez

VI. Varikozel Epidemiyolojisi

Varikozel pampiniform venöz pleksusun anormal derecede genişlemesi ile oluşur, düzeltilebilir erkek faktörlü infertilitenin literatürdeki birinci sıradaki sebebi olarak bilinmektedir. Sol testiste anatomik olarak daha sık görülmektedir (1).

Varikosel prevalansının 2-10 yaş arası erkek çocuklarda <%1, 11-14 yaş arası erkek çocuklarda %7,8 ve 15-19 yaş arası erkek çocuklarda %14,1 olduğunu bildirmişlerdir. Bu epidemiyolojik gözlem, varikoselin özelliği olan venöz yetmezliğin öncelikle testis gelişimi sırasında oluştuğunu düşündürmektedir (20).

Klinik deneyimde en sık infertilite ile ilişkili primer varikosel görülmele beraber, internal spermatik venin veya renal venin invazyonuna, obstrüksiyonuna bağlı sekonder patolojilerde de gelişebilmektedir.

VI.A. Sıklık

Varikosel erkeklerin dörtte birinde mevcut olup, düzeltilebilir erkek faktörlü infertilitenin literatürdeki birinci sıradaki sebebi olarak bilinmektedir. Sol testiste anatomik olarak daha sık görülmektedir (1).

İnfertilite nedeniyle kliniğe ilk kez başvuran erkeklerde bu oran %35 e kadar artmaktadır (21). Yaşla beraber varikosel sıklığının arttığını gösteren çalışmalar vardır. Varikosel prevalansı 30-39 yaşlarında %18, 40-49 yaşlarında %24, 50-59 yaşlarında %33, 60-69 yaşlarında %42, 70-79 yaşlarında %53 ve 80-89 yaşlarında %75 olarak görülür (22). Bu bulgular venöz kapak yetmezliğinin yaş ile sıklığının arttığını, varikosel sıklığı yaş ile orantılı olarak artacağı düşünülmektedir.

Birinci derece yakınlarında varikosel olan hastalarda görülme sıklığı toplum yüzdesine oranla daha yüksek saptanan çalışmalar vardır (23). Nonobstrüktif azospermi (NOA) hastalarında varikosel sıklığı %5-10 görülmektedir (24).

VI.B. Anatomik Özellikler ve Patofizyoloji

Testislerden başlayarak yukarı yönlü hareket ile plexus pampiniformis oluşur, yukarı yönlü hareket ile birleşerek internal spermatik veni oluşturur. Pampiniform venöz plexusun anormal derecede genişlemesi varikosel oluşturur. Skrotal muayene ve inspeksiyonla variköz venler tespit edilebilir.

Klinik başvuru infertilite, ağrı, dolgunluk hissi gibi şikayetler olabilmektedir. Varikosel sıklıkla sol tarafta olmakla beraber sağ taraflı da

görülebilmektedir. Sekonder patolojilerle ilişkili olabilmektedir. Tek taraflı sağ patolojiler %2 oranında görülmektedir (1).

VI.C. Etiyoloji

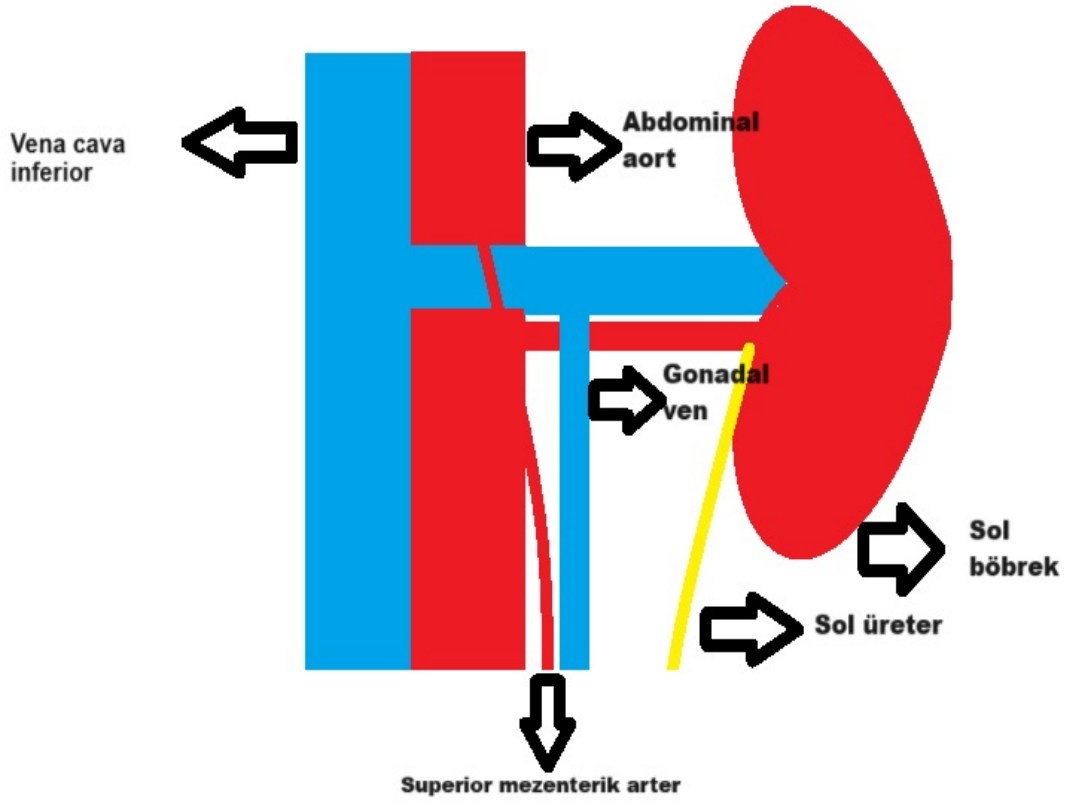
Varikozel etiyojisiini açıklamada üç teori öne sürülmüştür (25).

1. Sol internal spermatik ven sağ internal spermatik ven ile karşılaştırıldığında bazı anatomik farklılıklar göze çarpmaktadır. Sol internal spermatik ven, sol renal ven inferioruna daha dik açı ile boşalmaktayken, sağ internal spermatik ven, vena kava inferiora oblik bir açıyla boşalmaktadır. Uzunluk olarak da sol spermatik ven, sağa oranla 9-10 cm kadar daha uzundur. Sol internal spermatik ven içerisinde sağa internal spermatik vene oranla daha yüksek basınç oluşması, pampiniform pleksusta anormal genişleme ve anormal venöz akımın oluşmasına dolayısıyla sol taraflı varikozelin klinikte daha sık görülmesini bize açıklamaktadır (26).

2. Sol internal spermatik venin, sol renal vene boşaldığı alanda venöz valv yapısının olmayışı venöz reflü gelişimi ile sonuçlanmaktadır (27).

1965 yılında 79 kadavra üzerinde yapılan bir çalışmada, %46 oranında sol internal spermatik venin, sol renal ven ile birleştiği kısımda valv yapısının olmadığı görülmüştür (28). Venografi kullanılarak yapılan bir çalışmada yeterli kapakçık sistemi olan hastalarda %26,2 oranında varikozel görülmüştür (29). Varikozele bağlı eksternal venöz yapılara kollateraller gelişebilmektedir. Varikozektomide eksternal venöz yapıların bağlanılmaması nüks varikozele sebep olabilmektedir (30).

3. Sol gonadal venöz sistemde basınç artışı anatomik olarak “nutcracker fenomeni” gelişeceği düşünülmüştür (1). Sol renal venin abdominal aort ve superior mezenterik arterin arasında ilerlemesi ve buna bağlı basınç artışı neden olarak gösterilmiştir (Şekil-3).



Şekil-3: Abdominal aorta ve superior mezenterik arter arasında kalan renal ven segmenti nutcracker fenomeni illüstrasyonu.

VII. Varikosel ve Testiküler Hasar

Varikosel düzeltilebilir erkek faktörlü infertilitenin literatürdeki birinci sıradaki sebebi olarak bilinmektedir. Testis içerisinde ısı artışına bağlı gelişen stres, venöz geri dönüşün bozulması, artan oksijen radikalleri, renal adrenal venöz reflü, hormonal değişiklikler ve düşük adenozin trifosfat (ATP) düzeyleri varikoselli hastalarda sperm motilitesi başta olmak üzere sperm parametrelerini etkilediği düşünülmektedir.

VII.A. Oksijen Radikalleri

Spermatozoanın reaktif oksijen türevlerinin üretimi mitokondriyal solunum bağlı oluşur, üretilen süperoksit ve hidrojen peroksit sperm aktivasyonu, kapasitasyonu, akrozomal reaksiyon ve yumurta ve sperm hücresinin bileşimine yardımcı olmak gibi görevleri vardır. Varikosele bağlı

indüklenen aşırı üretimi, hücreler radikal oksijen türevlerinin detoksifikasyonu, radikal reaksiyonların sonlandırılması, radikal oluşumunun sınırlandırılması koruyucu üç ana mekanizma ile dengelenmeye çalışılır.

Katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz detoksifikasyonda görevli enzimlerdendir. Hidrojen peroksit hasarından korunmada katalaz peroksizom üzerine etkilidir, glutatyon peroksidaz enzimi sitozol ve mitokondride etkilidir. Antioksidanlar sperm ve seminal sıvıda yüksek miktarlarda bulunmaktadır (31).

Testis içinde mitokondriyal solunuma bağlı gelişen reaktif oksijen türevleri (ROS) aşırı üretimi hücre apoptozunu indükler ve testis içi deoksiribonükleik asit (DNA) polimeraz aktivitesini azaltır. Sertoli hücre fonksiyonlarını bozar ve Leydig hücrelerinin testosteron üretimini azaltarak hücresel düzeyde değişikliklere neden olabilir (26). Varikoseli olan infertilite nedeniyle araştırılan erkeklerden alınan meni örneklerinde yüksek ROS seviyeleri gösterilmiştir (32). Artan ROS anormal sperm morfolojisine ve azalmış sperm ATP üretimi ile ilişkilendirilmiştir (33). Sperm akson hasarına bağlı olarak spermin motilitesinde azalma ve hücre ölümü meydana gelebilir. Artan oksidan stres hücre membranında lipid peroksidasyonuna sebep olarak hücre bütünlüğünün bozulmasına sebep olur.

Artan ROS ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki denge dokularda hücresel düzeyde korunmaktadır. Antioksidan ve oksidan maddeler arasındaki bu dengeyi sağlamada dışarıdan alınan anti oksidan maddelerin de kullanabileceği araştırılmıştır, deneysel olarak oluşturulan hayvan modellerinde antioksidan maddelerin ROS etkilerine karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir (34). İdiopatik oligoastenoteratospermi (OAT) olan hastalarda oral antioksidanların semen parametreleri üzerine olumlu etkileri olabileceğini gösteren insan çalışmaları da literatürde vardır (35).

VII.B. Isı Stresi

Varikoselde sperm parametrelerinin bozulmasına sebep olarak suçlanan en önemli faktörlerden biri ısı artışıdır. Spermatogenez ısı duyarlı bir süreçtir. Skrotal ısı en iyi 35-36°C'de devam etmektedir. Skrotum

içerisindeki vücuda göre düşük ısı variköz venlere bağlı 2,6°C daha yüksek bulunmuştur (36). Testis içi ısı stresine maruziyet sperm üretimi ile seminifer tübül ve Leydig hücrelerinde nükleer DNA ve RNA bağlayıcı proteinler üzerine oluşturduğu termal hasar sonucu sperm parametrelerinin etkilendiği düşünülmektedir (27,37). DNA polimeraz aktivitesi üzerine yapılan bir çalışmada da tek taraflı varikoseli bulunan hastalarda daha düşük seviyede gözlenmiştir (38). Ergenlerde yapılan bir çalışmada skrotal ısının ve testis hacimleri arasındaki ilişki karşılaştırılmış, testis boyutunun azalması ile ısı artışı arasında anlamlı bir birliktelik saptanmıştır (39).

VII.C. Hipoksi

Doku ve organların yeterli oksijen alamaması durumuna hipoksi denir. Patolojik bir durumdur. Doku hipoksik durumda kaldığında hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) sentezler. Hipoksi ile indüklenebilir faktörün alt tipleri bulunmaktadır tüm dokularda sentezlenebilen alt tipi 1 α artışı anjiogenez ile ilişkili bulunmuştur (40). Varikoseli olan erkeklerde gelişen hipoksiye ilişkin bir çalışmada, hipoksiye karşı doku yanıtında temel düzenleyici olan hipoksi ile indüklenebilir faktör (HIF) 1 α 'nın internal spermatik venden alınan venöz örneklerinde daha yüksek bir ekspresyonda saptanmıştır (41).

Isı stresi ve oksidatif stres dahil olmak üzere yukarıda bahsedilen patojenik mekanizmaları spermatogenez için gerekli olan normal intratestiküler testosteron sentezinden sorumlu olan testisin Leydig hücre popülasyonunu doğrudan etkileyebilir (25). Farelerde yapılan deneysel çalışmalarda, testis dokusunda kronik hipoksi ile karşı karşıya kaldığında artan ROS ile serum ve testis içi testosteron düzeylerinde ölçülebilir düşüş olduğunu göstermiştir (42).

VII.D. Renal Adrenal Venöz Reflü

Renal adrenal venöz reflü varikosele bağlı infertiliteyi açıklamada öne sürülen bir diğer nedendir serbest oksijen radikalleri, prostaglandin E ve F2 α , katekolaminler, anjiotensin 1, kortizol seviyeleri daha yüksektir. Prostaglandinler ve katekolaminler sperm üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir,

diğer metabolitler ile ilgili bilgi sınırlıdır. Sıçanlar üzerinde yapılan bir hayvan deneyinde üç grup olacak şekilde ayrılmış; ilk grup kontrol grubu, diğer gruplarda varikozel oluşturulmuş, varikozel oluşturulan bir diğer grupta sol adrenaletomi uygulanmış dokuz ay sonrasında FSH ve testosteron ve testis doku hacmi ölçülmüş, adrenaletomi yapılmayan grup yapılarına göre FSH düzeyleri daha yüksek, testosteron seviyesi daha düşük sonuçlandı, varikozel adrenal reflü açıklamada anlamlı sonuçlanmıştır (43).

VII.E. Mikrovasküler Kan Akımı

Deneysel hayvan modellerinde varikozel indüksiyonu ile testis içi mikrovasküler kan akımında artış olduğu gösterilmiş ve histolojik olarak değişikliklerin meydana gelebileceği gösterilmiştir (44). İnfertilite araştırmalarında diğer araştırılan sebep ise spermier üzerinde akrozomal defekt oluşması ve sperm fonksiyon kaybına sebep olabileceğidir (45).

VII.F. Hormonal Değişiklikler

Spermatogenez başlaması ve sürdürülmesinde FSH ve testosteron seviyeleri önemlidir. Varikozel Leydig hücre sayısında ve sentezlenen testosteron azalma, testis içi testosteron seviyelerinde azalma saptanmaktadır (25). Testosteron sentezinden sorumlu 17,20-desmolaz ve 17 α -hidroksilaz enzim seviyelerinde de ölçülebilir bir azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Araştırma sonuçları testosteron seviyesindeki düşüşün sentezin azalmasına bağlı olduğu düşündürmüştür (46). Varikozel onarımının hormon değerleri üzerine etkisi tartışmalıdır. Testosteron düzeyini etkilemediğini ve arttırabileceğini destekleyen çalışmalar literatürde mevcuttur (47).

VII.G. Kan Testis Bariyerinin Bozulması

Kan testis bariyeri testis dokusunun testis içi otoimmünite gelişmesine karşı testis dokusunu korur. Testis torsiyonu, epididimit, prostatit ve testis travmasına sekonder Anti Sperm Antikor (ASA) üretimini tetikler, patofizyolojisi açıklanamamış olsa da varikozeli olan infertil hastalarda ASA birikimi bulunmaktadır (13). Varikozelli hastalardan yapılan bir çalışmada alınan testis biyopsi örneklerinde kan testis bariyerinde azalan E-kadherin ve

alfa-katenin ekspresyonu varikoselde kan-testis bariyerinin bozulmasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmüştür (48,49).

VII.H. Apoptozis

Apoptozis hücre genetiğinde kodlanmış olan programlı hücre ölümüne verilen isimdir. Apoptozis en önemli amacı, hücre üzerinde oluşan stres sonucu onarılması olanaksız zarar gören, fonksiyon gösteremeyecek hücrelerin dokudan kurtarır (50). Uygunsuz apoptozise bağlı nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün bozukluklar, oksijen radikalleri, hücrede artan stres gibi nedenlere bağlı olarak oluşur. Apoptozis ve hücre sentezi arasında doku fonksiyonunu koruyacak şekilde denge vardır. Çevre dokulara minimum zarar vererek hücrelerin vücuttan temizlenmesini sağlar.

Varikoseli olan infertil erkeklerde patofizyolojiyi açıklamak için öne sürülen bir diğer yol apoptozistir. Deneysel varikosel modeli araştırmasında oluşturulan varikosel grubu, apoptozis oranında anlamlı fark saptanmıştır (51).

VIII. Varikoselin Testis Histolojisi Üzerine Etkisi

Varikoseli olan erkeklerde yapılan biyopsi örneklerinin sonuçları değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda normal spermatogenez, Sertoli cell-only, hipospermatogenez, matürasyon duraklaması histolojik sonuçları görülmüştür (52).

Tek taraflı varikoseli olan hastalardan alınan bilateral testis biyopsilerinde, benzer histoloji ve benzer Modifiye Johnsen skorları görülmüştür. Varikoseli olan hastalarda, varikoselin bilateral etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Ven çaplarında artış, intimal fibrozis ve media tabakasında kollajen birikimi, düz kas sayısında artış, tunika media tabakasında kalınlık artışı ve ilave olarak longitudinal bir tabakanın daha oluştuğunu göstermiştir (53). İnsanlarda yapılan bir diğer çalışmada varikoselektomi yapılan hastalardan alınan ven örnekleri, nefrektomi yapılan hastaların renal venleri ile

karşılaştırılmış, tunika media tabakasında ve tunika adventisya tabakasında kalınlık artışı görülmüştür (54).

IX. Varikozel Tanısı

Varikozel skrotal muayene ile dilate venlerin palpe edilmesi ile tanı konulur. İleri evre varikozelde inspeksiyon ile dilate venler ciltten görülebilmektedir. Dolgunluk hissi, ağrı gibi spesifik olmayan klinik şikayetleri olabilir.

Renkli doppler ultrason (USG) klinik başvuran hastalarda sıklıkla istenen bir görüntüleme yöntemidir. Variköz venlerin çaplarının değerlendirilmesi, venöz reflü olup olmaması ve testis boyutlarının değerlendirmesi sağlayarak klinik tanının doğrulanmasını sağlar. İnvaziv bir yöntem olan venografi bir diğer alternatiftir (55).

Klinik varikozel ile başvuran hastalar 1970 yılında yapılan muayene bulgularına göre gruplanmıştır (56). Günümüzde klinik pratikte halen kullanılmaya devam etmektedir. Varikozel muayenesi ayakta yapılır.

Derece (grade) 1 varikozel, valsalva manevrası ile palpe edilebilmektedir. Valsalva manevrası yapılmadan variköz venler palpe edilemez. Derece (grade) 2 varikozel, valsalva manevrası ve valsalva manevrası yapılmadan da variköz venler palpe edilebilmektedir. Derece (grade) 3 varikozel, Ayakta ve normal solunumda gözle görülür ve palpe edilebilmektedir.

Fizik muayenede tespit edilemeyen, radyolojik yöntemlerle tanı konulmuş varikozele subklinik varikozel denir. Subklinik varikozelin tedavi edilmesinin sperm parametreleri üzerine etkisi gösterilememiştir. Bu sebeple, klinik pratikte subklinik varikozel tedavi edilmez (57).

Testis boyutları çocuklarda orşidometre ile hesaplanabileceği gibi USG yardımlı elips formülü ile de ölçülebilir (uzunluk x genişlik x kalınlık x 0,52 = volüm) (58).

X. Varikoselde Tedavi

Varikoseli olan infertil erkeklerde tedavi, sperm parametrelerini iyileşmesi ve gebelik oranını arttırmayı hedefler. Çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin muayenesinde erkek partnerde palpabl varikosel mevcutsa bir senelik düzenli ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamama, kadın partnerin muayene ve tetkiklerinde patoloji saptanmaması, erkeğin birden fazla sperm parametrelerinde anormalliklerin olması varikosel tedavi edilmesi gerekir (59).

Normal semen analizi olan erkeklerde ve subklinik varikoseli olan erkeklerde tedavi endikasyonu yoktur (57). Subklinik varikoselin tedavi edilmesinin sperm parametreleri üzerine etkisi gösterilememiştir.

Adolesan erkeklerde varikosel tespit edildiğinde amaç fertilitenin korunmasıdır (59). Testis kıvamında yumuşama, etkilenen testiste orşidometri ile ölçülebilen 2 ml üstü volüm kaybı, etkilenen testiste orşidometri ile ölçülebilen %10'dan fazla volüm kaybı olması, sperm parametresinde bozulma, bilateral palpabl variköz venlerin varlığında cerrahi tedavi planlanmalıdır (60).

Varikosel tedavisinde cerrahi ve perkütan embolizasyon olarak iki temel tedavi yöntemi vardır. Perkütan embolizasyonda dilate ve reflüsü olan internal spermatik vene embolizasyon işlemi uygulanır.

X.A. Varikoselin Cerrahi Tedavisi

Varikosel tedavisinde cerrahi olarak, laparoskopik varikoselektomi ve açık cerrahi yöntemleri mevcuttur. Varikosel tedavisinde dilate ve reflüsü olan ven yapılarının bağlanması, testiküler arterin, lenf damarlarının ve vas deferensin korunması sağlanmalıdır (59). Laparoskopik varikoselektomi batin içine girilerek spermatik venlerin ligasyonu veya bağlanması şeklinde gerçekleştirilir. Palomo tarafından tanımlanan retroperitoneal yaklaşım kolay ve pratik bir yöntemdir. Bu yöntem ile testiküler arter korunmaz ve testiküler ven ile birleşmeden önceki venlerin sayısının fazla olması nedeniyle tekrarlama ihtimali diğer yöntemlere göre fazladır.

Araştırmalar ve yapılan cerrahi tedaviler karşılaştırıldığında düşük ligasyon yöntemleri olan inguinal varikosektomi ve subinguinal varikosektomi yöntemleri ön plana çıkmaktadır, farklı yöntemlere göre daha başarılı sonuçlar alınmıştır. Her iki düşük ligasyon yönteminde de eksternal spermatik ven bağlanabilmektedir. İki yöntem karşılaştırıldığında daha distalde çalışılan subinguinal varikosektomi yöntemi bağlanabilecek ven sayısının daha fazla olması nedeniyle daha fazla tercih edilir. Arterin korunması mikroskop altında değerlendirme ve doppler kullanılması ile diğer yöntemlere göre daha kolaydır.

Mikroskop altında yapıların değerlendirmesi, postoperatif dönemde hidrosel oluşumu ve testiküler arter yaralanması sonrası gelişen testis atrofisi gibi komplikasyonların gelişmesine karşı koruyucudur. Azospermik hastalarda bile mikrocerrahi varikosektominin hareketli sperm oluşumuna yardımcı olabileceği gösterilmiştir (61). Subinguinal varikosektomi ve inguinal varikosektominin karşılaştırıldığı bir çalışmada testis korunması sonuçları benzer bulunmuştur (62).

X.B. Varikoselin Medikal Tedavisi

Varikoselin medikal tedavisi ile ilgili olarak literatürde çok az sayıda deneysel çalışma vardır.

Deneysel varikozel modelini araştıran ve medikal tedavisini araştıran, vitamin E'nin antioksidan etkisi ile testis dokusunda artan ROS üzerine koruyucu etkisi çalışılmıştır (63). Farklı bir çalışmada ise testiste proapoptotik Bax protein artışını ve antioksidan enzim aktivitesinde azalmayı gösterip, malondialdehit düzeylerindeki artışı ortaya koyarken bir antioksidan olan melatoninin bu mekanizmalar üzerine olan düzenleyici etkisini göstermişlerdir (64).

Tadalafil PDE5 inhibitörü grubunun bir üyesidir. cGMP'nin parçalanmasını önleyerek etki gösterir. PDE5 inhibitörleri; pulmoner arteriyel hipertansiyon, erektil disfonksiyon, benign prostat hiperplazisi ile alt üriner sistem semptomlarının tedavisinde kullanılır. Alt üriner sistem semptomları olan erkeklerde kullanımdan iki hafta sonrasında olumlu etkisini

göstermektedir. Erektile disfonksiyon tedavisinde ilişki öncesi en az yarım saat önce alınmalıdır. Cinsel uyarım olmadan etkisini göstermez. İlacın emilimi ve etkisi oral gıda alımından bağımsızdır ve etkilenmez. Yarılanma ömrü PDE5 inhibitörü grubunun içerisinde en uzun olanıdır (17,5 saat), etkisini otuz altı saate kadar korur (65). Uzun etki süresi ile günlük kullanım da tek doz kullanımı uygundur.

Distal üreter taşlarında Medikal Ekspulsif Tedavi (MET) olarak tadalafilin tek başına veya tamsulosin ile kombine şekilde kullanılabileceğini gösteren çalışmalar da literatürde vardır (66). Alfa blokörlerin medikal ekspulsif tedavide kullanımı yaygın olmakla birlikte farklı ilaç kombinasyonlarında bu amaçla kullanılabileceğini gösterilmiştir.

Tadalafilin antioksidan etkisi, Bir PDE5 inhibitörü olan tadalafil ve etken maddeli ilacın antioksidan etkisi birçok çalışmada farklı dokularda araştırılmıştır. Kardiyoprotektif etkisi hayvan çalışmasında tadalafil kullanılarak fosfatidil inositol 3-kinaz uyarısı ile sağlanıp ve sitokrom 3 üzerinden antioksidan antiapoptotik etkisini uzun dönemli ilaç kullanımında gösterilmiştir (67).

Deneyisel sıçan iskemi reperfüzyonunun overler üzerine olan hasarın ve gelişen oksidatif strese karşı etkisi araştırılmış ve tadalafilin koruyucu etkisi gösterilmiştir (68). Sıçanlarda deneyisel prostatit modelinde gelişen enflamatuvar etkiye karşı tadalafilin koruyucu etkisi gösterilmiştir (69).

PDE5 inhibitörleri ayrıca cGMP seviyelerini arttırarak Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazın aktivitesini ve ekspresyonunu da inhibe edebileceği gösterilmiştir (70).

Sık kullanılan bir kemoterapötik ajan olan sisplatin verilen sıçanlarda testis atrofisine karşı tadalafilin koruyucu etkisi araştırılmış, tadalafilin antioksidan etkisi ile testislerde korunma sağladığı gösterilmiştir (4). Bu etkide ilacın antioksidan etkisi sorumlu tutulmuş ve Rho-kinaz aşırı gen aktivitesine bağlı apoptozis gelişimini engellediği gösterilmiştir. Sisplatin üzerine yapılan nefrotoksisite üzerine bir çalışmada Rho-kinaz ve tadalafil

etkisi gösterilmiştir (71). Başka bir çalışmada ise hiperoksinin neden olduğu oksidatif stres araştırılmış ve tadalafil verilen sıçan grubu ile karşılaştırılmıştır (72).

Katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinin tadalafil verilen grupta, kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edilmiştir.



GEREÇ VE YÖNTEM

I. Deney Hayvanları

Bu çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanı Üretimi ve Deneysel Araştırma Laboratuvarında (BUÜ–DENHAB) gerçekleştirildi. 21.03.2023 tarihinde Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2023-05/10 karar numarası ile onay alındı. Tüm araştırmacılar çalışma öncesinde Helsinki Bildirgesi'ni imzaladı.

BUÜ–DENHAB biriminden temin edilen 24 adet erkek Wistar albino sıçan ile çalışıldı. Sıçanların ortalama ağırlıkları 300-450 gram olarak çalışmaya dahil edildi. Ortalama ağırlık 370 gramdı. Standart gün ışığı alan laboratuvar ortamında, tüm hayvanlara standart beslenme ve bakım koşulları sağlandı. Optimum barınma şartlarında bakılan hayvanlar üç gruba ayrıldı. Hayvanların yetmiş beş gün boyunca bakım ve beslemesi standart olarak sağlandı.

II. Çalışma Grupları

Erkek Wistar albino sıçanlar 3 gruba ayrıldı. Cerrahi öncesi denek sıçanlara 12 saatlik açlık sağlandı. Sıçanlar antisepsi kurallarına uyularak, vücut ısıları korunacak şekilde ve laboratuvar şartlarında operasyona alındı. Anestezi sevofloran %4-8 inhalasyon yolu ile sağlandı. Cerrahi sırasında mikrocerrahi set kullanılmıştır. Her denekte cerrahi sonrası mikrocerrahi sete gerekli dezenfeksiyon işlemi, etkinleştirilmiş gluteraldehit solüsyonu ile uygulandı. Sonrasında distile su ile sterilitesi korunarak durulandı.

Deneysel varikozel modeli için sıçanlarda yeterli anestezi sağlandıktan sonra supin pozisyonda batın orta hat kesisi ile çalışıldı, cilt, linea alba ve periton Metzenbaum Makas yardımı ile açıldı, jejunum ve ileum batın sağ tarafına lateralize edildi sol böbrek ve renal ven ve vena cava ve sol internal spermatik ven izlendi ardından sol renal venin altından ve sol internal spermatik venin medialinden olacak şekilde kanama olmaksızın dönüldü ve serbestlendi ardından 20 G iğne (0,85mm) ile 4/0 ipek yardımı ile dönüldü ve

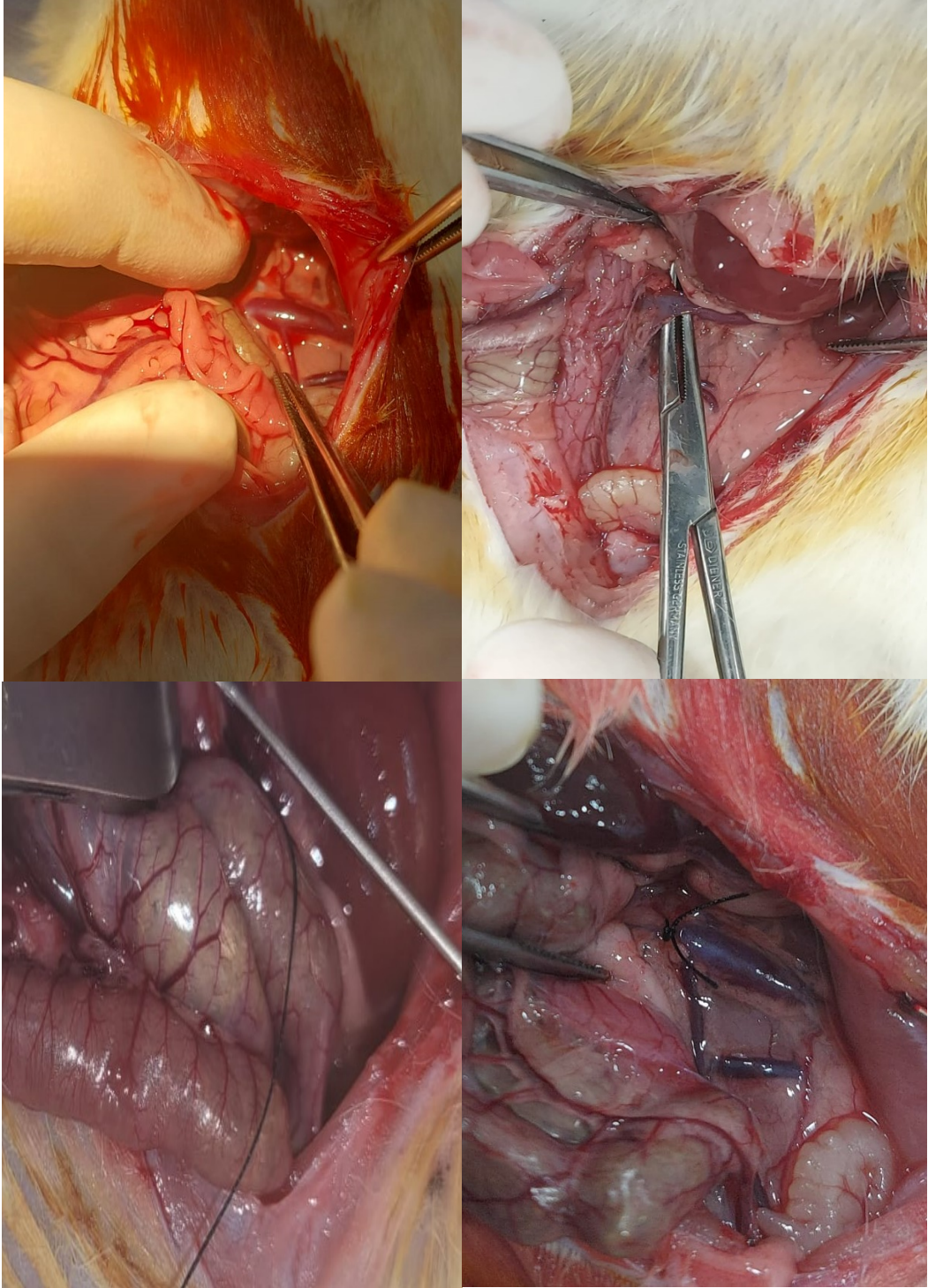
iğne ile bağlandı. Sonrasında iğne dikkatli bir şekilde kanama olmaksızın çekilip parsiyel obstrüksiyon sağlandı (Şekil-4). Batın 3/0 Ethicon ile kapatılıp cilt primer olarak kapatıldı (5).

Grup 1: Sham grubu (n=8), hayvanların anestezisi sağlandıktan sonra sırtüstü pozisyonda yatırılarak, orta hat vertikal karın insizyonu ile abdomene girildi. Sol renal venin altından ve sol internal spermatik venin medialinden olacak şekilde kanama olmaksızın eğri peyam yardımı ile dönüldü ve serbestlendi sonrasında batın 3/0 Ethicon ile kapatılıp cilt primer olarak kapatıldı. Bu gruptaki hayvanlara yetmiş beş gün boyunca grup 3 ile benzer miktarda ilaç içermeyen çeşme suyu günlük gauge gavaj yardımı ile oral olarak verildi. Hayvanların yetmiş beş gün boyunca bakımı ve beslemesi sağlandı. Yetmiş beş günün sonunda hayvanlar servikal dislokasyonla ötenazi edildi ve sol testisi ve sol epididimisi diseke edildi.

Grup 2: Varikozel grubu (n=7), hayvanların anestezisi sağlandıktan sonra sırtüstü pozisyonda yatırılarak orta hat vertikal karın insizyonu ile abdomene girildi. Sol renal venin altından ve sol internal spermatik venin medialinden olacak şekilde kanama olmaksızın eğri peyam yardımı ile dönülüp serbestlendi. Renal venin üzerine 20 G iğne (0,85 mm) konularak 4/0 ipek yardımı ile bağlandı. Sonrasında iğne dikkatli bir şekilde kanama olmaksızın çekilip sol renal ven üzerinde parsiyel obstrüksiyon sağlandı. Batın 3/0 Ethicon ile kapatılıp cilt primer olarak kapatıldı. Bu gruptaki hayvanlara yetmiş beş gün boyunca grup 3 ile benzer miktarda ancak tadalafil içermeyen çeşme suyu günlük gauge gavaj yardımı ile oral olarak verildi. Hayvanların yetmiş beş gün boyunca bakımı ve beslenmesi sağlandı. Yetmiş beş günün sonunda hayvanlar servikal dislokasyonla ötenazi edildi ve sol testisi ve sol epididimisi diseke edildi.

Grup 3: Varikozel+tadalafil grubu (n=9), hayvanların anestezisi sağlandıktan sonra sırtüstü pozisyonda yatırılarak, orta hat vertikal karın insizyonu ile abdomene girildi. Sol renal venin altından ve sol internal spermatik venin medialinden olacak şekilde kanama olmaksızın eğri peyam yardımı ile dönülüp serbestlendi. Renal venin üzerine 20 G iğne (0,85 mm)

konularak 4/0 ipek yardımı ile bağlandı. Sonrasında iğne dikkatli bir şekilde kanama olmaksızın çekilip sol renal ven üzerinde parsiyel obstrüksiyon sağlandı. Batın 3/0 Ethicon ile kapatılıp cilt primer olarak kapatıldı. Bu gruptaki hayvanlara yetmiş beş gün boyunca tadalafil 0,4 mg/gün (5 mg Tadalafil içeren ilaç ezilerek 25 cc çeşme suyu içerisinde tamamen çözüldü ve ortalama 400 gramlık hayvan için 1mg/kg/gün olacak şekilde hazırlandı. Bu gruptaki hayvanlar için hazırlanan çözeltiden 2 cc olacak şekildedir.) dozda çeşme suyu ile dilüe edilerek verildi. Tadalafilli çözelti gauge gavaj yardımı ile oral günlük olarak verildi. Hayvanların yetmiş beş gün boyunca bakım ve beslemesi diğer gruplar ile aynı olacak şekilde yapıldı. Yetmiş beş günün sonunda hayvanlar servikal dislokasyonla ötenazi edildi ve sol testisi ve sol epididimisi diseke edildi.



Şekil-4: Sıçanlar üzerinde oluşturulan deneysel varikosel modelinin aşamaları.

III. Testis Dokusu Histolojik Prosedür ve Değerlendirme İşlemi

Her gruptan alınan testis dokuları %10 formol solüsyonuna konarak tespit edildi. Tespit edilen örneklerle rutin histolojik prosedür uygulandı. Örnekler alkol serilerinden ve ksilolden geçirildi ve sonrasında parafinde bekletildi ve dokuların blokajı yapıldı. Parafin bloklardan 5 µm kesitler alınarak histomorfolojik değerlendirme için Crossman'nın modifiye üçlü boyası ile boyandı.

Boyanan doku kesitlerinde seminifer tübüller Nikon Eclipse 80i mikroskobu ile değerlendirildi. Testislerde spermatogenezis Modifiye Johnsen skoru ile aşağıdaki belirtildiği şekilde değerlendirildi.

III.A. Modifiye Johnsen Skorunun Değerlendirilmesi

Masson Trichrom boyama ile boyanan preparatlar spermatogenezi değerlendirmek için ışık mikroskobu ile değerlendirildi. Modifiye Johnsen skorlaması, hücre olgunluk sırasına göre düzenlenmiş hücre tiplerini değerlendiren, 1 ile 10 arasında bir ölçekte spermatogenezi değerlendirir. Bir Johnsen skoru 9 veya 10 normal histolojiyi gösterir, 8 puan hipospermatogenezi gösterir, 3-7 skoru matürasyon durması, 2 skoru germinal hücre aplazisi (Sertoli only cell) ve 1 skoru tübüler fibrozisi gösterir (Tablo-1)

Tablo-1: Modifiye Johnsen skorlaması.

Skor	Modifiye Johnsen testis histolojisinin değerlendirilmesi
10	Tam spermatogenezis
9	Hafifçe bozulmuş spermatogenezis
8	Her bir tübülde beşten az spermatozoa
7	Olgun spermatit yok ama çok sayıda genç spermatit
6	Az sayıda genç spermatit, spermatogenezisin spermatit devresinde durma
5	Çok sayıda spermatosit
4	Az sayıda spermatosit, spermatogenezisin primer spermatosit devresinde durma
3	Sadece spermatogonya
2	Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel hücreleri yok, tübüler sklerozis

IV. Apoptozis Değerlendirilmesi

TUNEL yöntemi ile DNA kırıkları in situ olarak tanımlanabilir. Apoptotik parçalanma nedeniyle DNA uçları, DNA polimeraz fragmenti kullanılarak işaretlenir. Terminal deoksिनükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme diğer yöntemlere kıyasla daha duyarlı bir yöntem olarak değerlendirilir. Parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler kullanılarak yapılan in situ işaretleme sonrası floresan veya enzimatik görüntülemeye, apoptotik hücreleri işaretlemede kullanılır. Bu yönteme “TdT-dUTP nick-end-labelling” kelimelerinin baş harflerinin birleşimi olan “TUNEL” yöntemi olarak bilinir (73).

Apoptotik hücrelerin göstermek için her numuneden alınan kesitler TUNEL metodu ile boyanır. Her preparat DNaz I (Roche, Indianapolis, ABD) ile TUNEL boyaması öncesinde 37°C’de 30 dakika süreyle ön işleme tabi tutulur. Apoptozun tespitinde ApopTag kiti üreticinin protokolüne göre kullanıldı. Protokol deparafinize edilmiş ve hidratlanmış kesitler PBS içerisinde yıkandı ve 20 dakika süreyle 37°C’de, 20 mg/L proteinaz K ile

işleme tabi tutuldu. PBS'de durulanan numuneler, odada 5 dakika süreyle %3 H₂O₂ içerisinde konularak yıkandı. Preparatlar distile suda durulandı ve sonra on dakika süreyle kesitlere dengeleme tamponu uygulandı. Ardından reaksiyon tamponu ve terminali içeren çalışma tamponu ile 37°C'de inkübe edildi. Deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi nemlendirilmiş bir odada bir saat bekletilerek, kesitlerin yıkama tamponunda PBS içerisinde durulanır. Numuneler daha sonra anti-digoksinin peroksidaz konjugatında 30 dakika süreyle oda sıcaklığında inkübe edildi. Ardından kesitler PBS'de yıkandıktan sonra, 10 dakika süreyle Peroksidaz renklendirme reaksiyonu için DAB (3,3'-diaminobenzidin) daldırıldı ve kesitler metil yeşili (0,1 M sodyum asetat içinde %0,5, pH 4,0) ile kontrastlanma yapıldı. Damıtılmış su ile mikroskop altında incelenecek (Nikon Eclipse 80i; Tokyo, Japonya). Negatif kontroller ise, bölümler yalnızca TUNEL ile inkübe edilerek; TdT veya anti-digoksinin antikoru ile boyanmadı.

IV.A. Apoptotik İndeksin Değerlendirilmesi

Apoptozisin tespitinde kullanılan birkaç yöntem bulunmaktadır. Çalışmamızda apoptotik indeksin hesaplanması için TUNEL boyası kullanıldı. TUNEL boyası ile boyanan preparatlar 100x büyütme altında Nikon Eclipse 80i mikroskobu ile değerlendirildi. Her preparat için 20 adet enine kesit seminifer tübül değerlendirildi. Her tübülde, TUNEL boyası ile boyanan apoptotik hücreler sayıldı ve seminifer tübül içerisindeki toplam hücre sayısına bölünerek apoptotik indeks hesaplandı (74). Sıçanlarda deneysel varikozel oluşturulan ve apoptozis gelişimini inceleyen bir çalışmada varikozel oluşturulması sonrası haftalık gruplara ayrılmış ve ikinci haftadan itibaren kontrol grubuna oranla apoptotik indekste istatistiksel bir artış saptanmıştır (75).

V. Testis İçerisinde Venlerin Değerlendirilmesi

Her gruptan alınan testis dokuları %10 formol solüsyonuna konarak tespit edilecektir. Tespit edilen örnekler rutin histolojik prosedür uygulandı. Örnekler alkol serilerinden ve ksilolden geçirildikten sonra, parafinde bekletildi ve dokuların blokajı yapıldı. Parafin bloklardan 5 µm kesitler

alınarak histomorfolojik değerlendirme için Crossman'nın modifiye üçlü boyası ile boyandı.

Hazırlanan her preparat mikroskop altında incelendi (Nikon Eclipse 80i; Tokyo, Japonya). Onluk büyütme altında bir cm uzunluğu yüz eşit parçaya bölen ve her bir birimin yüz mikrometreye eşit olduğu mercek altında büyütmede değerlendirildi ve görülen ven sayıları, her venin kısa çapı, tunika media tabakası kalınlığı ve tunika adventisya tabakası ayrı ayrı olacak şekilde ölçüldü ve kaydedildi. Her preparatın bu dört parametresi ayrı olarak preparat içerisindeki tüm venlerde hesaplandı ve ortalaması alındı. Her grubun ortalaması preparat ortalamaları ile tekrar hesaplandı. Ortalama alınan değerleri ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

VI. Semen Örneklerinin Alınması

Grupların semen örneği toplanmasında epididim diffüzyon methodu kullanıldı. Testis dokusundan ayrılan epididim dokuları her denek için ayrı olacak şekilde 37°C'de içerisinde HEPES bulunan bir petri kap içerisinde, kauda epididim dokuları bistüri ile açıldı. Tübül segmentleri hava ile temas etmemesi için tampon içerisine düzgün bir şekilde yerleştirildi. Sperm hücrelerinin kap içerisinde yayılması için üç dakika inkübe olması için beklenildi ve dağılıncaya kadar beklenildi ve dokular kaptan çıkarıldı.

VII. Semen Örneklerinin Değerlendirilmesi

Sperm sayısı değerlendirilmesinde 5 µL inkübe edilen solüsyon tüp içerisine toplamda 1000 µL olacak şekilde dilüe edildi. Değerlendirme mikroskop (Nikon Alphaphot YS, Japonya) altında neubauer hemositometre lamında yapıldı.

Her odacık 10 µL dilüe edilmiş solüsyon yerleştirildi ve 2 dakika beklenildi. Her bölmedeki baş, boyun ve kuyruktan oluşan eksiksiz sperm hücreleri sayıldı. Sperm sayısı $\times 10^7$ /ml olarak ifade edildi.

Sperm motilitesinin değerlendirilmesinde mikroskop altında 5 µL inkübe edilen solüsyon yerleştirildi. Motilite her alınan örnekte 3 farklı alanda

mikroskop altında 400x büyütmede değerlendirildi ve yüzde olarak ifade edildi.

Spermin morfolojisinin değerlendirilmesinde histolojik slaytlar hazırlandı ve Giemsa boyası ile boyandı. 90 dakika üzerinde kurutma süresi beklenildi ve 200 spermatozoa değerlendirecek şekilde x1000 büyütmede mikroskop altında değerlendirildi. Anormal morfolojide olan hücreler yüzde olarak tanımlandı.

VIII. İstatistiksel Analiz

Çalışmada her bir grupta bulunması gereken denek sayısı kaynak eşitlik yöntemi kullanılarak belirlenmiştir (76). Buna göre her bir grupta en az 4 ve en fazla 8 denek olacak şekilde örneklem genişliği hesaplanmış olup toplamda ise çalışmaya alınacak olan denek sayısı minimum on iki, maksimum yirmi dört deney hayvanı olacak şekilde belirlenmiştir. Çalışma tasarımından kaynaklanabilecek olası kayıplar da dikkate alınarak çalışmaya her bir grup için sekiz, toplamda ise yirmi dört deney hayvanı alınması uygun görülmüştür.

Çalışmada Modifiye Johnsen skoru ve apoptotik indeks değerleri medyan, minimum ve maksimum değerleri ile ifade edilmiş olup gruplar arası karşılaştırmalarda ve testis içerisinde ven yapılarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Kruskal Wallis testi sonrasında genel anlamlılık elde edilmesi durumunda alt grup analizler Dunn Bonferroni testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Motilite, sperm sayısı, akrozomal defekt ve morfolojik defekt oranı ölçümleri ortalama ve standart sapma değerleri ile ifade edilmiş olup gruplar arası karşılaştırmaları ANOVA testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler SPSS (IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp.) programı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, tip I hata düzeyi %5 olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR

I. Modifiye Johnsen Skorlaması

Her grubun sol testislerinden alınan örneklerin Modifiye Johnsen skorları karşılaştırılmıştır. 1-10 arasında değerlendirme yapılan Modifiye Johnsen skorlamasının, hücre olgunluk sırasına göre düzenlenmiş ana hücre tiplerini değerlendiren, 1 ila 10 arasında bir ölçekte spermatogenezi değerlendirir.

Bir Johnsen skoru 9 veya 10 normal histolojiyi gösterir, 8 puan hipospermatogenezi gösterir, 3-7 skoru matürasyon durması, 2 skoru germinal hücre aplazisi (Sertoli only cell) ve 1 skoru tübüler fibrozisi temsil eder.

Gruplar arasında Modifiye Johnsen skoruna göre fark saptanmıştır ($p=0,006$). Kontrol grubu olan ve normal popülasyonu temsil edecek şekilde planlanan grup 1'in Modifiye Johnsen skoru 9,1 olarak bulundu. Varikozel oluşturulan Grup 2'de 7,2 olarak bulundu ve Varikozel oluşturulup tedavil verilen grup 3'te 7,9 olarak bulundu (Tablo-2) (Şekil-5). Alt grup analizlerde grup 1'in Modifiye Johnsen değerinin grup 2'ye göre daha yüksek olduğu saptandı ($p=0,005$) (Tablo-3). Grup 1 ve grup 3 arasında ve grup 2 ve grup 3 arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı saptandı ($p>0,05$) (Şekil-5) (Şekil-6).

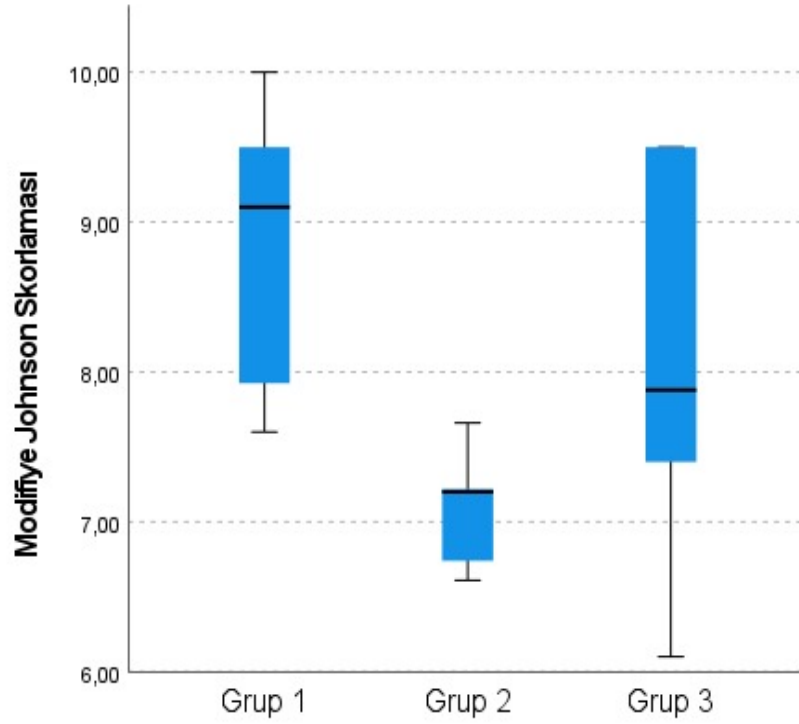
Tablo-2: Grupların Modifiye Johnsen skorları minimum, median, maksimum değerleri.

Gruplar	Median	Minimum	Maksimum
Grup 1	9,1	7,6	10
Grup 2	7,2	6,6	7,7
Grup 3	7,9	6,1	9,5

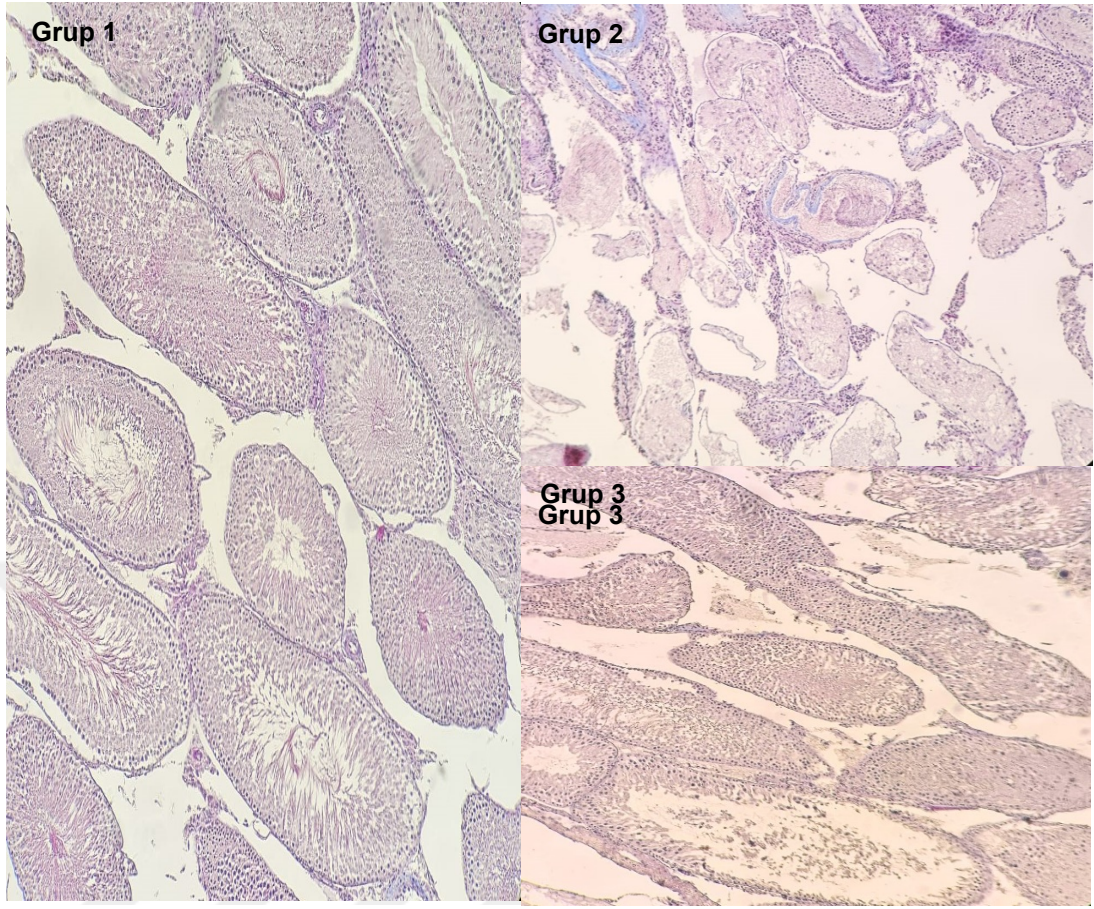
Tablo-3: Gruplar arası Modifiye Johnsen skorlarının istatistiksel analizi.

Karşılaştırılan gruplar	Düzeltilmiş anlamlılık düzeyi
Grup 2, Grup 3	0,14
Grup 2, Grup 1	0,005
Grup 3, Grup 1	0,563

Alt grup analizler Dunn Bonferroni testi ile gerçekleştirildi, anlamlılık düzeyi $p < 0,05$.



Şekil-5: Gruplar arası Modifiye Johnsen skorlarının grafik gösterimi.

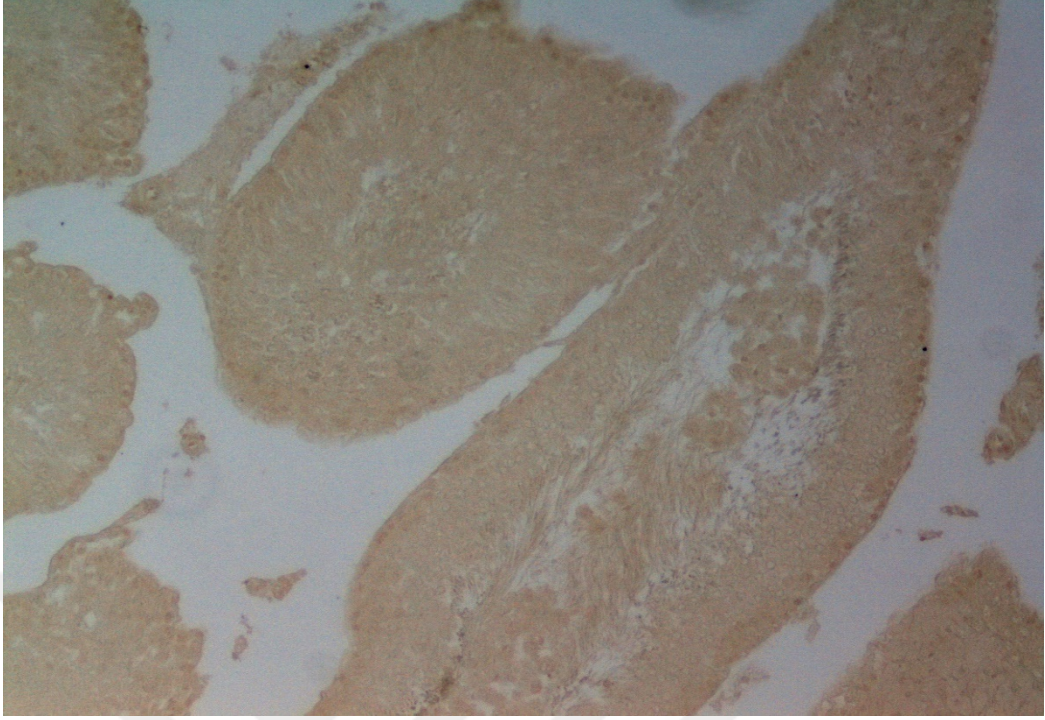


Şekil-6: Grup 1 kontrol grubunun seminifer tübül yapıları (Grup 1), grup 2 varikozel oluşturulan grubunun seminifer tübül yapıları (Grup 2), grup 3 varikozel oluşturulan ve tadalafil başlanan varikozel grubunun seminifer tübül yapıları (Grup 3).

II. TUNEL Boyaması ile Apoptozisin Değerlendirilmesi

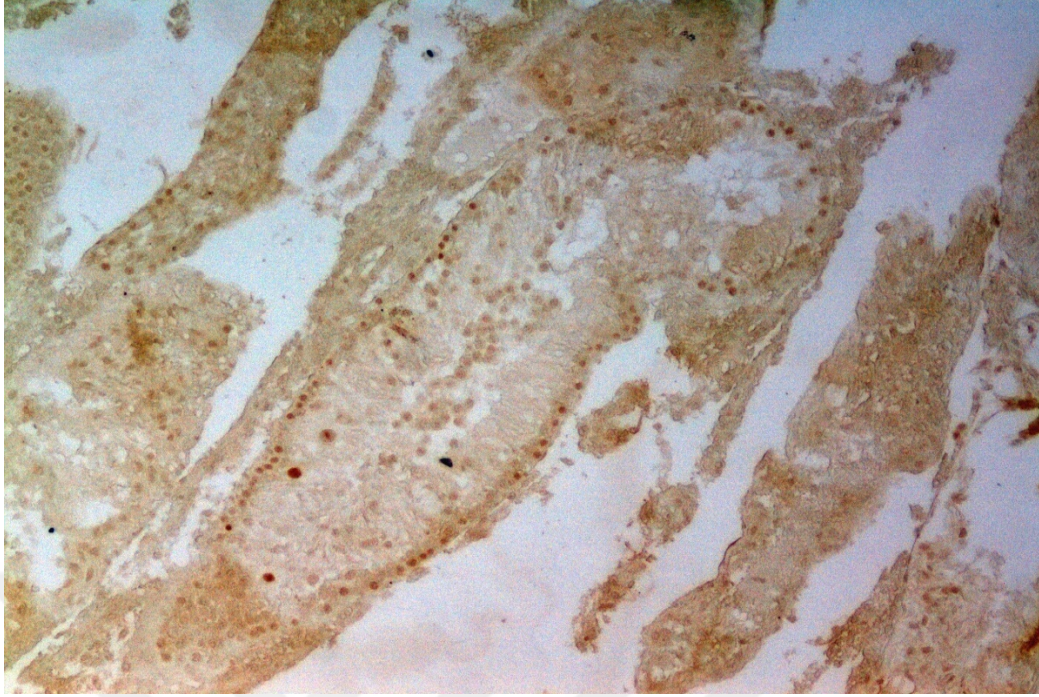
Apoptotik parçalanma nedeniyle DNA uçları, DNA polimeraz fragmenti kullanılarak işaretlenir. Terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak değerlendirilir. Her üç grup için değerlendirilecek olan preparatlar aynı şekilde hazırlanmış ve görülen patolojiler kaydedilmiştir.

Grup 1: Leydig hücrelerinde TUNEL boyası ile apoptotik reaksiyona rastlanmamıştır. Seminifer tübül epitelinde genel olarak apoptotik reaksiyon gözlenmemiştir. Her slaytta sadece birkaç seminifer tübül duvarında bir iki adet TUNEL boyası ile pozitif apoptotik reaksiyon gösteren ve farklı aşamalarda bulunan hücrelere rastlanmıştır (Şekil-7).



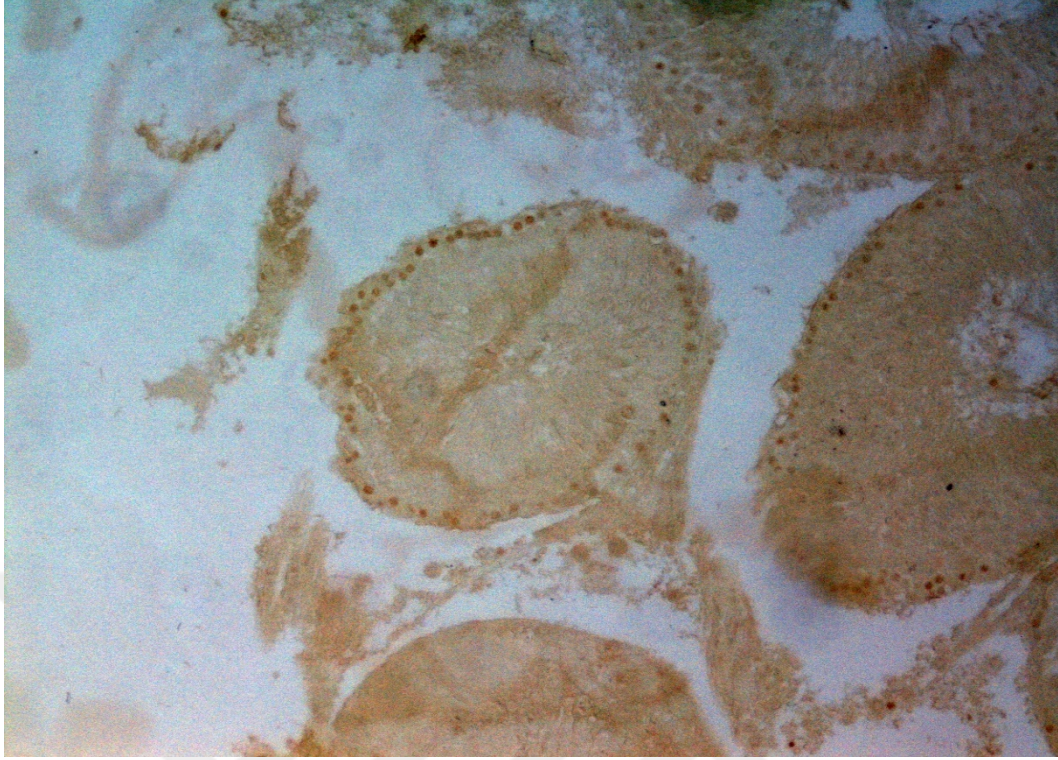
Şekil-7: Grup 1 TUNEL boyası ile boyalı preperatın mikroskop altında görüntüsü.

Grup 2: Leydig hücrelerinde TUNEL boyası ile yaygın pozitif apoptotik reaksiyon izlenmiştir. Seminifer tübül epitelinde ve duvarında sperm üretiminin tüm aşamalarında yaygın pozitif apoptotik reaksiyon izlenmiştir (Şekil-8).



Şekil-8: Grup 2 TUNEL boyası ile boyalı preperatın mikroskop altında görüntüsü

Grup 3: Leydig hücrelerinde TUNEL boyası ile nadiren pozitif apoptotik reaksiyon izlenmiştir. Tübül epitelindeki pozitif apoptotik reaksiyon spermatogonyumlarla sınırlı kalmıştır. Spermatogenik serinin diğer hücrelerinde pozitif apoptotik reaksiyon saptanmamıştır (Şekil-9).



Şekil-9: Grup 3 TUNEL boyası ile boyalı preparatın mikroskop altında görüntüsü.

II.A. Apoptotik İndeks

TUNEL boyası ile boyanan preparatlar değerlendirildi. Apoptotik indeks değeri 3 grup arasında da farklılık göstermektedir ($p < 0,001$).

Grup 1 için apoptoz indeksine ait medyan değer 0,05, grup 2 için 0,25 ve grup 3 için 0,15 idi (Tablo-4) (Şekil-10). Alt grup analizlerde grup 2'nin, grup 1 ve grup 3'e göre apoptotik indeks değeri daha yüksek olup ($p < 0,001$ ve $p = 0,004$) grup 3'ün indeks değerinin de grup 1'e göre daha yüksek olduğu saptandı ($p = 0,002$) (Tablo-5).

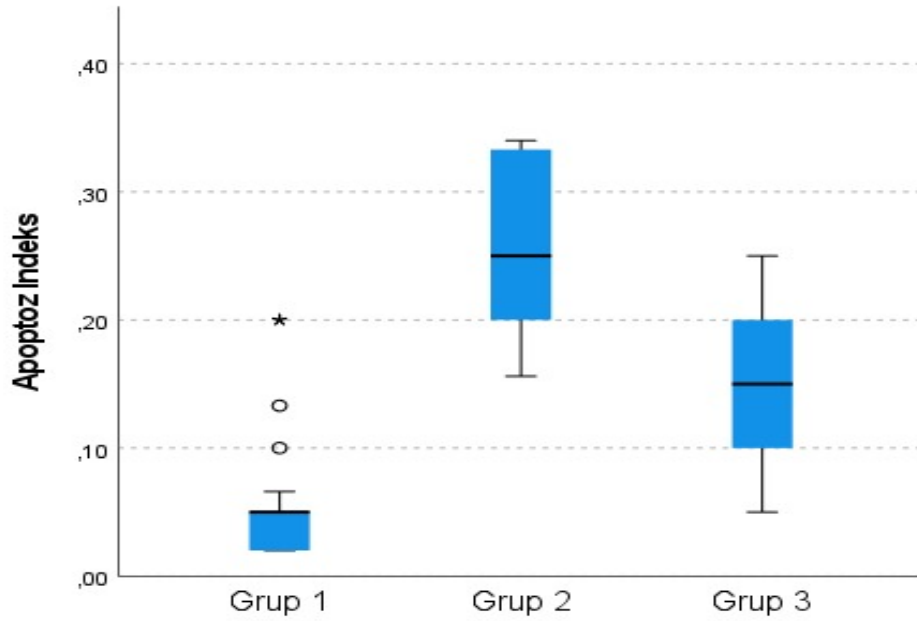
Tablo-4: Gruplar arası apoptotik indeks değerleri, gruplar arasında median, minimum ve maksimum değerleri.

Gruplar	Median	Minimum	Maksimum
Grup 1	0,05	0,02	0,20
Grup 2	0,25	0,16	0,34
Grup 3	0,15	0,05	0,25

Tablo-5: Gruplar arası apoptotik indeks değerleri istatistiksel analizi.

Karşılaştırılan gruplar	Düzeltilmiş anlamlılık düzeyi
Grup 1, Grup 3	0,002
Grup 1, Grup 2	<0,001
Grup 3, Grup 2	0,004

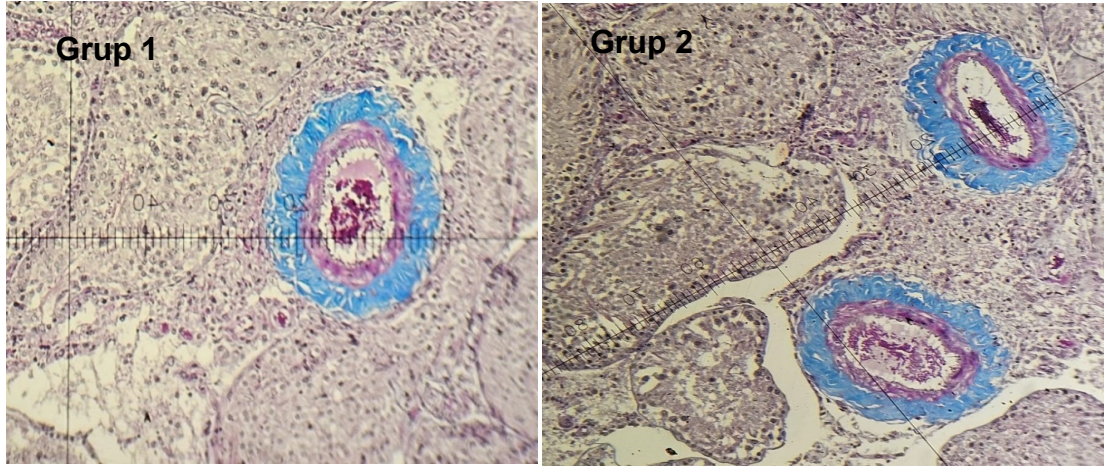
Alt grup analizler Dunn Bonferroni testi ile gerçekleştirildi, anlamlılık düzeyi $p < 0,05$



Şekil-10: Gruplar arası apoptotik indeks değerleri grafik gösterimi.

III. Testis İçerisindeki Venlerin Değerlendirilmesi

Masson Trichrom ile boyanan sol testis preparatları ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Tüm preparat bu değerlendirme sırasında ayrı olarak değerlendirildi. Her preparatta ven sayısı, kısa lümen çapı, tunika media ve tunika adventisya tabakalarının okülometri yardımı ile ölçülmüştür, ölçülen venler her preparat için ortalama lümen çapı, tunika media ve tunika adventisya tabakaları bulunmuş ve her grubun kendi arasında bu üç parametrede ortalama değerleri alınmıştır (Tablo-6). Okülometride her bir birim 100 mikrometre olarak değerlendirildi (Şekil-11).



Şekil-11: Grup 1 ve Grup 2'nin ven yapılarının fotoğrafları okülometri ölçümleri fotoğrafta görülmektedir.

Tablo-6: Testis içi ven yapılarının median, minimum ve maksimum değerleri.

Grupların ven yapısı	Median	Minimum	Maksimum
Grup 1 damar sayısı	5	2	7
Grup 1 damar çapı	18,73	11	25,29
Grup 1 tunika media	1,5	1	1,67
Grup 1 tunika adventisya	3	1	3,57
Grup 2 damar sayısı	6	2	9
Grup 2 damar çapı	22	15,25	27
Grup 2 tunika media	2,57	1,33	3
Grup 2 tunika adventisya	3,42	2,25	5
Grup 3 damar sayısı	5	2	8
Grup 3 damar çapı	18,1	14,75	24,75
Grup 3 tunika media	2,42	1,75	3,13
Grup 3 tunika adventisya	3,28	1,67	4,5

Tablo-7: Testis içi ven yapılarının istatistiksel analizi.

Testis içi ven yapıları	Düzeltilmiş anlamlılık düzeyi
Ortalama ven sayısı	0,790
Ortalama kısa lümen çapı	0,276
Ortalama tunika media	0,001
Ortalama tunika adventisya	0,184

Kruskal Wallis testi anlamlılık düzeyi $p<0,05$

Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında ven sayıları, lümen çapları ve tunika adventisya tabakaları arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo-7). Deneysel sol varikozel oluşturulan grup 2 ve grup 3'ün sol testis içi venlerinde tunika media tabakasının grup 1'e göre kalınlık artışında anlamlı bir fark bulunmuştur. Grup 1, grup 2 ile karşılaştırıldığında grup 2'nin grup 1'e göre istatistiksel olarak tunika media tabakasında artış olduğu saptandı ($p=0,008$). Grup 1, grup 3 ile karşılaştırıldığında grup 3'ün grup 1'e göre istatistiksel olarak tunika media tabakasında artış olduğu saptandı ($p=0,004$). Grup 2 ve grup 3 arasında tunika media tabakaları arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır (Tablo-8).

Tablo-8: Gruplar arasında tunika media tabakalarının istatistiksel karşılaştırılması.

Karşılaştırılan gruplar	Düzeltilmiş anlamlılık düzeyi
Grup 1, Grup 2	0,008
Grup 1, Grup 3	0,004
Grup 2, Grup 3	1

Alt grup analizler Dunn Bonferroni testi ile gerçekleştirildi, anlamlılık düzeyi $p<0,05$

IV. Sperm Parametreleri

Motilite ortalamalarına göre gruplar arasında farklılık saptandı ($p<0,001$). Alt grup analizlerde grup 1 ve grup 3'ün ortalama motilite ölçümlerinin grup 2 ye göre daha yüksek olduğu belirlenmiş olup ($p<0,05$), grup 1 ve grup 3 arasında ise farklılık olmadığı belirlendi ($p>0,05$).

Morfolojik defekt oranları göre gruplar değerlendirildi. Ölçümlerine göre gruplar arasında farklılık saptandı ($p<0,001$). Alt grup analizlerde grup 1 ve grup 2'nin ortalama ölçümlerinin grup 3'e göre daha yüksek olduğu belirlenmiş olup ($p<0,05$), grup 1 ve grup 2 arasında ise farklılık olmadığı belirlendi ($p>0,05$). Grup 1 ve grup 2'nin morfolojik defekt oranları bezer gelirken, Grup 3'ün morfolojik defekt oranı daha düşük saptandı.

Sperm sayısı ölçümleri arasında gruplar arasında farklılık saptandı ($p<0,001$). Alt grup analizlerde ve gruplar arasında yapılan tüm ikili karşılaştırmalarda da yine farklılık saptandı ($p<0,001$). Grup 3'ün ortalama sperm sayısı grup 1 ve grup 2'den daha yüksek ve grup 2'nin ortalama sperm sayısı da grup 1'den daha yüksek saptandı. Akrozomal defekt oranları gruplar arasında fark saptanmadı (Tablo-9).

Tablo-9: 3 grup içindeki hayvanların sakrifikasyonu sonrası sol kauda epididim dokusundan alınan örneklerin ortalama değerlerinin karşılaştırılması.

Gruplar	Motilite (%)	Sperm Sayısı ($\times 10^7/\text{mL}$)	Akrozomal Defekt (%)	Morfolojik Defekt (%)
Grup 1	51,25 $\pm$ 7,43 ^b	3,38 $\pm$ 0,60 ^a	1,00 $\pm$ 0,0	15,50 $\pm$ 0,95 ^a
Grup 2	40,00 $\pm$ 6,36 ^a	5,29 $\pm$ 0,71 ^b	1,00 $\pm$ 0,0	14,71 $\pm$ 0,78 ^a
Grup 3	60,00 $\pm$ 6,87 ^b	8,67 $\pm$ 0,47 ^c	1,00 $\pm$ 0,0	11,33 $\pm$ 0,69 ^b

Veriler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde yazılmıştır.

a,b ve c: Her parametre için aynı sütunda farklı üst simgelere sahip değerler anlamlı şekilde farklıdır $p<0,05$.

TARTIŞMA

Çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerde erkek kaynaklı tedavi edilebilir infertilite ve subfertilitenin en sık sebebi olan varikosele yönelik tedavi yaklaşımları cerrahi olarak varikoselektomi ve daha az tercih edilen perkütan venöz embolizasyon işlemleridir (77). Çoğunlukla tek taraflı olan varikosel tedavisinde subinguinal varikoselektomi güncel pratikte tedavide kullanılan en sık yöntemdir. Sperm parametrelerinde artış sağlanabilmektedir ancak bazı hastalarda bu artış beklenildiği gibi olmamakta veya sperm parametreleri daha da bozulabilmektedir. Tedavide cerrahi ve invaziv yöntemlere bağlı gelişebilecek komplikasyonlar açısından da risklere sahiptir ve yeniliklere açıktır. Varikoselin sebep olduğu değişiklikler çok faktörlüdür. Testis içerisinde ısı artışına bağlı gelişen stres, venöz geri dönüşün bozulması, artan oksijen radikalleri, renal adrenal venöz reflü, hormonal değişiklikler, artan germ hücre apoptozisi ve düşük ATP düzeyleri varikoselli hastalarda sperm motilitesi başta olmak üzere sperm parametrelerini etkilediği düşünülmektedir (3).

Varikosele bağlı olarak apoptozis oranlarında değişim gözlemlenmektedir. Tüm dokularda olduğu gibi testis dokusunda da apoptozis düzenleyici bir rol oynamaktadır. Apoptozis sayesinde testiste sperm üretimi, sayı ve fonksiyonlarının korunmasını sağlamaktadır. Varikosele bağlı apoptozis seviyelerinin normalin üstünde artış olması beklenmektedir. Varikoseli olan ve olmayan ergenlik çağındaki erkeklerin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise ejakülat örnekleri değerlendirilmiş ve apoptotik dengede bir kayma olduğu ve DNase 1 seviyelerinde azalma olduğu saptanmıştır (79).

Güncel üroloji pratiğinde varikoselin tedavisi sperm parametrelerinde bozulmaya bağlı subfertilite ve infertilite durumunda uygulanmaktadır. 3-5 günlük cinsel perhiz ile alınan en az iki spermiyogram testinde de sperm parametrelerinde bozulmanın olması tedavi endikasyonunu doğurur. Sperm

parametresinde varikosele bağlı olan değişiklikler hücre sayısında, motilitede ve hücre morfolojisi üzerine olmaktadır. Sperm parametreleri normal kabul edilen sınırlarda olan ve subklinik varikoseli olan hastalarda tedavi gerekmez (80). Varikoseli olan hastalarda retrospektif yapılan bir çalışmada varikosele derecesi ile sperm parametrelerindeki bozulmanın doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (81).

Çok merkezli bir meta analiz çalışmasında varikoselektominin semen örneğinde DNA fragmentasyonu seviyesi üzerine etkisi ve sperm parametrelerine olan etkisi araştırılmıştır. Oksidan strese bağlı artan DNA fragmentasyonu seviyesi operasyon ile anlamlı derecede azalmış ve sperm parametrelerinde anlamlı bir düzelme sağladığı görölmüştür (82). Anormal DNA fragmentasyonu seviyelerine sahip hastalarında varikoselektomi endikasyonunun olduğu göstermiştir (67,68,69).

Varikoseli olan infertil hastaların ve kontrol grubun semen parametrelerinin ve reaktif oksidan seviyelerini araştırarak farklı bir çalışmada da artmış reaktif oksidan seviyeleri ve sperm parametreleri üzerine etkisi gösterilmiştir (83).

Hayvan modelleri hastalığın patofizyolojisini anlamak, deney sonrası dokudaki değişiklikleri anlamak ve güncel tedavilere farklı bir bakış açısı sunabileceği için değerli çalışmalardır. Varikosele modeli çeşitli hayvanlarda denenmiş ve benzer patofizyolojik durumu oluştırmada başarılı sonuçlar sağlayan bir yöntemdir.

Çalışmamız deneysel varikosele modeli oluştırulan sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. İlk grup Sham grubu olarak ayrıldı. Antioksidan olarak tadalafile verilen varikosele oluştırulan grup 3 ve varikosele oluşturulup ilaç verilmeyen grup 2 olarak ayrıldı. Yetmiş beş günlük takibin ardından denekler sakrifiye edildi.

Testis tüböl yapılarını ve germ hücre üretimini değerlendiren Modifiye Johnsen skorlamasında varikosele oluştırulan grup 2'nin; Sham grubu olan grup 1'den Modifiye Johnsen skoru istatistiksel olarak daha düşük

bulunmuştur. Varikosel oluşturulup tadalafil başlanan grup 3 ile grup 1 ve grup 2'nin Modifiye Johnsen skorları karşılaştırıldığında grup 2'nin Modifiye Johnsen skorundan daha yüksek olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Grup 1 ve grup 3 arasında ise grup 1'in Modifiye Johnsen skoru grup 3'ten yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu çalışmanın mevcut bulguları ile deneysel varikosel modelinde Modifiye Johnsen skorunun tadalafilin antioksidan etkisine bağlı olarak azalmadan korunduğunu gösterildi. Tadalafilin dokular üzerine protektif etkisini araştıran güncel çalışmalar mevcuttur. Kardiyoprotektif etkisi hayvan çalışmasında tadalafil kullanılarak fosfatidil inositol 3-kinaz uyarısı ile sağlanıp ve sitokrom 3 üzerinden antioksidan antiapoptotik etkisini uzun dönemli ilaç kullanımında gösterilmiştir (67). Deneysel sıçan iskemi reperfüzyonunun overler üzerine olan hasarın ve gelişen oksidatif strese karşı etkisi araştırılmış ve tadalafilin koruyucu etkisi gösterilmiştir (68). Mevcut literatür ile uyumlu olarak testis dokusunda da tadalafilin koruyucu etkisi çalışmamızda gösterildi.

TUNEL boyası ile mikroskop altında değerlendirilen sol testis preparatlarında Sham grubu olan grup 1'in normal düzeyde apoptozis olduğu ve Leydig hücrelerinde apoptozisin olmadığı izlenmiştir. Varikosel oluşturulan grup 2'de ise Leydig hücrelerinde ve tüm germ hücre serisini etkileyen yaygın apoptozis izlenmiştir. Varikosel oluşturulan ve tadalafil başlanan grup 3'te ise nadir Leydig hücre apoptozisi ve sadece spermatogonya seviyesinde apoptozis izlenmiştir. Leydig hücrelerinde bu etkilenmeye bağlı serum testosteron seviyelerinde düşüş beklenmektedir. İnsan çalışmalarında da benzer sonuçlar gösterilmiştir. 2007 yılında yapılan bir çalışmada klinik anlamlı varikoseli olan erkeklerin, varikoseli olmayan erkeklere göre daha düşük serum testosteron seviyeleri olduğu tespit edilmiştir (84). Deneysel varikosel modelinin testis içerisindeki Leydig hücreleri ve testosteron sentezini araştıran farklı bir çalışmada da sekizinci haftadan itibaren anlamlı derecede Leydig hücrelerinde apoptoz ve testis içi testosteron düzeylerinde anlamlı derecede düşük bulunmuştur (85). Çalışmamızda mevcut literatür ile uyumlu olarak Leydig hücrelerinde

varikozel oluşturulan grupların etkilendiği gösterildi. Tadalafil verilen grupta Leydig hücrelerinin TUNEL boyası ile daha az etkilendiği ve boyandığı gösterildi.

TUNEL boyası ile boyanan 3 grubun preparatlarının apoptotik indeksleri karşılaştırıldığında 3 grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı. Grup 2 en yüksek apoptotik indekse sahip grup olarak, grup 1 ise en düşük apoptotik indekse sahip grup olarak saptandı. Grup 3 diğer iki grubun arasında yer almaktaydı. Varikozelin artmış germ hücre apoptozisine ve Leydig hücre apoptozisine sebep olduğu gösterilmiştir. Tadalafil verilen grup 3n apoptotik indeksinin grup 2'ye oranla istatistiksel olarak daha düşük saptanması, varikozele bağlı gelişen apoptozis oranını oral olarak verilen tadalafilin azaltabileceğini gösterdi.

Sol testis kesitlerini içeren preparatların ven çapları ve sayıları arasında 3 grup arasında da fark saptanmamıştır. Media tabakaları karşılaştırıldığında varikozel oluşturulan gruplar olan grup 2 ve grup 3n media tabakası kalınlığı Sham grup olan grup 1'e göre istatistiksel olarak kalınlaşmış olarak bulundu. Adventisya tabakaları arasında 3 grup arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Media tabakaları arasında Sham grup ve varikozel grupları arasında bu farkın olması sol testiste varikozelin oluşumuna bağlı olarak gelişen bir değişiklik olarak düşünülmüştür. Yapılan bir insan çalışmasında varikozellektomi yapılan hastalardan ven rneği alınmış, nefrektomi yapılan hastaların ven örnekleri ile karşılaştırılmış. Ven rnekleri arasında tunika media ve tunika adventisya tabakalarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (54). Farklı bir çalışmada varikozellektomi yapılan hastalar ve testis kanseri nedeniyle orşiektomi yapılan hastalar karşılaştırılmış yine tunika media ve adventisya dokularında varikozel derecesi ile anlamlı olarak bir fark saptanmıştır (86). Varikozel oluşum süreci tam olarak aydınlatılamasada pampiniform pleksus üzerine etkisi bilinmektedir. Deneysel olarak varikozel oluşturduğumuz ve yetmiş beş gün süreyle takip ettiğimiz çalışmamızda testis içerisinde tunika media tabakasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ve pampiniform

pleksus haricinde testis içerisinde de tunika media tabakasında artış olacağını gösterdi.

Sol kaput epididim dokusundan alınan seminal örneklerdeki sperm parametreleri karşılaştırıldığında ise motilite ortalamaları grup 1 ve grup 3 arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Grup 2'nin sperm motilitesi diğer 2 gruba göre istatistiksel olarak daha düşük bulundu. Varikoselli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada sperm hücreleri ve mitokondriyal aktivite oranları ölçülmüş, varikoseli olmayan kontrol grubu ile karşılaştırılmış hareketsiz sperm sayısı varikoseli olan hastalarda daha yüksek bulunmuş ve yüksek DNA fragmentasyonu oranları saptanmıştır (87). Sperm akrozomal defekt oranları 3 grup arasında fark saptanmadı.

Morfolojik defekt oranları karşılaştırıldığında grup 1 ve grup 2 arasında istatistiksel olarak fark saptanmazken, grup 3 morfolojik defekt oranı diğer 2 gruba göre istatistiksel olarak daha düşük bulundu. 12 hafta ve üzerinde oral olarak tadalafil verilen hastaların semen analizlerini değerlendiren bir meta analiz sonucunda orta düzeyde motilite ve morfoloji değerlerinde artış olduğu gösterilmiş bu artışın infertil ve subfertil olan hastalarda daha fazla olduğu gösterilmiştir (88). Bizim çalışmamızda da mevcut literatür ile uyumlu olarak 75 gün boyunca oral olarak tadalafil verilen ve deneysel olarak varikozel oluşturulan grup 3'ün sperm motilitesi Sham grubu grup 1 ile istatistiksel olarak benzer olduğu ve morfolojik defekt oranı ise grup 3'te diğer 2 gruptan anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur. Tadalafil verilen varikozel grubu olan grup 3 ve grup 1'in motiliteleri istatistiksel olarak benzer saptanırken, grup 2'den istatistiksel olarak motilite oranları yüksek saptanmıştır. Tadalafilin uzun süreli oral olarak uygulanmasının sperm parametreleri üzerine koruyucu etkisini sıçanlar üzerinde gösterdik.

Sperm sayıları karşılaştırıldığında ise her 3 grup arasında da fark saptanmıştır, grup 3 istatistiksel olarak en yüksek sperm sayısına sahipken; grup 2'nin sperm sayısı grup 1'den yüksek bulunmuştur. Modifiye Johnsen skorlamasında normal germ hücre üretimi olduğu yine gösterilmiştir. Sperm sayısındaki kontrol grubun düşük olmasının grup 1 içerisindeki hayvanların

yapısal özelliklerine bağlı olabileceği düşünöldü. Tesadüfi grade 2 ve grade 3 varikösel saptanan erkekler üzerinde yapılan bir çalışmada alınan semen örnekleri değeriendirilmiş ve en az yirmi aylık takipleri boyunca tekrar semen örnekleri ile takip edilmiştir. Grade 2 ve grade 3 varikoseli olan erkeklerin sperm sayısının ve motilitesinin dünya sağıık örgütünün belirlediğı sınır değeriilerden yüksek olduğı, semen parametrelerinde anlamlı bir fark olmadığı ve infertilite gelişmediğı gösterilmiştir (89). Bu çalışmada tesadüfen varikösel saptanan hastaların büyük çoğunluğunda sperm sayısının ortalama sperm sayısı değeriilerinden daha yüksek olduğı saptanmıştır.

İnfertilite ile kliniğıe başvurmayan varikoselli hastalarda sperm sayısının dünya sağıık örgütünün belirlemiş olduğı sınırlarda veya daha yüksek olabileceğı ve normal fertiliteye sahip olabileceğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda da gruplardan bağımsız olarak sperm sayısı dağılımının farklı olabileceğini gösterdi.

SONUÇ

Çalışmamızda deneysel olarak sol varikozel oluşturulmuş sıçanlara günlük oral olarak verilen tadalafilin sol testis dokusu ve sperm parametreleri üzerine etkisini araştırdık.

Gruplar arasında deneysel olarak varikozel oluşturulan grupların sol testis dokusunu içeren ve Masson Trichrom boya ile boyanan preparatlarda tunika media tabakası grup 1'e göre artmış saptandı. Bu çalışma ile varikozelden etkilenen venlerin sadece pampiniform pleksusta değil, testis içi ven yapılarında da değişikliklerin gelişebileceği görüldü.

Modifiye Johnsen skorları karşılaştırıldığında varikozel oluşturulup tadalafil verilen grubun sonuçları kontrol grubu ile benzer sonuçlandı. Bu verilerle tadalafilin varikozele bağlı gelişen değişikliklere karşı testisi koruyabileceği görüldü.

TUNEL boyası ile boyalı preparatlar karşılaştırıldığında varikozel oluşturulan grupların daha fazla etkilendiği ve tadalafil verilen grubun seminifer tübülü içerisinde ve Leydig hücrelerinde daha az boyanma olduğu gösterilmiştir. Boyalı preparatların apoptotik indeksleri karşılaştırıldığında tadalafil verilen grupta artmış apoptozisten testis dokusunun korunduğu gözlemlendi. Sol kaput epididim dokusundan alınan semen örnekleri karşılaştırıldığında tadalafil verilen grupta sperm motilitesi ve morfolojisinin korunduğu bulundu.

Çalışma sonuçları beraber değerlendirildiğinde günlük uzun süreli oral olarak verilen tadalafilin varikozele bağlı gelişen değişikliklere karşı testis dokusunu koruyabileceği ve sperm parametrelerinin korunmasını sağlayarak gelişebilecek subfertiliteyi engelleyebileceği sonuçları elde edildi. Bununla birlikte varikozel ve infertilite ilişkisini değerlendirecek, tadalafil ve diğer PDE5 inhibitörlerinin klinik kullanımı ile tedavilerini karşılaştıracak deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

1. Venkatachalam S, Bumpus K, Kapadia SR, Gray B, Lyden S, Shishehbor MH. The nutcracker syndrome. *Ann Vasc Surg* [Internet]. 2011 Nov [cited 2023 Oct 17];25(8):1154–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21439772/>
2. Ahmed WS, Geethakumari AM, Biswas KH. Phosphodiesterase 5 (PDE5): Structure-function regulation and therapeutic applications of inhibitors. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Oct 31];134. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33348311/>
3. Hassanin AM, Ahmed HH, Kaddah AN. A global view of the pathophysiology of varicocele. *Andrology* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2023 Oct 31];6(5):654–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29978951/>
4. Kaku Y, Chiba K, Sato K, Onishi A, Ishida T, Okada K, et al. Protective effects of tadalafil against cisplatin-induced spermatogenic dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022 May;603:123–9.
5. Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED. Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *Journal of Clinical Investigation*. 1981 Jul 1;68(1):39–45.
6. Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature*. 1990 Jul;346(6281):245–50.
7. MALKI S, BERTA P, POULAT F, BOIZETBONHOURE B. Cytoplasmic retention of the sex-determining factor SOX9 via the microtubule network. *Exp Cell Res*. 2005 Oct 1;309(2):468–75.
8. Hutson JM, Hasthorpe S. Abnormalities of testicular descent. *Cell Tissue Res*. 2005 Oct 18;322(1):155–8.
9. Yamada G, Suzuki K, Haraguchi R, Miyagawa S, Satoh Y, Kamimura M, et al. Molecular genetic cascades for external genitalia formation: An emerging organogenesis program. *Developmental Dynamics*. 2006 Jul 5;235(7):1738–52.
10. Elamo HP, Virtanen HE, Toppari J. Genetics of cryptorchidism and testicular regression. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2022 Jan;36(1):101619.
11. Shalet SM. Normal testicular function and spermatogenesis. *Pediatr Blood Cancer*. 2009 Aug 2;53(2):285–8.
12. Trainer TD. Histology of the Normal Testis. *Am J Surg Pathol*. 1987 Oct;11(10):797–809.

13. Bozhedomov VA, Lipatova NA, Rokhlikov IM, Alexeev RA, Ushakova I V., Sukhikh GT. Male fertility and varicocele: role of immune factors. *Andrology*. 2014 Jan 28;2(1):51–8.
14. WANG ZX, WREFORD NGM, KRETZER DM DE. Determination of Sertoli cell numbers in the developing rat testis by stereological methods. *Int J Androl*. 1989 Feb 16;12(1):58–64.
15. Yefimova MG, Messaddeq N, Meunier AC, Cantereau A, Jegou B, Bourmeyster N. Phagocytosis by Sertoli Cells: Analysis of Main Phagocytosis Steps by Confocal and Electron Microscopy. In 2018. p. 85–101.
16. Planinić A, Marić T, Bojanac AK, Ježek D. Reinke crystals: Hallmarks of adult Leydig cells in humans. *Andrology*. 2022 Sep 15;10(6):1107–20.
17. Amann RP. The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit? *J Androl*. 2008 Sep 10;29(5):469–87.
18. Zhou Q, Wang M, Yuan Y, Wang X, Fu R, Wan H, et al. Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro. *Cell Stem Cell*. 2016 Mar;18(3):330–40.
19. Griswold MD. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiol Rev*. 2016 Jan;96(1):1–17.
20. Akbay E, Çayan S, Doruk E, Duce MN, Bozlu M. The prevalence of varicocele and varicocele-related testicular atrophy in Turkish children and adolescents. *BJU Int*. 2000 Sep 2;86(4):490–3.
21. Alsaikhan B, Alrabeeh K, Delouya G, Zini A. Epidemiology of varicocele. *Asian J Androl*. 2016;18(2):179.
22. Levinger U, Gornish M, Gat Y, Bachar GN. Is varicocele prevalence increasing with age? *Andrologia*. 2007 Jun;39(3):77–80.
23. Gokce A, Davarci M, Yalcinkaya FR, Guven EO, Kaya YS, Helvacı MR, et al. Hereditary Behavior of Varicocele. *J Androl*. 2010 May 1;31(3):288–90.
24. Elzanaty S. Non-obstructive azoospermia and clinical varicocele: therapeutic options. *Int Urol Nephrol*. 2013 Jun 20;45(3):669–74.
25. Naughton CK. Varicocele and male infertility: Part II: Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2001 Sep 1;7(5):473–81.
26. Cho CL, Esteves S, Agarwal A. Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. *Asian J Androl*. 2016;18(2):186.
27. Jensen CFS, Østergren P, Dupree JM, Ohl DA, Sønksen J, Fode M. Varicocele and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2017 Sep 4;14(9):523–33.
28. Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N, Fritjofsson Å. Phlebography in Varicocele Scroti. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*. 1966 Sep 30;4(5):517–28.

29. Wishahi MM. Detailed Anatomy of the Internal Spermatic Vein and the Ovarian Vein. Human Cadaver Study and Operative Spermatic Venography: Clinical Aspects. *Journal of Urology*. 1991 Apr;145(4):780–4.
30. Comhaire F, Kunnen M, Nahoum C. Radiological anatomy of the internal spermatic vein(s) in 200 retrograde venograms. *Int J Androl*. 1981 Dec 28;4(1–6):379–87.
31. Nakamura BN, Lawson G, Chan JY, Banuelos J, Cortés MM, Hoang YD, et al. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. *Free Radic Biol Med*. 2010 Nov 15;49(9):1368–79.
32. Weese DL, Peaster ML, Himsl KK, Leach GE, Lad PM, Zimmern PE. Stimulated Reactive Oxygen Species Generation in the Spermatozoa of Infertile Men. *Journal of Urology*. 1993 Jan;149(1):64–7.
33. Gvozdjáková A, Kucharská J, Dubravický J, Mojto V, Singh RB. Coenzyme Q₁₀, α -Tocopherol, and Oxidative Stress Could Be Important Metabolic Biomarkers of Male Infertility. *Dis Markers*. 2015;2015:1–6.
34. Onur R, Semerciöz A, Orhan I, Yekeler H. The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urol Res*. 2004 Jun 6;32(3).
35. Alahmar AT. The effects of oral antioxidants on the semen of men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Clin Exp Reprod Med*. 2018 Jun 30;45(2):57–66.
36. Goldstein M, Eid JF. Elevation of Intratesticular and Scrotal Skin Surface Temperature in Men with Varicocele. *Journal of Urology*. 1989 Sep;142(3):743–5.
37. Saleh M, Shafik A, Wali MA, Abdel Azis YE, El-Kateb S, El-Sharkawy AG, et al. Experimental Model of Varicocele. *Eur Urol*. 1989;16(4):298–303.
38. Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K, Kamidono S. Biochemical Changes in Testicular Varicocele. *Arch Androl*. 1989 Jan 9;22(2):149–59.
39. Salisz JA, Kass EJ, Steinert BW. The Significance of Elevated Scrotal Temperature in an Adolescent with a Varicocele. In 1991. p. 245–51.
40. Zimna A, Kurpisz M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–13.
41. CHAKRABORTY J, HIKIM APS, JHUNJHUNWALA JS. Stagnation of Blood in the Microcirculatory Vessels in the Testes of Men with Varicocele. *J Androl*. 1985 Mar 4;6(2):117–26.
42. FARIAS JG, BUSTOS-OBREGÓN E, TAPIA PJ, GUTIERREZ E, ZEPEDA A, JUANTOK C, et al. Time Course of Endocrine Changes in the Hypophysis-Gonad Axis Induced by Hypobaric Hypoxia in Male Rats. *Journal of Reproduction and Development*. 2008;54(1):18–21.

43. Camoglio FS, Zampieri N, Corroppolo M, Chironi C, Dipaola G, Giacomello L, et al. Varicocele and Retrograde Adrenal Metabolites Flow. *Urol Int*. 2004;73(4):337–42.
44. Turner TT. The study of varicocele through the use of animal models. *Hum Reprod Update*. 2001 Jan 1;7(1):78–84.
45. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PT Del, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int*. 2012 Jan 18;109(2):259–65.
46. Andò S, Giacchetto C, Beraldi E, Panno M, Carpino A, Brancati C. Progesterone, 17-OH-Progesterone, Androstenedione and Testosterone Plasma Levels in Spermatic Venous Blood of Normal Men and Varicocele Patients. *Hormone and Metabolic Research*. 1985 Feb 14;17(02):99–103.
47. Hudson RW, McKay DE. The Gonadotropin Response of Men with Varicoceles to Gonadotropin-Releasing Hormone. *Fertil Steril*. 1980 Apr;33(4):427–32.
48. Koksall IT, Ishak Y, Usta M, Danisman A, Guntekin E, Bassorgun IC, et al. Varicocele-Induced Testicular Dysfunction May Be Associated with Disruption of Blood-Testis Barrier. *Arch Androl*. 2007 Jan 9;53(1):43–8.
49. Cayan, Kadioglu, Orhan, Kandirali, Tefekli, Tellaloglu. The effect of microsurgical varicocelectomy on serum follicle stimulating hormone, testosterone and free testosterone levels in infertile men with varicocele. *BJU Int*. 1999 Dec 24;84(9):1046–9.
50. King KL, Cidlowski JA. CELL CYCLE REGULATION AND APOPTOSIS. *Annu Rev Physiol*. 1998 Oct;60(1):601–17.
51. Fazlioglu A, Yilmaz I, Mete Ö, Kurtulus F, Parlakkilic O, Güctas Ö, et al. The Effect of Varicocele Repair on Experimental Varicocele-Induced Testicular Germ Cell Apoptosis. *J Androl*. 2008 Jan 2;29(1):29–34.
52. Elzanaty S. Varicocele repair in non-obstructive azoospermic men: diagnostic value of testicular biopsy – A meta-analysis. *Scand J Urol*. 2014 Dec 1;48(6):494–8.
53. Tanji N, Fujiwara T, Kaji H, Nishio S, Yokoyama M. Histologic evaluation of spermatic veins in patients with varicocele. *International Journal of Urology*. 1999 Jul 28;6(7):355–60.
54. Aldemir M, Işık E, Özgün G, Önen E, Okulu E, Kayıgil Ö. Comparison of spermatic vein histology in patients with and without varicocele. *Andrologia*. 2011 Oct;43(5):341–5.
55. Nagappan P, Keene D, Ferrara F, Shabani A, Cervellione RM. Antegrade Venography Identifies Parallel Venous Duplications in the Majority of Adolescents with Varicocele. *Journal of Urology*. 2015 Jan;193(1):286–90.
56. Dubin L, Amelar RD. Varicocele Size And Results of Varicocelectomy in Selected Subfertile Men with Varicocele. *Fertil Steril*. 1970 Aug;21(8):606–9.

57. Howards SS. Subclinical varicocele. *Fertil Steril*. 1992 Apr;57(4):725–6.
58. Çayan S, Akbay E, Bozlu M, Doruk E, Yildiz A, Acar D, et al. Diagnosis of Pediatric Varicoceles by Physical Examination and Ultrasonography and Measurement of the Testicular Volume. *Urol Int*. 2002;69(4):293–6.
59. Varikosel-Kilavuzu (1).
60. Casey JT, Misseri R. Adolescent Varicoceles and Infertility. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015 Dec;44(4):835–42.
61. Kadioğlu A, Tefekli A, Cayan S, Kandirali E, Erdemir F, Tellaloğlu S. Microsurgical inguinal varicocele repair in azoospermic men. *Urology*. 2001 Feb;57(2):328–33.
62. Shiraishi K, Oka S, Matsuyama H. Surgical comparison of subinguinal and high inguinal microsurgical varicocelectomy for adolescent varicocele. *International Journal of Urology*. 2016 Apr 20;23(4):338–42.
63. Cam K, Simsek F, Yuksel M, Turker L, Haklar G, Yalcin S, et al. The role of reactive oxygen species and apoptosis in the pathogenesis of varicocele in a rat model and efficiency of vitamin E treatment. *Int J Androl*. 2004 Aug 21;27(4):228–33.
64. Onur R, Semerciöz A, Orhan I, Yekeler H. The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urol Res*. 2004 Jun 6;32(3).
65. Cantrell MA, Baye J, Vouri SM. Tadalafil: A Phosphodiesterase-5 Inhibitor for Benign Prostatic Hyperplasia. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2013 Jun 25;33(6):639–49.
66. Bai Y, Yang Y, Wang X, Tang Y, Han P, Wang J. Tadalafil Facilitates the Distal Ureteral Stone Expulsion: A Meta-Analysis. *J Endourol*. 2017 Jun;31(6):557–63.
67. Ahmad N, Wang Y, Ali AK, Ashraf M. Long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor, tadalafil, induces sustained cardioprotection against lethal ischemic injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2009 Jul;297(1):H387–91.
68. Arikan DC, Bakan V, Kurutas EB, Sayar H, Coskun A. Protective effect of tadalafil on ischemia/reperfusion injury of rat ovary. *J Pediatr Surg*. 2010 Nov;45(11):2203–9.
69. Sugimoto M, Zhang X, Ueda N, Tsunemori H, Taoka R, Hayashida Y, et al. A phosphodiesterase 5 inhibitor, tadalafil, suppresses stromal predominance and inflammation in a rat model of nonbacterial prostatitis. *BMC Urol*. 2019 Dec 23;19(1):99.
70. Koupparis AJ, Jeremy JY, Muzaffar S, Persad R, Shukla N. Sildenafil inhibits the formation of superoxide and the expression of gp47^{phox} NAD[P]H oxidase induced by the thromboxane A2 mimetic, U46619, in corpus cavernosal smooth muscle cells. *BJU Int*. 2005 Aug 24;96(3):423–7.

71. Adeneye AA, Benebo AS. Chemopreventive Effect of Tadalafil in Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Rats [Internet]. Vol. 31, J. Physiol. Sci. 2016. Available from: www.njps.com.ng
72. Yeni S, Demir A, Kilicarslan N, Cicek MC, Saricetin A, Dirican M, et al. Tadalafil against hyperoxia-induced oxidative stress; an experimental study. *Andrologia*. 2022 Oct 8;54(9).
73. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007 Jun 25;35(4):495–516.
74. Potten C. What is an apoptotic index measuring? A commentary. *Br J Cancer*. 1996 Dec;74(11):1743–8.
75. BARQAWI A, CARUSO A, MEACHAM RB. Experimental Varicocele Induces Testicular Germ Cell Apoptosis in the Rat. *Journal of Urology*. 2004 Jan;171(1):501–3.
76. Wan Mohammad WMZ. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2017;24(5):101–5.
77. Johnson D, Sandlow J. Treatment of varicoceles: techniques and outcomes. *Fertil Steril*. 2017 Sep;108(3):378–84.
78. Hassanin AM, Ahmed HH, Kaddah AN. A global view of the pathophysiology of varicocele. *Andrology*. 2018;6(5):654–61.
79. Belardin LB, Del Giudice PT, Camargo M, Intasqui P, Antoniassi MP, Bertolla RP, et al. Alterations in the proliferative/apoptotic equilibrium in semen of adolescents with varicocele. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Dec 14;33(12):1657–64.
80. Minhas S, Bettocchi C, Boeri L, Capogrosso P, Carvalho J, Cilesiz NC, et al. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. *Eur Urol*. 2021 Nov;80(5):603–20.
81. Mohamad Al-Ali B, Shamloul R, Pichler M, Augustin H, Pummer K. Clinical and laboratory profiles of a large cohort of patients with different grades of varicocele. *Cent European J Urol*. 2013;65:71–4.
82. Birowo P, Rahendra Wijaya J, Atmoko W, Rasyid N. The effects of varicocelectomy on the DNA fragmentation index and other sperm parameters: a meta-analysis. *Basic Clin Androl*. 2020 Dec 10;30(1):15.
83. Agarwal A, Sharma RK, Sharma R, Assidi M, Abuzenadah AM, Alshahrani S, et al. Characterizing semen parameters and their association with reactive oxygen species in infertile men. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(1):33.
84. Tanrikut C, Choi JM, Lee RK, Benjamin JS, Mulhall JP, Goldstein M. Varicocele is a risk factor for androgen deficiency. *Fertil Steril*. 2007 Sep;88:S386.

85. Luo DY, Yang G, Liu JJ, Yang YR, Dong Q. Effects of varicocele on testosterone, apoptosis and expression of StAR mRNA in rat Leydig cells. *Asian J Androl*. 2011 Mar 15;13(2):287–91.
86. Iafrate M, Galfano A, Macchi V, Ejituru E, Sarasin G, Porzionato A, et al. Varicocele is associated with an increase of connective tissue of the pampiniform plexus vein wall. *World J Urol*. 2009 Jun 22;27(3):363–9.
87. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril*. 2008 Nov;90(5):1716–22.
88. Tan P, Liu L, Wei S, Tang Z, Yang L, Wei Q. The Effect of Oral Phosphodiesterase-5 Inhibitors on Sperm Parameters: A Meta-analysis and Systematic Review. *Urology*. 2017 Jul;105:54–61.
89. Zargooshi J. Sperm count and sperm motility in incidental high-grade varicocele. *Fertil Steril*. 2007 Nov;88(5):1470–3.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince mesleki bilgi ve tecrübeleri ile sürekli yanımda bulunan ve yol gösteren tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet Çağatay Çiçek'e; eğitim sürem boyunca deneyimlerini benimle paylaşan saygıdeğer hocalarım, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. İsmet Yavaşcaoğlu, Prof. Dr. Hakan Kılıçarslan, Prof. Dr. Burhan Coşkun, Prof. Dr. Onur Kaygısız, Doç. Dr. Kadir Ömür Günseren'e, tezimin istatistiklerinin oluşturulmasında çok değerli yardımlarından dolayı Prof. Dr. Gökhan Ocakoğlu'na,

Tezimin laboratuvar aşamasında beni asiste eden Dr. Hasan İbayev, Dr. Selçuk İçer, Dr. Fehmi Faruk Gürtürk'e,

Asistanlık yıllarımızın beraber geçtiği ve birlikte çok şey öğrendiğimiz sevgili arkadaşlarım Op. Dr. Levent Turan, Op. Dr. Cavanşir Bakirov'a, Dr. Xetai Qurbanlı'ya, Dr. Rıdvan Polat'a ve Dr. Bertan Tanrıbuyurdu'ya,

Tıp ve uzmanlık eğitimimi sayelerinde tamamladığım ve tüm hayatım boyunca hep yanımda olan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen anne ve babama,

Tüm tez yazım sürecimde hep yanımda olan, her zaman desteğini ve yardımını hissettiğim değerli hayat arkadaşım Dr. Seda Karaaslan Yetemen'e sonsuz teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

yılında . doğdum. İlköğretim ve ortaöğretimimi Yahya Kemal Beyatlı İlkokulu'nda, lise öğretimimi Bursa Anadolu Kız Lisesi'nde tamamladım. 2010-2016 yılları arasında yüksek öğrenimimi Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tamamladıktan sonra, yaklaşık on ay Kocaeli Dilovası Devlet Hastanesi'nde pratisyen hekim olarak çalıştım. Altı ay süre Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi Anabilim Dalında uzmanlık eğitimi aldıktan sonra istifa ile bu görevimden ayrıldım. 2018 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimime başladım.