

**T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL VARİKOSEL MODELİNDE ERKEN EVREDE
UYGULANAN CERRAHİ TEKNİK VE L-KARNİTİN TEDAVİSİNİN
SPERMATOGENEZ ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. SERKAN AKDEMİR**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. ÖZDEMİR SERHAT GÜROCAK**

**ANKARA
NİSAN 2011**

**T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL VARİKOSEL MODELİNDE ERKEN EVREDE
UYGULANAN CERRAHİ TEKNİK VE L-KARNİTİN TEDAVİSİNİN
SPERMATOGENEZ ÜZERİNE ETKİSİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. SERKAN AKDEMİR**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. ÖZDEMİR SERHAT GÜROCAK**

**Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından 01/2010-15
proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
NİSAN 2011**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca , engin bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen asistanı olmaktan gurur duyduğum değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İbrahim BOZKIRLI'ya ;
Bu tezin oluşturulmasında ve çalışmanın ana fikrinin ortaya çıkmasında en büyük pay sahibi olan yardımlarını ve desteğini benden esirgemeyen tez danışmanım Yrd.Doç.Dr. Özdemir Serhat GÜROCAK'a;
Asistanlığım boyunca teorik ve pratik açıdan bilgilerini sonuna kadar benimle paylaşan diğer tüm saygıdeğer hocalarıma;
Fedakarca çalışan ve güler yüzlerini asla unutmayacağım üroloji kliniğinde çalışan bütün araştırma görevlisi arkadaşlarıma;
Tezin histopatolojik değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.İpek Işık GÖNÜL'e;
Tezin moleküler değerlendirmesinde yardımcı olan Doç.Dr.Ece KONAÇ ve Öğr.Gör.Dr. H. İlke ÖNEN'e ;
Bugünlere gelmemde sevgileriyle ve destekleriyle hep yanımda olan annem , babam ve kardeşlerime;
Bana asistanlığımın en değerli hediyesi sevgili eşime;

Sonsuz TEŞEKKÜRLER.....

Dr.Serkan AKDEMİR

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	iii
RESİMLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
GRAFİKLER DİZİNİ.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Varikosel epidemiyolojisi	3
2.2. Varikosel etiyolojisi.....	3
2.3. Varikosel Tanısı.....	4
2.4. Varikoselin infertilitedeki patofizyolojisi ile ilişkili teoriler.....	5
2.4.1. Hipertermi.....	6
2.4.2. Testiküler Kan Akımı.....	7
2.4.3. Venöz Basınç.....	7
2.4.4. Renal / Adrenal Reflü.....	7
2.4.5. Hormonal Disfonksiyon.....	8
2.4.6. Otoimmünite.....	9
2.4.7. Akrozom Reaksiyonu.....	9
2.4.8. Oksidatif Stres	10
2.4.9. Apoptozis.....	10
2.5. Varikoselin spermatogenezisteki moleküler etkileri.....	11
2.6. Varikosel tedavisi.....	13

2.7. L- Karnitin	14
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	15
3.1. Ratlar.....	15
3.2. Grupların dağılımı.....	15
3.3. Cerrahi prosedür.....	16
3.4. Moleküler değerlendirme.....	18
3.4.1. Rat testislerinden total RNA saflaştırılması.....	18
3.4.2. SCF geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi.....	20
3.4.3. C-kit geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi.....	21
3.4.4. β - aktin geninin ifade düzeyinin kantitatif analizi.....	22
3.4.5. Dokudan protein izolasyonu.....	23
3.4.6. Protein miktarının ölçümü.....	23
3.4.7. Kaspaz 3 aktivitesinin belirlenmesi.....	24
3.5. Histopatolojik değerlendirme.....	24
3.6. İstatistiksel yöntem.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. Moleküler bulgular.....	26
4.2. Histopatolojik bulgular.....	31
5. TARTIŞMA.....	34
6. SONUÇ.....	42
7. ÖZET.....	43
8. SUMMARY.....	44
9. KAYNAKLAR.....	45

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

SCF	:	KÖK HÜCRE FAKTÖRÜ
PDGFR:		PLATELET KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ RESEPTÖRÜ
PI3-K	:	FOSFOİNOSİTOL 3 KİNAZ
Mtor	:	MEMELİ RAPAMİSİN HEDEFİ
mRNA	:	MESAJCI RİBONÜKLEİK ASİT
NAD	:	NİKOTİNAMİD ADENİN DİNÜKLEOTİD
LH	:	LÜTEİNİZE EDİCİ HORMON
FSH	:	FOLLİKÜL STİMÜLE EDİCİ HORMON
ASA	:	ANTİSPERM ANTİKOR
ROS	:	REAKTİF OKSİJEN RADİKALI
PGC	:	PRİMORDİAL GERM HÜCRE
H&E	:	HEMATOKSİLEN EOZİN
ACTB	:	BETA AKTİN

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Kontrol Grubundan (grup 1) bir Rat Testisinin Histopatolojik Görüntüsü.....31

(Cosentino skor 1. Germ hücrelerinin normal dizilimi ile karakterli normal testis)

Resim 2: Spermatik Arter Korumasız Varikosektomi Grubundan (grup 4) bir Rat Testisi Görüntüsü.....32

(Cosentino skor 2. Germ hücrelerin diziliminde hafif derecede bozulma ve hücrelerde kohezyon kaybı ile karakterli testis parankimi)

Resim 3: Varikozel Grubundan (grup 3) bir Rat Testisi Görüntüsü.....32

(Cosentino skor 3. Germ hücre nükleusları piknotik ve büzölmüş görünümde; hücreler seminifer tüböl lümenlerine dökölmüş, seminifer tüböl sınırları belirginliğini kaybetmeye başlamış.)

Resim 4: Spermatik Arter Korumalı Varikosektomi Grubundan (grup 5) bir Rat Testisi Görünümü.....33

(Cosentino skor 1. Germ hücrelerinin normal dizilimi ile karakterli normal testis)

TABLolar VE ŞEKİLLER DİZİNİ

Tablo 1: Çalışma Grupları Arasında Kaspaz-3 Aktivite Düzeyinin Karşılaştırılması.....	30
Şekil 1: SCF mRNA'sının Belirlenmesinde Kullanılan Primerler ve UPL Probu cDNA Dizisi Üzerindeki Yerleşimi.....	20
Şekil 2: C-Kit mRNA'sının Belirlenmesinde Kullanılan Primerler ve UPL Probu cDNA Dizisi Üzerindeki Yerleşimi.....	21
Şekil 3: Actb mRNA'sının Belirlenmesinde Kullanılan Primerler ve UPL Probu cDNA Dizisi Üzerindeki Yerleşimi.....	22

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Kontrol Grubu İle Karşılaştırıldığında SCF/c-kit mRNA İfadesi.....	26
Grafik 2: Varikozel Grubu İle Karşılaştırıldığında Scf/c-kit mRNA İfadesi.....	27
Grafik 3: Grupların Sağ ve Sol Testisleri Karşılaştırıldığında SCF/c-kit mRNA İfadesi.....	28

1.GİRİŞ

Varikosel, testisin venöz drenajını sağlayan pleksus pampiniformisin patolojik dilatasyonu olarak tanımlanmaktadır ve infertilitenin en önemli düzeltilebilir patolojisi olarak bilinmektedir (1, 2).

Varikoselin oluşturduğu testiküler hasarın moleküler oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılmamış olmakla beraber infertilite ile ilişkili progresif bir süreç olduğu tahmin edilmektedir (3). İnfertilitenin altında yatan patofizyolojik nedenlerin anlaşılabilmesi için deneysel hayvan modelleri ve *in vitro* çalışmalar yapılmaktadır. Elde edilen veriler insanda oluşan testiküler hasarın moleküler etkilerinin aydınlatılmasında etkili olduğu gibi yeni tedavi seçeneklerinin belirlenmesine de katkıda bulunacaktır.

Spermatogenez olgun spermatozoa oluşumuyla sonuçlanan hücresel yenilenme ve farklılaşmayı içeren karmaşık bir süreçtir (4). Tip A spermatogonyum germ kök hücresi olarak bilinir ve mitoz bölünme sonucu farklılaşmış ve farklılaşmamış Tip A spermatogonyumlar oluşturur. Farklılaşmış A tipi spermatogonyumlar bir dizi mitotik bölünme geçirir ve mayoz bölünme sonrasında spermatit oluşur. Bu süreçte yer alan moleküler mekanizmalar ve sinyal iletim yollarının rolü günümüzde araştırma alanlarının başında dikkat uyandırmaktadır (5).

Diğer yandan SCF (kök hücre faktörü) /c-kit yolağının spermatogonal kök hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasında önemli role sahip olduğu öne sürülmektedir (4). C-kit bir PDGFR (platelet türevli büyüme faktör reseptörü) reseptör tirozin kinaz ailesi üyesidir. SCF sertoli hücrelerinden salgılanmakta ve sadece farklılaşmış tip A hücre yüzeyindeki reseptörü c-kit ile etkileşerek sinyal iletimini başlatmaktadır (6). PI3-K (fosfoinositol 3 kinaz) / Mtor ikincil habercileriyle etkileşim sonrası hücre bölünmesi ve farklılaşmasında görev alan genlerin ifade edilmesi uyarılmaktadır (7). C-kit mRNA (mesajcı ribonükleik asit) ve protein ifadesi yetişkin ve adölesan rodent testislerinde gösterilmiştir. Bu genlerin insanda ifade edilme düzeylerinin azalması germ hücre apoptozunun artışına bağlı olarak oligospermi veya azospermiye neden olmaktadır (8).

Deneysel varikoselin sertoli hücrelerinde moleküler seviyede hasara neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (9). Sürecin bu yönünün vereceği testiküler hasarı en aza indirmek için literatürde anti oksidan ajanlarla yapılan çalışmalar mevcuttur (10) ve günümüzde L-karnitin bu amaçla çalışmalarda oldukça sık kullanılan güçlü bir anti oksidan ajan olarak önümüze çıkmaktadır (11).

Bu çalışmanın amacı; oluşturulan varikosel modelinde moleküler düzeyde oksidatif stres oluşturulduktan sonra spermatogenez üzerine olan etkilerini inceleyerek, değişik cerrahi tekniklerle yapılan varikoselektominin ve L- karnitin tedavisinin sperm hücrelerinin farklılaşma yolağındaki sinyal ifadenmesi üzerine etkilerini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Varikosel Epidemiyolojisi

Varikosel, erişkin erkek popülasyonunda %16 oranında görülmektedir (12). İnfertil erkek popülasyonda ise %35-40 oranında görülmektedir. İlginç olarak sekonder infertil hasta popülasyonunda varikosel görülme oranı %75-80'e çıkmaktadır (13). Varikosel %90 oranında sol testiste görülmektedir. Akbay ve ark. (14) Türk çocuklarda varikosel ve testis atrofisini araştırdıkları prevelans çalışmasında 2-19 yaş arası 4052 çocuk incelenmiş ve hastalığın çok küçük yaş gruplarında ortaya çıkabildiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmaya göre 2-6 yaş arası çocuklarda %0,79, 7-10 yaş arası çocuklarda %0,96, 11-14 yaş arası çocuklarda %7,8, 15-19 yaş arası çocuklarda %14,1 oranında varikosel görülmektedir. Varikosele bağlı testis atrofisi 11 yaş altında görülmemekle beraber 11-14 yaş arasında %7,3, 14-19 yaş arasında %9,3 oranında görülmektedir. (14)

2.2 Varikosel Etiyolojisi

Varikosel etyolojisi günümüzde tartışmalı olmakla birlikte; anatomik değişkenlikler, doğumsal veya edinsel venöz valv disfonksiyonuna bağlı gelişen venöz reflü ve venöz tıkanıklık gibi değişik teoriler öne sürülmektedir (15).

Günümüzde varikosel etyolojisinde kabul görmüş 3 farklı teori bildirilmiştir.

1. Sağ ve sol testiküler ven arasındaki anatomik farklılıklar: Sağ testiküler ven direk vena cavaya açılırken sol testiküler ven sol renal vene açılmaktadır. Bu

değişkenlik solda hidrostatik basınç artımına ve dolayısıyla sol pampiniform pleksusta dilatasyona ve tortuozeiteye neden olmaktadır.

2. Kompetan valvlerin olmaması: Braedel ve ark. (16) varikoseli bulunan 659 hastanın venografik incelemesinde bu hasta grubunda %73 oranında sol renal ven internal spermatic ven birleşim düzeyinde valv bulunmadığını göstermişlerdir. Bununla beraber yeterli valv sistemine sahip popülasyonda da %26 oranında varikozel saptanabilmektedir.
3. Nutcracker fenomeni: Sol renal venin aorta ve süperior mezenterik arter arasında kompresyonuna bağlı testiküler venede gelişen parsiyel obstrüksiyon sonucu testisin venöz drenajının bozulmasıdır.

Ortaya atılan tüm bu teoriler eşliğinde varikozel gelişiminin multifaktöryel etyolojik temeli olduğu düşünülmektedir.

2.3 Varikozel Tanısı

Varikozel tanısı esas olarak fizik muayene ile konur. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerinde, “Varikozel tanısı, fizik muayene ile konur ve renkli doppler ultrasonografi ile doğrulanabilir. Tedavinin antegrad embolizasyon ile yapıldığı merkezlerde tanıda spermatic venografi kullanılabilir” şeklinde rapor edilmektedir (17).

Klinik varikozel muayene bulgularına göre 1970 yılında Dubin ve Amelar tarafından yapılan bir sistem ile derecelendirilir.

Grade 1: Varikosel, sadece Valsalva manevrası ile palpe edilebilmektedir.

Grade 2: Varikosel, dinlenim esnasında ve normal solunumda palpe edilebilmektedir.

Grade 3: Varikosel, dinlenme anında ve normal solunumda gözle görülebilmektedir.

Varikosel muayenesi yapılan her hastada testis boyutları mutlaka değerlendirilmelidir.

Eğer fizik muayene ile varikosel tanısı konulamıyor veya nüks varikoselden şüpheleniliyor ise ek görüntüleme yöntemleri kullanılabilir. Bu amaçla skrotal ultrasonografi, renkli doppler ultrasonografi, spermatik venografi, termografi, radyonüklid anjiyografi, manyetik rezonans anjiyografi kullanılabilir.

2.4 Varikoselin İnfertilitedeki Patofizyolojisi İle İlişkili Teoriler

Varikoselin hem insanlarda hem de hayvan modellerinde progresif testiküler hasara yol açan bir süreç olduğu bilinmektedir (18). Varikoselin fertilité üzerine etkilerini inceleyen Dünya Sağlık Örgütü varikoselin sperm sayısı ve motilitesinde bozulmaya, testis volümünde azalma ve Leydig hücre fonksiyonlarında bozulmaya neden olduğu bildirilmektedir (19).

Varikosel patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamakla beraber patofizyolojide rol oynayan bazı hipotezler arasında; hipertermi, testiküler kan

akımı, venöz basınç, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu, oksidatif stres, apoptozis bulunmaktadır.

2.4.1. Hipertermi

Varikoselle ilişkili sperm parametrelerindeki bozulma ile hipertermi ilişkisi 1960'lardan beri araştırılmaktadır. En yaygın kabul gören teoridir. Testiküler ısıyı kontrol eden 2 sistem vardır.

1.Skrotumun kendisi: Bu bölgedeki ciltte subkutan yağ dokusu bulunmaz ve dartos kası yüzey alanını kontrol eder.

2.Countercurrent ısı sistemi: Spermatik arterdeki arteryel kan pleksus pampiniformiste bulunan daha soğuk venöz kan vasıtasıyla soğutulur (20).

Varikozel ile hipertermi arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar değişken sonuçlar vermektedir. Varikozel ile hipertermi ilişkisi ilk kez 1973 yılında gösterilmiştir. Yapılan çalışmada tek taraflı varikozelin her iki testiste ısı artışına neden olduğu gösterilmiştir (21). Adölesan popülasyonda grade 2 ve 3 varikozeli olan hasta grubunda kontrol grubuna göre skrotal ısı seviyeleri belirgin olarak yüksek bulunmuş ve başarılı cerrahi tedavi ile skrotal ısının belirgin azaldığı ve testiküler volümün belirgin arttığı görülmüştür (22).

Hiperterminin spermatogenez üzerine etkisi henüz net değildir. Seminifer tübül ve/veya leyding hücre seviyesinde DNA ve RNA bağlayıcı proteinlerde direk termal hasardan şüphelenilmektedir (23).

2.4.2. Testiküler Kan Akımı

Hayvan çalışmalarında varikoselle ilişkili olarak testiküler kan akımında birbiriyle çelişen bulgular rapor edilmiştir. Turner ve ark. (24) tek taraflı varikozel varlığında her iki testiste kan akımı artışını göstermektedir. Erişkin rat deneysel varikozel modelinde testiküler kan akımı artışını saptayan ve varikozektomiye takiben kısa ve uzun vadede kan akımında düzelme saptayan çalışmalar mevcuttur (25, 26). Testiküler kan akımı değişikliğinin varikozel ilişkisi henüz netleştirilememekle beraber testiküler ısı artışı ile kan akımında artış birbiriyle uyumlu bulunmaktadır.

2.4.3. Venöz Basınç

Venöz basınç artışı intratestiküler basıncın sürdürülebilmesi için testisin mikrovaskülaritesini ve kan akımını testise giren kan akımında down regülasyona neden olarak etkilemektedir. Kronik prekapiller vazokonstriksiyon testisin beslenmesini bozabilir ve spermatogenezisi etkileyebilir. Ayrıca artmış venöz basınç intratestiküler hidrostatik ve onkotik basıncı değiştirebilir; kilit hormonlar için parakrin ve taşınma ortamını değiştirebilir; mikrovasküler sıvı değişimini etkileyebilir. (27-29).

2.4.4. Renal Adrenal Reflü

Erkeklerin %50'sinde sol spermatik venede geri akım olduğu gözlenmektedir (30). Varikoseli olan hastalarda venöz reflüde artış olduğu

venografi çalışmalarıyla gösterilmiştir (31). Renal ve/veya adrenal reflü testiste ketakolaminler, prostoglandin E ve F gibi metabolitlerin yüksek konsantrasyonlarına neden olarak testiküler fonksiyonları etkileyebilmektedir. İnsanlarda varikosel cerrahisi sırasında testiküler geri akımın olduğu venlerden alınan venöz kanda ketakolamin miktarı periferik venöz kandaki ketakolamin miktarının 3 katı olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise 1,5 kat fazla bulunmuştur (32). Countercurrent değişim sistemi yoluyla plexus pampiniformis düzeyinde bu ketakolaminler testiküler arterlere geçerek, arterlerdeki noradrenalin düzeyini artırmakta ve arteriyollerde vazokonstrüksiyona neden olarak testiküler hipoksiye katkıda bulunmaktadır.

2.4.5. Hormonal Disfonksiyon

Varikoseli olan infertil erkeklerde serum testosteron seviyesinde azalma gösterilmesi varikoselin Leydig hücre fonksiyonunu bozarak testosteron üretimini azaltabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda varikosel hayvan modelinde testosterondaki azalmanın sentezde bozulmadan kaynaklandığını düşündürmektedir (33)

Varikoselli olgularda 4 saatlik gonadotropin releasing hormon (GnRH) infüzyonuna LH (Lüteinizan hormon) ve FSH (follikül stimüle edici hormon) yanıtının arttığı gösterilmiştir (34). Sperm konsantrasyonu 11-30 milyon/ml arasında ciddi oligospermik hastalarda en iyi cevap alınmaktadır. Daha önemlisi GnRH uyarımına aşırı yanıt elde edilen olgularda sperm sayısına bakılmaksızın varikosel onarımı sonrasında semen parametrelerinde iyileşme göstermektedirler.

GnRH uyarımına LH yanıtının normale dönmesi, postop fertilité ve yüksek gebelik oranlarıyla korelasyon göstermektedir (35). Bu bilgiler eşliğinde varikosel özellikle hipotalamo – hipofizer - gonadal aksı olumsuz yönde etkilemektedir ve özellikle leyding hücre hasarı olan hastalar spermatik ven ligasyonundan fayda görememesine sebep olabilmektedir.

2.4.6. Otoimmünite

Kan testis bariyeri ve bağışıklık düzenleyici proteinler sertoli hücreleri, rete testis ve efferent duktus seviyesinde bulunmaktadır ve sperm antijenlerle immünolojik koruma, lenfosit proliferasyonuna engel olma, kompleman aracılı hücre yıkımına karşı koruma sağlamaktadırlar (36). Bu kan – testis bariyerinin bozulması antisperm antikorların (ASA) oluşmasına neden olmaktadır. ASA oluşumunda olası etiyolojiler arasında duktal obstrüksiyon, testis torsiyonu, enfeksiyon, testis travması ve varikosel bulunmaktadır (37). ASA'ler spermatozoa aglütinasyonu ve immobilizasyonuna, servikal mukusa sperm penetrasyonunda bozulmaya, makrofaj aracılı spermatozoa fagositozuna, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunun önlenmesine neden olur (38).

2.4.7 Akrozom Reaksiyonu

Normospermik idiopatik infertilide varikoselin rolü araştırılmaktadır. Defektin sperm morfolojisi ve kalitesinden ziyade zona pellucidaya tutunmasını sağlayan akrozom reaksiyonunda bozulmaya neden olan sperm fonksiyon bozukluğu olduğu düşünölmektedir (39).

2.4.8 Oksidatif Stres

İnsan spermatozoası aerobik ortamda inkübe edilmesi durumunda reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluşturma kapasitesine sahiptir (40). ROS üretimi sinyal iletim mekanizmalarında önemli bir mediatör olarak görev yapan önemli bir işlemdir (41). ROS ayrıca; sperm hiperaktivasyonu ve kapasitasyonu, akrozom reaksiyonunun kolaylaştırılması ve sperm – oosit birleşmesi için önemli bir mediatör olarak görev almaktadır (42). Normal sağlıklı erkekte seminal plazma, aşırı ROS üretimini nötralize eden antioksidanları içerir. Patolojik durumlarda ROS üretimi antioksidan kapasiteyi aşar ve oksidatif stres oluşur (43). Patolojik ROS üretimi, defektif sperm fonksiyonuna, sperm motilitesinde azalmaya, inefektif sperm – oosit birleşmesine yol açabilir (44). ROS ayrıca tek ve çift sarmal sperm DNA'sında hasara yol açabilir (45).

2.4.9 Apoptozis

Apoptoz, programlı hücre ölümünü ifade etmekte olup, birçok farklı sinyal ileti mekanizmaları aracılığı ile uyarılabilmektedir. Bu uyarı, mitokondri aracılı olarak hücre içinden olabileceği gibi, çeşitli reseptörler aracılığı ile dış etmenli de olabilir. Kaspaz 3, her iki şekilde de uyarılabilen kaspaz kaskadının merkezi bir elemanıdır. Mcleod varikoseli olan hastalarda testiste görülen değişiklikleri “stress patern” olarak tanımlamıştır (46). Stres patern immatür, amorf ve küçük hücrelerden oluşur. Bu değişiklikler apoptozise uğrayan hücrelerde de benzer şekilde ortaya çıkmaktadır (47). Takip eden çalışmalar germ hücrelerindeki bu

dejeneratif değişikliklerin hipertermi sonucu testiste meydana gelen apoptozise bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir (48).

Nükleer piknoz, DNA fragmentasyonu ve piknotik partiküllerin fagositozu apoptozisin farklı özellikleridir (49). Apoptozis artışı; hormonal yetersizlik, kriptoorşitizm, testiste lokal ısı artışı, venöz staza bağlı hipoksiye bağlı oluşmaktadır (50). Lin ve arkadaşları idiopatik testiküler yetmezlik tespit edilen erkeklerin testis biyopsilerinde germ hücrelerinde apoptozis artışı tespit etmişler. Bu bilginin eşliğinde apoptotik germ hücrelerindeki artışın testiküler disfonksiyon ve infertiliteye sebep olabileceğini öne sürmüşlerdir (51).

2.5 Varikoselin Spermatogenezisteki Moleküler Etkileri

Testiste spermatogonal germ hücrelerin haploid spermatozoaya dönüşümü sertoli hücrelerine yüksek derecede bağımlı oldukça kompleks bir süreçtir. Günümüzde en önemli soru işaretlerinden biri durgun kök hücreleri uyaran sertoli hücrelerinden kaynaklı faktörlerin ortaya çıkarılmasıdır. SCF/c-kit sisteminin testiste; germ hücre migrasyonu, hücre adezyonu, hücre çoğalması ve anti-apoptotik aksiyonlar olmak üzere bir çok fonksiyonu gösterilmiştir (52, 53).

Değişik datalar SCF/c-kit sisteminin primordial germ hücre (PGC) migrasyonunda rolü olduğunu öne sürmüşlerdir (52, 54). SCF/c-kit sisteminin gama ışınması ve serum tükenmesine bağlı apoptozisten hücreleri koruduğu gözlemlenmiştir (53). SCF lenfositlerde Bcl-2 ifadenmesini artırarak apoptozisi

engellemektedir (55). SCF' nin membrana bağlı ve serbest form olmak üzere 2 formu vardır ve her iki formunda apoptozisten koruma fonksiyonu vardır. Ancak, çözüner form sadece kısa dönem sağ kalımda etkili iken membrana bağlı form germ hücrelerinin uzun dönem sağkalımında etkilidir (56). Yoshinaga ve ark. (57) SCF/c-kit sisteminin tip A spermatogonyumun farklılaşmasında hücre sağ kalımını teşvik ettiğini öne sürmüşlerdir.

SCF/c-kit sistemi ayrıca postnatal germ hücre büyümesinde etkilidir. Ancak bu etki evre bağımlıdır. Tip A1 ve A4 spermatogonyumlar SCF bağımlıdır. Tip B spermatogonyumlar c-kit bağımsızdır (57). Erişkin testisinde SCF ve c-kit somatik hücrelerde, germ hücrelerinde ve seminal plazmada gösterilmiştir. İmmünreaktif c-kit germ hücrelerinde ve leydig hücrelerinde tespit edilirken; SCF sertoli hücrelerinde tespit edilmiştir (58). SCF'nin membrana bağlı ve serbest formları hem normospermik erkekte hem de oligospermik/azoospermik erkekte gösterilmiştir. Ancak SCF konsantrasyonu normospermik erkeklerde infertil erkeklere göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (59).

Datalar birkaç insan çalışması olmakla beraber çoğunlukla hayvan modellerinden oluşmaktadır ve bu çalışmalar SCF/c-kit sistemdeki bozulmanın testiküler fonksiyonları etkileyebileceği öne sürmektedir. Ancak SCF/c-kit sisteminin insan testiküler patolojileri ile ilişkisini anlamak için daha fazla data ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.6 Varikosel Tedavisi

Yapılan çalışmalarda varikosel onarımının palpable varikoseli olan hastalarda fertilitate durmuna olumlu katkısı olduğu gösterilmiştir (60). Tedavi opsiyonları olarak açık cerrahi teknikler, radyolojik onarım ve laparoskopik girişimler önerilmektedir (61, 62). Radyolojik embolizasyon cerrahiye sekonder persistan yada tekrarlayan varikosellerde alternatif bir tedavi yöntemi olarak önerilmektedir (63).

Açık cerrahi yaklaşımlar olarak Palomo, İvanisevich ve Marmar cerrahi yaklaşımlar makroskopik ve mikroskopik olarak uygulanabilmektedir. Palomo tekniğinde internal spermatic ven inguinal kanaldan çıktığı noktada retroperitonda bağlanır (64). İnguinal ve subinguinal yaklaşım ile internal spermatic venin yanı sıra eksternal spermatic ven de bağlanabilmektedir. Mikroskopik varikoselektomi inguinal ve subinguinal yaklaşımla yapılabilir. İnternal spermatic arter subinguinal seviyede inguinal seviyeye göre 3 kat daha yoğun aç yapmaktadır ve venlere daha yapışık olarak izlenmektedir (65). Mikroskopik yaklaşımda spermatic arter ve lenfatikler daha fazla korunabilmekte ve testiküler atrofi ve hidrosel riski azaltılabilmektedir (66). Çeşitli çalışmalarda spermatic arterin bağlanması testiküler atrofiye sebep olmadığı gösterilmiştir (67, 68).

2.7 L-Karnitin

L-karnitin yapısal olarak aminoaside benzeyen vitamin benzeri bir moleküldür. İskelet kası, kalp, böbrek, karaciğer ve beyin gibi dokularda esansiyel aminoasitler olan lizin ve metioninden endojen olarak sentezlenir (69).

L-karnitinin antiradikal ve anti oksidan etkileri vardır ve ortamdan ROS'ni uzaklaştırır. Biyolojik membran lipidlerini oksidasyondan korur ve malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin birikmesini engeller (70,71). MDA'nın artışına bağlı oluşan birçok patolojik durumun L-karnitin varlığında gelişmediği gösterilmiştir (72, 73). L-karnitin memeli epitelinden epididim plazmasına ve spermatozoaya salgılanır. Burada serbest ve asetilenmiş olarak birikir. Vücutta en çok epididim sıvısında görülür (74).

Testiste üretilen spermatozoalar infertil ve immobildir ve epididimde postgonadal modifikasyona uğrayarak fertil hale gelirler. Spermin motilitesini kazanması L-karnitin artışına paralel olduğu gösterilmiştir (75, 76). Ancak L-karnitin hangi mekanizmayla erkek infertilitesini etkilediği henüz açığa kavuşturulmamıştır. ROS formasyonunu engellediği, serbest radikalleri yok ettiği ve hücreleri oksidatif stresten koruduğu bilinmektedir.

3.YÖNTEM VE GEREÇLER

3.1 Ratlar

Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'ndan 152-18756 sayılı 16/11/2009 tarihli belgeyle etik kurul onayı alındıktan sonra 250-300 gr ağırlığındak 42 adet wistar rat deneyde kullanıldı. Ratlar su içmeleri serbest olmak üzere işlemden 24 saat öncesinden aç bırakıldı.

3.2 Grupların Dağılımı

42 rat her grupta 6 rat olacak şekilde 7 gruba rastgele dağıtıldı.

Grup 1: Kontrol grubu.

Grup 2: Sham grubu.

Grup 3: Deneysel varikozel modeli oluşturulup herhangi bir tedavi uygulanmayan grup.

Grup 4: Deneysel varikozel modeli oluşturulup postop 30. Günde spermatik arter korunmadan spermatik ven ligasyonu uygulanan grup.

Grup 5: Deneysel varikozel modeli oluşturulup postop 30. Günde spermatik arter korunarak spermatik ven ligasyonu uygulanan grup.

Grup 6: Deneysel varikozel modeli oluşturulup postop 30 gün L- karnitin tedavisi verildikten sonra spermatik arter korunmadan spermatik ven ligasyonu uygulanan grup.

Grup 7: Deneysel varikozel modeli oluşturulup postop30 gün L- karnitin tedavisi verildikten sonra spermatik arter korunarak spermatik ven ligasyonu uygulanan grup.

3.3. Cerrahi Prosedür

Ratlar 24 saatlik açlık sonrası laboratuvar Őartlarında 50-100 mg/kg ketamin i.m uygulaması sonrası cerrahi işleme tabi tutuldu.

Varikozel modeli: Anestezi indüksiyonunu takiben polividon iyot ile uygun saha temizliğini takiben median abdominal insizyon yapıldı. Takiben barsaklar medialize edilerek sol renal ven, vena kava ve spermatik ven visalize edildi. Takiben sol renal ven serbestleştirildi. Varikozel modeli oluşturulacak gruptaki ratlarda (grup 3, 4, 5, 6 ve 7) renal venin etrafından 4/0 serbest ipek sütür ile geçildi. Takiben, 20 G anjioket renal ven üzerine paralel olacak Şekilde yerleştirildi. Sol internal spermatik venin renal vene girdiği yerin proksimalinden 4/0 ipek sütür ile renal ven kılavuz teli saracak Şekilde daraltıldı ve kılavuz tel çıkarıldı. Renal vende %50 oranında daralma olduğu gözlendi. İşlemlerden sonra batın 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sütürler ile 2 tabaka halinde kapatıldı.

Sham modeli: Sham grubundaki (grup 2) 6 rata orta hat insizyonu yapıldı. Takiben barsaklar medialize edilerek sol renal ven, vena kava ve spermatik ven visalize edildi. Takiben sol renal ven serbestleştirildi. Sol renal venin etrafından 4/0 serbest ipek sütür ile geçildi. İpek sütür bağlanmadan işlem sonlandırıldı.

İşlemlerden sonra batın 3/0 katgüt ve 3/0 ipek sütürler ile 2 tabaka halinde kapatıldı.

Kontrol grubu: Bu grupta yer alan 6 hayvana orta hat insizyonu yapılarak abdomene girildi. Takiben hiçbir işlem yapılmadan abdomen 2 kat halinde kapatıldı.

Varikozel modeli oluşturulan grup 4 ,5 ,6 ,7' de yer alan 24 rata varikoselektomi uygulandı.

Varikoselektomi modeli: Eski abdominal orta hat insizyonundan batına girildi. Sol spermatic venler dilate ve tortioze olarak izlendi. Arter korumasız varikoselektomi uygulanacak ratlarda (grup 4 ve 6) sol spermatic ven ve arter sol renal venle birleşmeden serbestleştirilerek 4/0 ipek sütür ile bağlanarak yüksek ligasyon yapıldı. Arter korumalı spermatic ven ligasyonu uygulanacak ratlarda (grup 5 ve 7) sol spermatic ven renal venle birleşmeden önce serbestleştirilerek spermatic arter korunarak 4/0 ipek sütür ile bağlandı ve yüksek ligasyon varikoselektomi uygulandı. İşlemlerden sonra abdomen 2 kat halinde kapatıldı.

Grup 6, ve 7'de bulunan 12 rata ise varikoselektomi modeli oluşturulduktan sonra 500 mg/kg/gün dozunda L-karnitin 30 gün boyunca i.m olarak uygulandı.

Varikoselektomi etkisinin oluşması için 30 gün beklendikten sonra tüm ratlara ketamin anestezisi altında bilateral orşiektomi işlemi ve ötenazi uygulandı. Alınan dokular, mRNA ifadesinin değerlendirilmesi için Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (A.D)' na, protein ifadesinin değerlendirilmesi ve testisin histolojik olarak incelenmesi için Patoloji A.D' na gönderildi.

3.4 Moleküler Değerlendirme

3.4.1 Rat Testislerinden Total RNA Saflaştırılması

Doku örneklerinden total RNA saflaştırma işlemi dokudan RNA izolasyon kiti kullanılarak, aşağıda yazılı olan protokole göre yapıldı.

- 1- 1.5 ml' lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokuların üzerine 1000 mikrolitre (μ l) TriFast eklendi ve homojenizatör ile parçalandıktan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildi.
- 2- 200 μ l kloroform eklenerek, 15 sn boyunca karıştırıldı ve 10 dk oda sıcaklığında tutuldu.
- 3- Örnekler 11.000 rpm'de 5 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı.
- 4- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve üzerine 500 μ l izopropanol eklenip karıştırıldı.
- 5- Örnekler 1.5 saat -20 °C' de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı.

- 6- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 µl DNaz (µg başına 5U DNaz), 300 µl DNaz Buffer I ve 400 µl DEPC'li su eklenerek 30 dk 37 °C' de bekletildi.
- 7- Örneklerin üzerine 300 µl 25mM EDTA eklendi ve 65 °C' de 10 dk bekletildi.
- 8- 13.000 rpm'de 10 dk 4 °C'de santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 9- 1000 µl %75' lik alkol (taze hazırlanır) eklenerek, 12.500 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 10- Çökelti üzerine tekrar 1000 µl %75' lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dk 4 °C' de santrifüj edildi. Çökeltiye dokunmadan üst sıvı atıldı.
- 11- Çökelti kurumaya bırakıldı. 30-50 µl DEPC'li su ile sulandırıldı. Çalışma gününe kadar -80 °C' de saklandı.

Primer olarak random hegzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

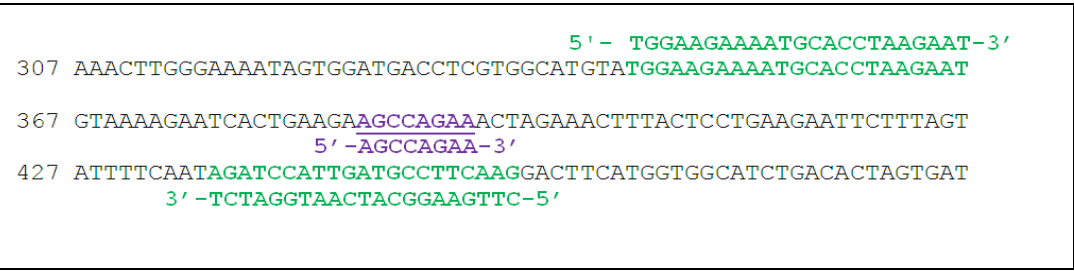
3.4.2 SCF Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

SCF genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri Şekil 1'de gösterildi.

SCFF 5'- TGGAAGAAAATGCACCTAAGAAT-3'

SCFR 5'- CTTGAAGGCATCAATGGATCT-3'

129 numaralı prob dizisi: 5'-AGCCAGAA-3'



Şekil 1: SCF mRNA'sının Belirlenmesinde Kullanılan Primerler ve UPL Probu cDNA Dizisi Üzerindeki Yerleşimi.

Şekil 1' de gösterilen primer ve prob kullanılarak Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi.

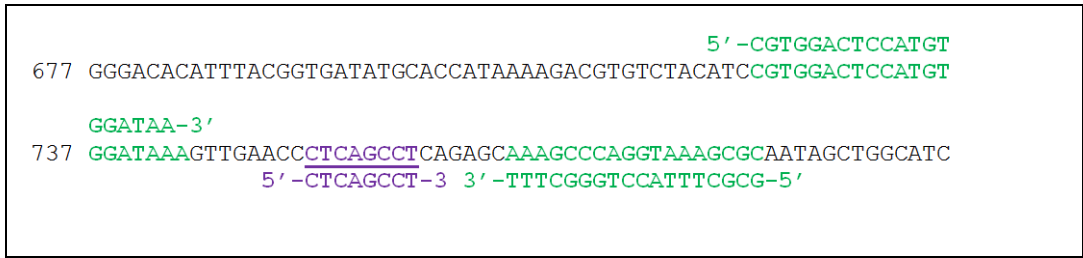
3.4.3 c-Kit Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

c-Kit genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri şekil 2' de gösterildi.

c-KitF 5'- CGTGGACTCCATGTGGATAA-3'

c-KitR 5'- GCGCTTTACCTGGGCTTT -3'

111 numaralı prob dizisi: 5'-CTCAGCCT-3'



Şekil 2: C-kit mRNA'sının Belirlenmesinde Kullanılan Primerler ve UPL Probu'nun cDNA Dizisi Üzerindeki Yerleşimi

Şekil 2' de gösterilen primer ve prob kullanılarak Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi.

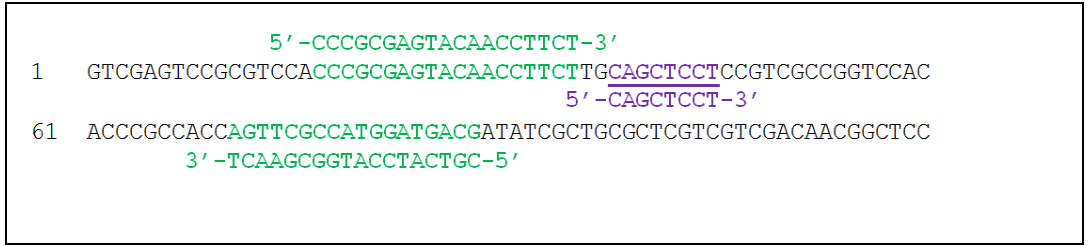
3.4.4 β-Aktin Geninin İfade Düzeyinin Kantitatif Analizi

Actb (beta- aktin) genine ait UPL prob ve primerlerin cDNA'daki yerleşimleri Şekil 3'de gösterildi.

ActbF 5'- CCCGCGAGTACAACCTTCT-3'

ActbR 5'- CGTCATCCATGGCGAACT -3'

17 numaralı prob dizisi: 5'- CAGCTCCT-3'



Şekil 3: Actb mRNA'sının Belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi.

Şekil 3' de gösterilen primer ve problar kullanılarak Real-time PCR tepkimesi gerçekleştirildi.

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra 96'lık kuyulu mikropalakaya dağıtıldı ve üzerine cDNA'ler eklendi. Mikropalaka yerleştirildikten sonra PCR tepkimesi gerçekleştirildi. C-kit, scf, ve actb genleri için aynı PCR programı kullanıldı.

3.4.5 Dokudan Protein İzolasyonu

100 mg doku örneği küçük parçalara ayrıldı. 800 µl parçalama çözeltilisi eklenip 10 µl proteinaz inhibitör kokteyli eklendi. Doku örnekleri homojenizatör yardımıyla 10 sn boyunca buz üzerinde parçalandı. Örnekler +4 °C'de, 10 dakika 11.000 rpm' de santrifüj edilerek üst kısım bir başka mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve protein miktarının ölçümü yapıldı.

3.4.6 Protein Miktarının Ölçümü

Elde edilen total protein miktarının ölçümünde BCA Protein Assay kiti kullanıldı. Kit protokolüne uygun olacak şekilde konsantrasyonları 25 µg ile 2000 µg arasında değişen 7 adet Bovine Serum Albumin (BSA) dilüsyonları oluşturuldu. Kit içerisinde bulunan A ve B çözeltileri 50:1 oranında karıştırılarak elde edilen karışım standart protein dilüsyonlarına eklendi ve 30 dk 37 °C'de inkübe edildi. Süre sonunda standartların konsantrasyonları spektrofotometre cihazında 562 nm dalga boyunda ölçülerek standart eğri hazırlandı. Dokudan izole edilen protein örnekleri de benzer şekilde hazırlandıktan sonra absorbans değerleri ölçülüp oluşturulan standart eğri yardımıyla protein miktarları belirlendi.

3.4.7 Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

Testis dokusundaki kaspaz-3 aktivitesi aşağıda yazılı olan protokole gore yapıldı.

- 1- Herbir rnek 50 μ l'de 200 μ g olacak şekilde seyreltildi.
- 2- Herbir örneğe 50 μ l reaksiyon tamponu ve son konsantrasyonu 10mM olacak şekilde DTT eklendi.
- 3- Örneklere 4mM DEVD-pNA stoğundan 5 μ l eklenerek, karanlıkta 37 $^{\circ}$ C'de 2 saat bekletildi.
- 4- Sure sonunda 405 nm'de spektrofotometrede lum yapılarak absorbans değerleri belirlendi.

3.5 Histopatolojik Değerlendirme

Ratlara ait testis dokuları, %10 luk formaldehitte 6 saatlik fiksasyonu takiben rutin parafin doku takip işleminden geçirildi. Parafin bloklar 4 mikron kalınlığında kesilerek, hematokilen-eozin (H&E) ile boyandı. Kesitler ışık mikroskopik olarak, iskeminin derecelendirilmesi için Cosentino ve meslekdaşlarının kullandığı 4 dereceli sistem ile seminifer tubllerindeki hücre zedelenmesi semi-kantitatif olarak değerlendirildi (77).

Grade 1: Germ hücrelerin normal dizilimi ile karakterli normal testis parankimi

Grade 2: Germ hücrelerin diziliminde hafif derecede bozulma ve hücrelerde kohezyon kaybı ile karakterli testis parankimi

Grade 3: Germ hücre nükleusları piknotik ve büzölmüş görünümde; hücreler seminifer tüböl lümenlerine dökölmüş, seminifer tüböl sınırları belirginliğini kaybetmeye başlamış

Grade 4: Germ hücrelerinde koagölasyon nekrozu ile karakterli testis parankimi

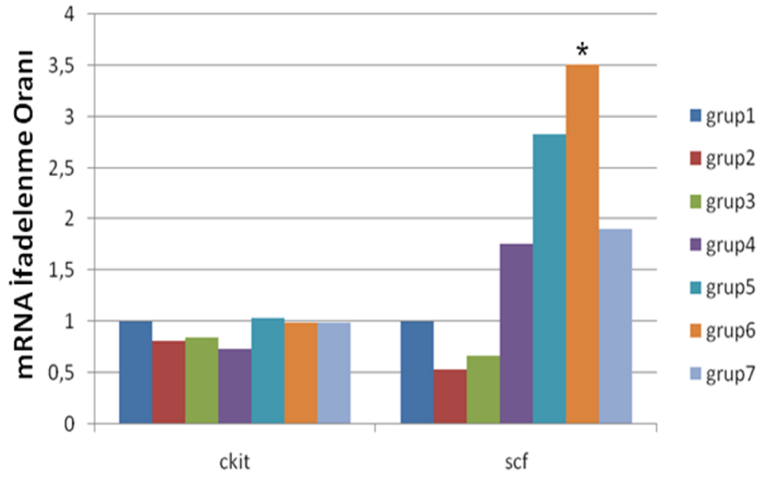
3.6 İstatistiksel Yöntem

Testis dokularında izlenen SCF ve c-Kit mRNA ifadelerine ait veriler REST (2008) Real-time PCR istatistik programı kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki Kaspaz-3 aktiviteleri nonparametrik Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırıldı. Veriler SigmaStat 3.5 istatistik programında değerlendirildi. Anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1 Moleküler Bulgular

SCF ve c-kit gen ifade değişimleri kantitatif olarak değerlendirildi. Hedef genlerin ifade değişimlerini normalize etmek için her bir örneğin, β -aktin ifade düzeyi belirlendi.



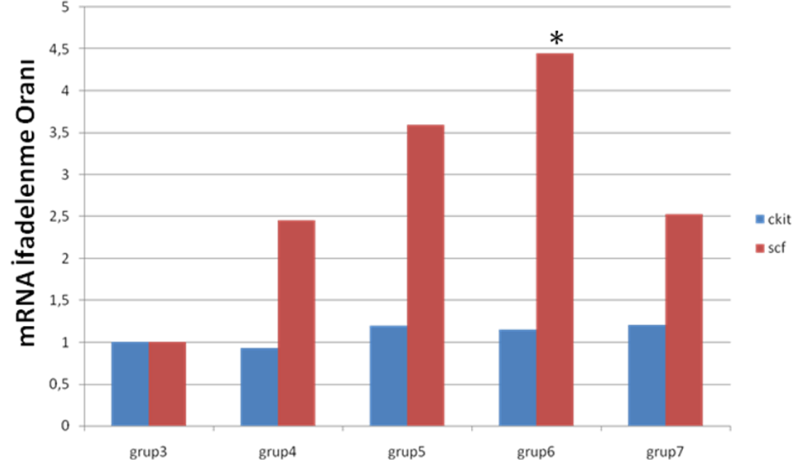
Grafik 1: Kontrol Grubu İle Karşılaştırıldığında SCF/c-kit mRNA İfadesi

*: İstatistiksel olarak anlamlı değer

Kontrol grubu (1.grup) ile varikoselektomi (spermatik arter korumasız)+ L-karnitin tedavisi alan (6.grup) karşılaştırıldığında SCF mRNA ifade düzeyinin 3.51 kat arttığı ($P=0.035$) buna karşın c-kit mRNA ifadesinin ise değişmediği (ifade değişim oranı 1.01) belirlendi. ($P=0.989$) (Grafik 1)

Sham kontrol (2. Grup) ile spermatik ven ligasyonu (spermatik arter korumasız)+ L-karnitin tedvisi alan (6. grup) karşılaştırıldığında SCF mRNA

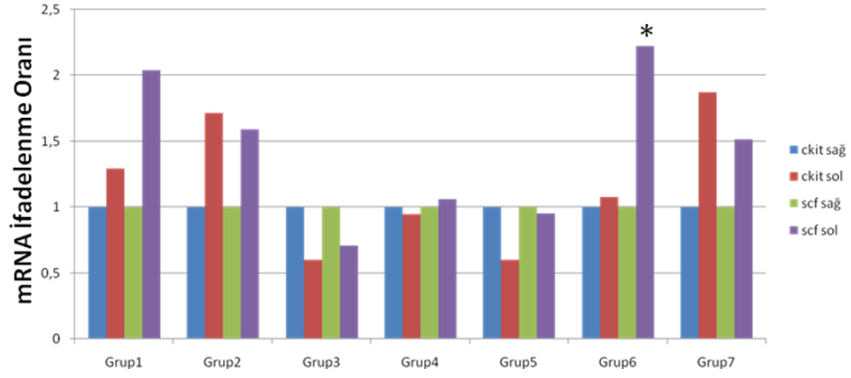
ifade düzeyinin 4.32 kat arttığı (P=0.039) buna karşın c-kit mRNA ifadesinin ise değişmediği (ifade değişim oranı 1.05) bulundu. (P=0.926) (Grafik 1)



Grafik 2: Varikozel Grubu İle Karşılaştırıldığında SCF/c-kit mRNA İfadesi

*: İstatistiksel olarak anlamlı değer

Varikozel oluşturulmuş (3. Grup) ile spermatik ven ligasyonu (spermatik arter korumasız)+ L-karnitin tedavisi alan (6. grup) karşılaştırıldığında SCF mRNA ifadenme düzeyinin 4.45 kat arttığı (P=0.046) buna karşın c-kit mRNA ifadenmesinin değişmediği bulundu. (P=0.735) (Grafik 2)



Grafik 3: Grupların Sağ ve Sol Testisleri Karşılaştırıldığında SCF/c-kit mRNA İfadesi

*: İstatistiksel olarak anlamlı değer

Kontrol grubunda sol testis ile sağ testis karşılaştırıldığında, sol testisteki SCF mRNA miktarında sağ testise göre 2.04 kat, c-kit mRNA'sının ise 1.29 kat arttığı belirlenmesine rağmen kontrolde gözlenen bu ifade değişikliklerinin istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlendi ($P>0.05$) (Grafik 3)

Spermatik ven ligasyonu (spermatik arter korumasız)+ L-karnitin tedavisi alan (6. grup) gruba ait sol ve sağ testis verileri karşılaştırıldığında, sol testisteki SCF mRNA ifade miktarının sağ testise göre yaklaşık 2.2 kat arttığı ($P=0.044$)

bulundu. (Grafik 3). Ancak, c-kit mRNA ifadesinin değişmediği belirlendi. (P=0.751) (Grafik 3)

Spermatik ven ligasyonu (spermatik arter korumalı)+ L-karnitin tedavisi alan (7. grup) gruba ait sol ve sağ testis verileri karşılaştırıldığında, SCF mRNA ifadesinin değişmediği gözlendi. Buna karşın c-Kit mRNA ifade miktarının yaklaşık 1.87 kat artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (P=0.113) bulundu. (Grafik 3).

Kaspaz-3 Aktivitesinin Belirlenmesi

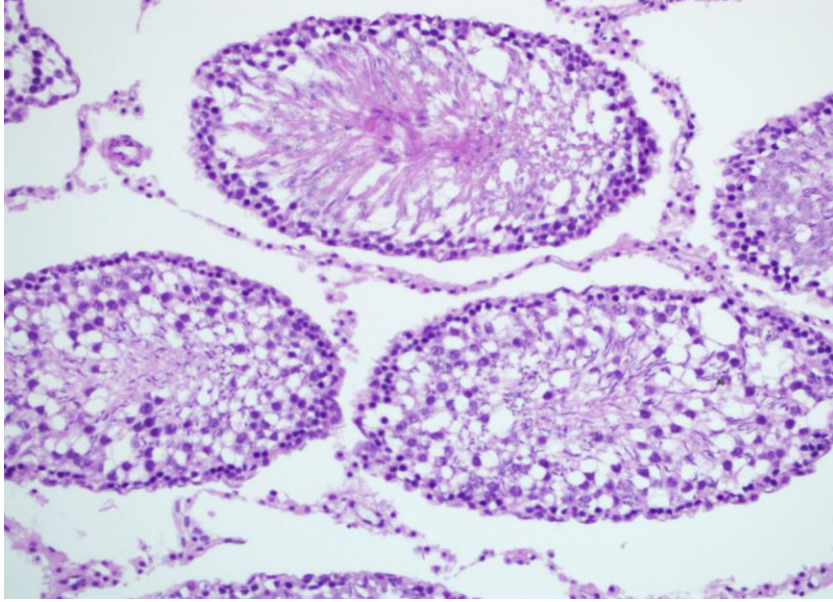
Tablo 1: Çalışma Grupları Arasında Kaspaz-3 Aktivite Düzeyinin Karşılaştırılması

Gruplar	P Değeri
Grup 1 ve Grup 2	0.656
Grup 1 ve Grup 3	0.276
Grup 1 ve Grup 4	0.851
Grup 1 ve Grup 5	0.433
Grup 1 ve Grup 6	0.549
Grup 1 ve Grup 7	0.977
Grup 3 ve Grup 4	0.237
Grup 3 ve Grup 5	0.118
Grup 3 ve Grup 6	0.850
Grup 3 ve Grup 7	0.312
Grup 4 ve Grup 5	0.550
Grup 4 ve Grup 6	0.486
Grup 5 ve Grup 7	0.491
Grup6 ve Grup 7	0.576

Çalışma grupları arasında kaspaz-3 aktivitesi açısından fark gözlenmedi. ($p>0.05$)

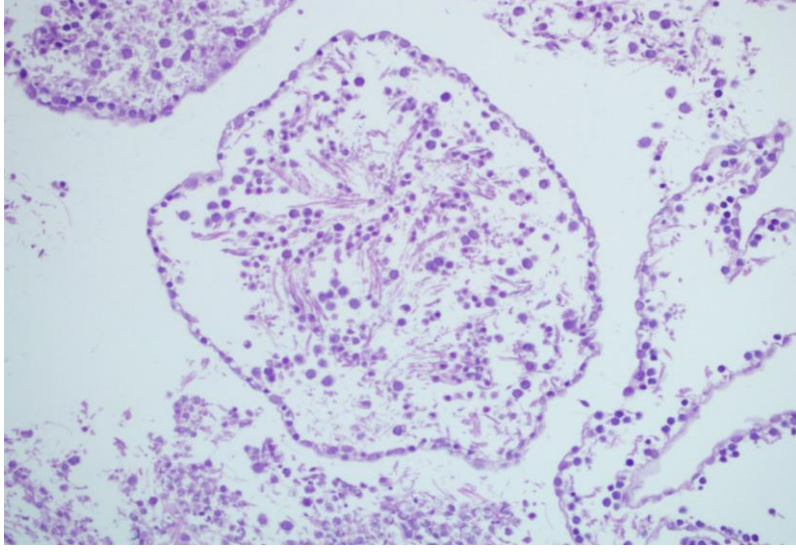
4.3 Histopatolojik bulgular

Yapılan histopatolojik incelemede testisler Cosentino skoruna göre değerlendirildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. ($p>0.05$)



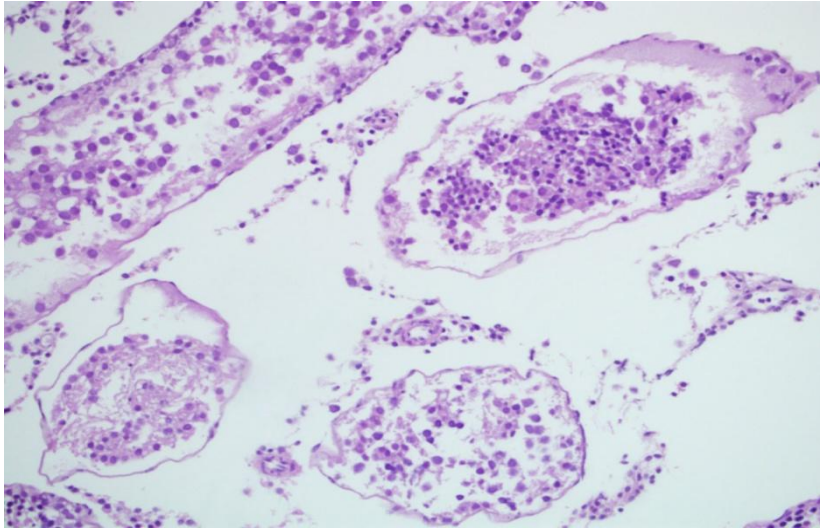
Resim 1: Kontrol Grubundan (grup 1) bir Rat Testisinin Histopatolojik Görüntüsü.

(Cosentino skor 1. Germ hücrelerinin normal dizilimi ile karakterli normal testis)



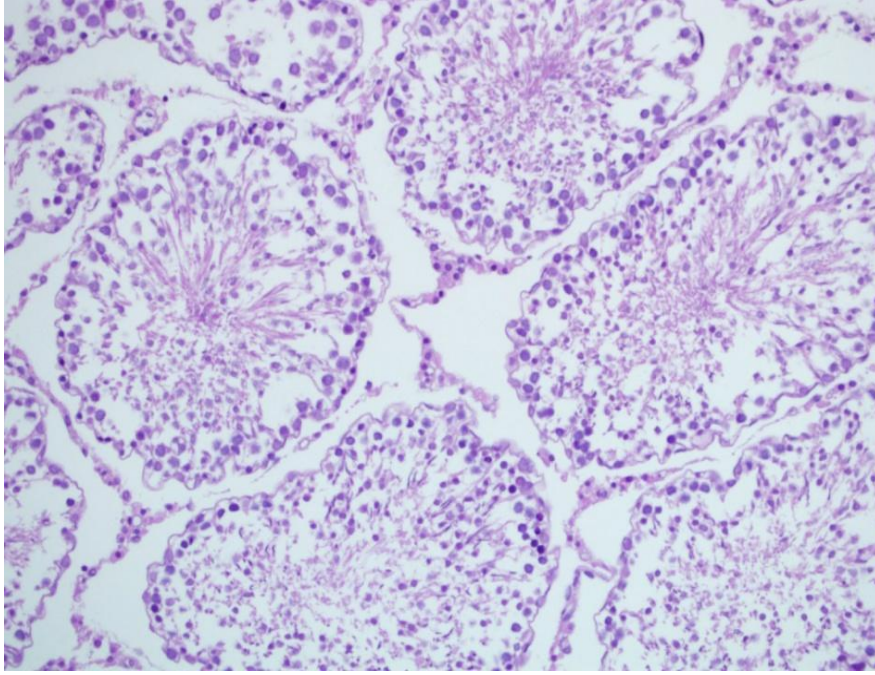
Resim 2: Spermatik Arter Korumasız Varikoselektomi Grubundan (grup 4) bir Rat Testisi Görüntüsü

(Cosentino skor 2. Germ hücrelerin diziliminde hafif derecede bozulma ve hücrelerde kohezyon kaybı ile karakterli testis parankimi)



Resim 3: Varikozel Grubundan (grup 3) bir Rat Testisi Görüntüsü

(Cosentino skor 3. Germ hücre nükleusları piknotik ve büzölmüş görünümde; hücreler seminifer tuböl lümenlerine dökölmüş, seminifer tuböl sınırları belirginliğini kaybetmeye başlamış.)



Resim 5: Spermatik Arter Korumalı Varikoselektomi Grubundan (grup 5) bir Rat Testisi Görünümü

(Cosentino skor 1. Germ hücrelerinin normal dizilimi ile karakterli normal testis)

5.TARTIŞMA

Varikosel erkek subfertilitesinin en önemli düzeltilebilir patolojisi olarak bilinmektedir. Günümüzde varikosel tedavisinde radyolojik olarak uygulanan perkütan embolizasyon ve cerrahi girişimler olmak üzere iki yaklaşım bulunmaktadır. Tulloch'un (78) 1952 yılında bilateral varikoseli olan azoospermik hastaya bilateral spermatik ven ligasyonu uygulamasının ardından sperm sayısının 27 milyona çıkması ve gebelik oluşması infertil hastaların tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur. Bunu takiben spermatik ven ligasyonu erkek infertilitesinde en sık uygulanan cerrahi yöntem haline gelmiştir. French ve ark. (78) spermatik ven ligasyonunun uygun şekilde seçilmiş hasta grubunda sadece efektif bir cerrahi seçenek olmadığını aynı zamanda son derece kostefektif bir tercih olduğunu öne sürmüşlerdir.

Testis; testiküler, kremasterik ve vasal arterler olmak üzere 3 arteryel sistem ile beslenmektedir. Aynı zamanda, inguinal bölgede eski düşüncelerin aksine tek arter olarak değil, hastadan hastaya değişmekle beraber birden fazla arter olarak bulunmaktadır (78). Hoops ve ark. (65) subinguinal varikoselektomide %42 oranında 2 arter, %33 oranında 3 veya daha fazla arter izole etmişlerdir. Matsuda ve ark. (68) arter korumalı ve korumasız spermatik ven ligasyonu uygulanmış 116 hastanın retrospektif verileri incelenmiş. Postoperatif gebelik oranları; arter korumalı varikoselektomi uygulanan hasta grubunda %37.8, arter korumasız hasta grubunda ise %23.8 oranında bulunmuş ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Yamamoto ve ark.(80) arter

korumalı ve korumasız varikosektomi sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında, gruplar arasında postoperatif semen parametrelerindeki düzelme ve postoperatif 1 yıl içinde oluşan gebelik oranları açısından istatistiksel anlamlı fark olmadığını göstermişlerdir. Huk ve ark. (81) yaptıkları çalışmalarında, arter korumasız varikosektomi grubunda postoperatif semen parametrelerinde arter korumalı gruba göre daha iyi düzelmeler tespit etmişlerdir. Aynı zamanda, arter korumalı grupta gebelik oranları değerlendirildiğinde arter korumasız gruba göre sadece küçük bir olumlu fark tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, arter korumasız varikosektomi uygulanan hasta gruplarında testis atrofi gözlenmemiştir (81, 82). Arter korunması; daha önce varikosektomi, inguinal herni, orşiopeksi veya vazektomi geçirmiş hasta grubunda, soliter testis veya testiküler hipotrofi durumlarında önerilmektedir (83-85). Bizim çalışmamızda da arter korumalı ve korumasız tedavi grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı. (Grafik 1, 2, 3)

Ancak, varikosektomi sonrası bazı hastalarda sperm parametrelerinde düzelme sağlanırken bazı hastalarda sağlanamamaktadır. Aynı zamanda, fertilité sağlanamaması da varikoselde infertilite ve subfertiliteye neden olan patofizyolojik etmenlerin tam olarak aydınlatılamamasına bağlanabilir. Varikozel patofizyolojisinde etkin rol oynayabilecek faktörler arasında, testiküler kan akımı, testis-interstisyel sıvı ilişkisi, hipertermi, venöz basınç, renal-adrenal reflü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyonu, oksidatif stres ve apoptozis sayılabilir (12).

Özellikle idiyopatik erkek infertilitesinin oluşmasında etkin genetik faktörleri ortaya çıkarabilmek için moleküler çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla genellikle hayvan modelleri tercih edilmektedir. Yapılan çalışmalarda değişik sınıflarda otozomal genler, transkripsiyon faktörleri, ısı şok proteinleri, büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri, steroid reseptörler ve DNA tamir enzim sistemleri araştırılmıştır (86-90). Bu faktörlerden c-kit ve ligandı SCF spermatogenezis kontrolünde ve oluşumunda otozomal genlerin rolünü açıklığa kavuşturmak amacıyla kullanılan anahtar düzenleyiciler olarak gösterilmektedir (91). Bir tirozin kinaz reseptörü olan c-kit, PDGF alfa ve beta reseptörü ve koloni uyarıcı faktör reseptörü ile aynı sınıftandır (92, 93). C- kit 150 kDa ağırlığında ligandı olan SCF'nin bağlandığı extrasellüler, transmembran ve kinaz alanı içeren intrasellüler bölümler olmak üzere 3 kısımdan oluşur. C-kit ligandı ise SCF serbest ve membrana bağlı form olmak üzere 2 formda bulunur.

Mutasyona uğramış SCF ve c-kit'e sahip farede primordial germ hücre sayısında belirgin düşüş olması SCF/c-kit yolağının germ hücre gelişiminde çok önemli rolü olduğunu düşündürmektedir (91). Embriyonal gonadda germ hücrelerinin migrasyonundan önce ve sonra c-kit tespit edilmiştir (94). Bu bulguların ışığında SCF/c-kit sisteminin primordial germ hücrelerinin normal migrasyon ve çoğalmasında etkin olabileceği düşünülmüştür ve çalışmalara başlanmıştır. Aynı zamanda primordial germ hücrelerinin "nurse hücreler" olarak adlandırılan ve SCF üreten hücrelerle beraber hücre kültürüne alındığında

veya ortamda membrana bağlı SCF varlığında çoğalabildikleri görülmüştür (56, 95).

C-kit mRNA testiste spermatogonyum ve leydig hücrelerindeki c-kit reseptör proteinini kodlamaktadır (96, 54). C-kit gen ürünü SCF reseptörü en yüksek düzeylerine Tip A spermatogonyumlarda ulaştığı ortaya konmuştur (97, 57). SCF mRNA'sı erişkin fare testisinde sertoli hücreleri tarafından kodlanmaktadır ve FSH ve cAMP (siklik adenozin monofosfat) analogları tarafından kodlanmasının uyarılabildiği gösterilmiştir (98).

Çalışmamızda deneysel varikozel modeli aracılığıyla oksidatif stres oluşturulup, takiben arter korumalı ve korumasız spermatik ven ligasyonu uygulanan ratlarda SCF ve c-kit mRNA ifade edilme düzeyleri incelenmiştir. Ayrıca, 2 grup hayvana spermatik ven ligasyonuna ilaveten L-karnitin tedavisi uygulandıktan sonra SCF/c-kit ifade düzeyleri de incelenmiştir.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SCF ifade düzeyinde spermatik arter korumasız spermatik ven ligasyonu uygulanıp ek L-karnitin tedavisi uygulanan ratlarda (grup 6) 3.51 kat artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,035$) olduğu gözlenmektedir. Kontrol grubu ile arter korumalı spermatik ven ligasyonu uygulanan (grup 5) ratlar karşılaştırıldığında 2.83 kat artış bulunmuştur. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0.072$).

Sham grubu ile karşılaştırıldığında grup 6' da bulunan ratlarda SCF mRNA ifadesinde 4.32 kat artış gözlenmektedir ve bu artış istatistiksel olarak

anlamlıdır ($p=0,039$). Grup 5 ile sham karşılaştırıldığında 3.03 kat; arter korumasız spermatik ven ligasyonu uygulanan gruptaki ratlar karşılaştırıldığında (grup 4) 2.32 kat; arter korumalı spermatik ven ligasyonu uygulanan ve L-karnitin tedavisi verilen (grup 7) gruptaki ratlar karşılaştırıldığında 2.14 kat artış saptanmıştır. Ancak, bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (sırasıyla; $p=0,075$, $p=0,238$, $p=0,278$).

Varikozel grubu ile karşılaştırıldığında grup 6 'daki ratlarda SCF ifade düzeyinde 4,45 kat artış saptanmaktadır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır. ($p=0,046$) Grup 5 ile varikozel grubu karşılaştırıldığında 3,59 kat artış saptanmaktadır ve bu düzey istatistiksel olarak sınırda bulunmuştur ($p=0,059$) Grup 4 ve 7 varikozel grubu ile karşılaştırıldığında sırasıyla 2.45 ve 2.53 kat artış saptanmaktadır. Ancak, saptanan fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. (sırasıyla; $p=0,223$, $p=0,22$) Yapılan tüm gruplar arası değerlendirmelerde c-kit mRNA ifade düzeyleri karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

SCF düzeyindeki artışa tip 3 reseptör tirozin kinaz aile grubundan biri olan c-kit proto-onkogenin aynı düzeyde artışla eşlik etmemesi bize bu genin diğer tirozin kinaz yollarında olduğu gibi başka reseptör veya reseptörler aracılığıyla fonksiyon görebilecek olmasını; c-kit reseptörünü kodlayan genlerde meydana gelebilecek genetik ve epigenetik yeni düzenlemelerin ve bu reseptörün plazma membranına taşınmasında meydana gelebilecek modifikasyonların varlığını; SCF

mRNA'sının yıkımının gecikmesinden kaynaklanabileceğini düşündürmüştür (99).

Ayrıca, hücre membranında reseptör azlığı nedeniyle ortamda bulunan reseptörüne bağlanmamış SCF'nin diğer bir fonksiyonu olan anti - apoptotik yolağı çalıştırdığı ve apoptozisi inhibe ettiğini akla getirebilmektedir.

Apoptozis fizyolojik bir olaydır ve insanda normal spermatogenez sırasında olduğu gibi pek çok organda düzenleyici role sahiptir. Kerr ve ark. (100) tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak apoptozis gerçekleştiği ve bu sayede germ hücre sayı ve kalitesinin düzenlendiğini bildirilmiştir. Lin ve ark. (101) yaptıkları çalışmada idiopatik testiküler yetmezliği olan infertil erkeklerin testis biyopsilerini değerlendirmişler ve germ hücre apoptozisinde artış saptamışlardır. Varikosele bağlı infertilitede artmış germ hücre apoptozisinin önemli bir role sahip olduğunu destekleyen bir diğer çalışmada ise Baccetti ve ark. (102) varikoselli hastaların ejakulat örnekleri değerlendirilmiş ve apoptotik sperm hücre sayıları varikoseli olmayan erkeklere kıyasla yaklaşık 100 kat daha fazla bulunmuştur. Yılmaz ve ark. (103) deneysel varikosel modelinde varikosel oluşumunu takip eden 14. günde germ hücrelerinde oluşan apoptozisin kontrol grubuna oranla 2 kat arttığını ve 28. günde ise maksimuma ulaştığını göstermişlerdir.

SCF/c-kit yolağının gama ışması ve hücre kültüründe besi yerinin azalmasına bağlı apoptozisten hücreleri koruduğu gözlemlenmiştir (53). SCF lenfositlerde Bcl-2 ifadelenmesini artırarak apoptozisi engellemektedir (55). SCF'

nin membrana bağlı ve serbest form olmak üzere 2 formu vardır ve her iki formunda apoptozisten koruma fonksiyonu vardır. Ancak, çözüdür form sadece kısa dönem sağ kalımda etkiliyken membrana bağlı form germ hücrelerinin uzun dönem sağ kalımında etkilidir (56). Yoshinaga ve arkadaşları SCF/ckit sisteminin tip A spermatogonyumun farklılaşmasında hücre sağ kalımını uyardığını öne sürmüşlerdir (57).

Çalışmamızda ‘Kaspaz 3’ yardımıyla germ hücre apoptozisi ve hemotoksilen eozin boyama ile Cosentino skoru değerlendirilmiştir. Gruplar kontrol grubu, varikozel grubu ve kendi aralarında karşılaştırılmışlardır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonunda Kaspaz 3 aktivitesi ve Cosentino skoru açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.

Literatürde varikosele bağlı olarak germ hücre apoptozisinde artma olmadığı aksine azalma olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur. Fujisawa ve ark. (50) yaptıkları çalışmada, varikozeli bulunan subfertil erkeklerden alınan testis biyopsi sonuçlarını varikozeli olmayan kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında varikozeli bulunan grupta germ hücre apoptozisinin daha düşük olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapılan değerlendirmelerde, bu farklı bulguların testis dokusunun fiksasyonu için fetal dana serumu yerine formaldehit kullanımından kaynaklandığını düşünmüşlerdir. Bizim çalışmamızda testis dokuları formaldehit solusyonu ile fiske edilmiştir. Ayrıca, apoptozis indeksi açısından anlamlı farklılık görülmemesinin SCF’ nin antiapoptotik özelliğinden kaynaklı olabileceği,

kullanılan rat sayısının farklılığı, spermatik ven ligasyonunun yapıldığı zaman aralığı olabileceğini düşündürmüştür.

Günümüzde varikoselin patofizyolojisinde pek çok etken sorumlu tutulmaktadır. Genetik alanında yaşanan gelişmeler eşliğinde varikoselin yarattığı infertilitenin diğer etkileri yanında testislerde moleküler seviyede de zararlı etkileri anlaşılmaya başlanmıştır. Bu gelişmeler yeni ve etkin tedavi modalitelerinin ortaya çıkarılmasına katkıda bulunulacaktır. Spermatogenezde önemli sinyal iletim yolağı olan SCF/c-kit sistemi infertilitenin moleküler temelini açıklanmasında önemli bir rol üstlendiği öne sürülmektedir. Bununla beraber infertilite ile varikosel ilişkisinin moleküler temellerinin anlaşılabilmesi için geniş kapsamlı ve uzun dönem takip sonuçlarına sahip çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

6.SONUÇ

Bu çalışmada deneysel olarak varikozel oluşturulmuş ratlarda arter korumalı ve korumasız spermatik ven ligasyonu yapılmış, iki gruptaki ratlara ise varikoselektomiye ek olarak L-karnitin tedavisi uygulanmıştır. Sonuç olarak, Scf mRNA ifade oranlarında tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı yükselme saptanmıştır. Cosentino skorlarında sağlanan iyileşme ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamız bulguları eşliğinde varikozel tedavisinde spermatik ven ligasyonunun etkinliği ortaya konmaktadır. Bununla beraber tedavi gruplarında gözlenen SCF gen ifade artışı SCF/c-kit yolağının infertilitedeki önemini ortaya koymaktadır. Bununla beraber infertilitenin moleküler temelini ortaya konmasında daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İnfertilitenin moleküler temelini aydınlatılması ile infertilite tedavisinde daha başarılı uygulamalar gerçekleştirilebilir.

7. ÖZET

Amaç: Çalışmamızda, moleküler düzeyde oksidatif stres oluşturulduktan sonra değişik cerrahi tekniklerle yapılan varikosektominin ve L- karnitin tedavisinin sperm hücrelerinin farklılaşma yolağındaki sinyal ifadenmesi üzerine olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: 250 – 300 gr ağırlığında 42 adet wistar rat gelişigüzel olarak her grupta 6 rat olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. 1. grup kontrol, 2. grup sham, 3. grup varikozel grubu olarak belirlendi. 4. gruba arter korumasız, 5. gruba arter korumalı varikosektomi uygulandı. 6. ve 7. gruba varikosektomiye ek olarak 500 mg/kg/gün dozunda L-karnitin tedavisi uygulandı.

Bulgular: Kontrol, Sham ve varikozel grupları ile 6. grup karşılaştırıldığında kök hücre faktörü (SCF) mRNA ifade düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı sırasıyla 3.51 kat ($p= 0.035$), 4.32 kat ($p= 0.039$) ve 4.45 kat arttığı ($p= 0.046$) bulundu. Çalışma grupları arasında kaspaz-3 aktivitesi açısından fark gözlenmedi ($p >0.05$). L- karnitin tedavisi eklendikten sonra SCF miktarında belirgin bir artış olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Varikosektomi sonrasında SCF miktarında meydana gelen anlamlı artış SCF/c-kit yolağının spermatogeneziste önemli bir sinyal yolağı olduğunu göstermektedir. İnfertiletinin moleküler temellerinin anlaşılabilmesi için geniş kapsamlı ve uzun dönem takip sonuçlarına sahip çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: Varikozel, SCF/c-kit, L-karnitin

8. SUMMARY

Objective: The aim of this study is to investigate the impact of various surgical varicocele techniques following the emergence of oxidative stress on molecular level and that of L-carnitine treatment on the expression levels of sperm cells in the signal pathways.

Material and Method: A total of 42 wistar rats each weighing about 250 – 300 gr were randomly divided into 7 groups each holding 6 rats. The first group was the control group, the second was the sham group and the third was the varicocele group. The fourth group underwent varicocele without artery preservation whereas the fifth group underwent varicocele with artery preservation. The sixth and seventh groups were treated with 500 mg/kg/day L-carnitine in addition to varicocele.

Results: When the control, sham and varicocele groups were compared with Group 6, it was observed that the stem cell factor (SCF) mRNA expression levels indicated statistically significant increases as 3.51 folds ($p= 0.035$), 4.32 folds ($p= 0.039$) and 4.45 folds ($p= 0.046$) respectively. No differences were observed among the groups in terms of caspase-3 activity ($p >0.05$). A significant increase was observed in the SCF mRNA expression level after treatment with L-carnitine.

Conclusion: The significant rise in the SCF mRNA expression level following the varicocele points to the fact that the SCF/c-kit pathway is an important signal pathway in spermatogenesis. However, for understanding molecular fundamentals of infertility require comprehensive future studies and long term follow-up results.

Keywords: Varicocele, SCF/c-kit, L-carnitine

9.KAYNAKLAR

- 1- French DB, Desai NR, Agarwal A. Varicocele repair: does it still have a role in infertility treatment? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008 Jun; 20(3): 269-74.
- 2- Hendry WF, Sommerville IF, Hall RR, Pugh RC. Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol.* 1973 Dec; 45(6): 684-92.
- 3- Fretz PC, Sandlow JI. Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Urol Clin North Am.* 2002 Nov; 29(4): 921-37.
- 4- Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update.* 1999 Sep-Oct; 5(5): 535-45.
- 5- Bialas M, Borczynska A, Rozwadowska N, Fiszer D, Kosicki W, Jedrzejczak P, Kurpisz M. SCF and c-kit expression profiles in male individuals with normal and impaired spermatogenesis. *Andrologia.* 2010 Apr; 42(2): 83-91.
- 6- Li J, Goodyer CG, Fellows F, Wang R. Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006; 38(5-6): 961-72.
- 7- Feng LX, Ravindranath N, Dym M. Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18; 275(33): 25572-6.
- 8- Hoyer PE, Byskov AG, Mollgard K. Stem cell factor and c-Kit in human primordial germ cells and fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Apr 29; 234(1-2): 1-10.

- 9- Ozgür H, Kaya M, Doran S, Solmaz S. Ultrastructure of the seminiferous tubules in human testes before and after varicocelectomy. *Anat Embryol (Berl)*. 2003 Dec; 207(4-5): 343-53.
- 10- Saalu LC, Ogun Tola JA, Babalola OS, Oyewopo A.O, Reversal of experimental varicocele-induced testicular toxicity by L-ascorbate in rats. *African Journal Of Biotechnology* 2009; 8(6): 965-970.
- 11- Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnoxicam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. *J Androl*. 2004 Sep-Oct; 25(5): 761-70.
- 12- Sigman M, Howard SS. Male Infertility in: Walsch PC, Refik A, Vaughan ED, Wein AJ, eds. *Campbell's Urology*. 7th edition. Philadelphia: W.B Saunders Company; 1998: 1287-1330.
- 13- Gorelick JJ, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril*. 1993 Mar; 59(3): 613-6.
- 14- Akbay E, Cayan S, Doruk E, Duce MN, Bozlu M. The prevalence of varicocele and varicocele-related testicular atrophy in Turkish children and adolescents. *BJU Int*. 2000 Sep; 86(4): 490-3.
- 15- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2001 Sep-Oct; 7(5): 473-81.
- 16- Braedel HU, Steffens J, Ziegler M, Polsky MS, Platt ML. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol*. 1994 Jan; 151(1): 62-6

- 17- World Health Organisation. WHO manual for standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male Cambridge University Press, 2000.
- 18- Harrison RM, Lewis RW, Roberts JA. Pathophysiology of varicocele in nonhuman primates: long-term seminal and testicular changes. *Fertil Steril*. 1986 Sep; 46(3): 500-10.
- 19- WHO: The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* 1992; 57: 1289-1293.
- 20- Dahl EV, Herrick JF. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by counter-current exchange. *Surg Gynecol Obstet*. 1959 Jun; 108(6): 697-705.
- 21- Zorngiotti AW, Macleod J. Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril*. 1973 Nov; 24(11): 854-63.
- 22- Salisz JA, Kass EJ, Steinert BW. The significance of elevated scrotal temperature in an adolescent with a varicocele. *Adv Exp Med Biol*. 1991; 286: 245-51.
- 23- Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K, Kamidono S. Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl*. 1989; 22(2): 149-59.
- 24- Turner TT, Brown KJ, Spann CL. Testicular intravascular volume and microvessel mitotic activity: effect of experimental varicocele. *J Androl*. 1993 May-Jun; 14(3): 180-6.

- 25- Green KF, Turner TT, Howards SS. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J Urol*. 1984 Jun; 131(6): 1208-11
- 26- Hurt GS, Howards SS, Turner TT. Repair of experimental varicoceles in the rat. Long-term effects on testicular blood flow and temperature and cauda epididymidal sperm concentration and motility. *J Androl*. 1986 Sep-Oct; 7(5): 271-276
- 27- Sweeney TE, Rozum JS, Desjardins C, Gore RW. Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *Am J Physiol*. 1991 May; 260 (5 Pt 2): H1581-9
- 28- Hsu HS, Chang LS, Chen MT, Wei YH. Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *Eur Urol*. 1994; 25(1): 71-5
- 29- Hsu HS, Wei YH, Li AF, Chen MT, Chang LS. Defective mitochondrial oxidative phosphorylation in varicocele-bearing testicles. *Urology*. 1995 Oct; 46(4): 545-9
- 30- Ahlberg NE, Bartley O, Chidekel N. Right and left gonadal veins. An anatomical and statistical study. *Acta Radiol Diagn (Stockh)*. 1966 Nov; 4(6): 593-601
- 31- Comhaire F, Kunnen M. Selective retrograde venography of the internal spermatic vein: a conclusive approach to the diagnosis of varicocele. *Andrologia*. 1976; 8(1): 11-24

- 32- Comhaire F, Vermeulen A. Varicocele sterility: cortisol and catecholamines. *Fertil Steril.* 1974 Jan; 25(1): 88-95
- 33- Rajfer J, Turner TT, Rivera F, Howards SS, Sikka SC. Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. *Biol Reprod.* 1987 May; 36(4): 933-7
- 34- Hudson RW, Crawford VA, McKay DE. The gonadotropin response of men with varicoceles to a four-hour infusion of gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril.* 1981 Nov; 36(5): 633-7
- 35- Fujisawa M, Hayashi A, Imanishi O, Tanaka H, Okada H, Matsumoto O, Kamidono S. The significance of gonadotropin-releasing hormone test for predicting fertility after varicocelectomy. *Fertil Steril.* 1994 Apr; 61(4): 779-82
- 36- Furuya S, Kumamoto Y, Sugiyama S. Fine structure and development of Sertoli junctions in human testis. *Arch Androl.* 1978 May; 1(3): 211-9
- 37- Jarow JP, Sanzone JJ. Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol.* 1992 Dec; 148(6): 1805-7
- 38- Haas GG Jr. The inhibitory effect of sperm-associated immunoglobulins on cervical mucus penetration. *Fertil Steril.* 1986 Aug; 46(2): 334-7.
- 39- Benoff S, Barcia M, Hurley IR, Cooper GW, Mandel FS, Heyner S et al. Classification of male factor infertility relevant to in-vitro fertilization insemination strategies using mannose ligands, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. *Hum Reprod.* 1996 Sep; 11(9): 1905-18

- 40- Holland MK, Alvarez JG, Storey BT. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biol Reprod.* 1982 Dec; 27(5): 1109-18
- 41- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 1991 Aug; 10(8): 2247-58
- 42- Aitken RJ and Fisher H. Reactive Oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefits and risks. *Bioassay* 1994; 16: 259-267.
- 43- De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod.* 1995 Oct; 10Suppl 1: 15-21
- 44- Aitken J, Krausz C, Buckingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol Reprod Dev.* 1994 Nov; 39(3): 268-79.
- 45- Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod.* 1998 Jun; 13(6): 1429-36
- 46- Mcleod J. Human male infertility. *Obstet Gynecol Surg.* 1971 ; 26: 335
- 47- Takihara H, Sakatoku J, Cockett AT. The pathophysiology of varicocele in male infertility. *Fertil Steril.* 1991 May; 55(5): 861-8.

- 48- Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 1995 Feb; 6(1): 3-16.
- 49- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995 Jan; 146(1): 3-15.
- 50- Fujisawa M, Hiramane C, Tanaka H, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol.* 1999 Oct; 17(5): 296-300
- 51- Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM et al. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol* 1997; 158: 1791-1793.
- 52- Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BL. Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature.* 1990 Oct18; 347(6294): 667-9.
- 53- Yee NS, Paek I, Besmer P. Role of kit-ligand in proliferation and suppression of apoptosis in mast cells: basis for radiosensitivity of white spotting and steel mutant mice. *J Exp Med.* 1994 Jun 1; 179(6): 1777-87.
- 54- Motro B, van der Kooy D, Rossant J, Reith A, Bernstein A. Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci. *Development.* 1991 Dec; 113(4): 1207-21.
- 55- Carson WE, Haldar S, Baiocchi RA, Croce CM, Caligiuri MA. The c-kit ligand suppresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Aug 2;91(16):7553-7.

- 56- Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, Lyman SD, Boswell HS, Donovan PJ. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature*. 1991 Aug 29; 352(6338): 809-11.
- 57- Yoshinaga K, Nishikawa S, Ogawa M, Hayashi S, Kunisada T, Fujimoto T, Nishikawa S. Role of c-kit in mouse spermatogenesis: identification of spermatogonia as a specific site of c-kit expression and function. *Development*. 1991 Oct; 113(2): 689-99.
- 58- Sandlow JI, Feng HL, Cohen MB, Sandra A. Expression of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue. *J Androl*. 1996 Jul-Aug; 17(4): 403-8.
- 59- Fujisawa M, Kanzaki M, Okuda Y, Okada H, Arakawa S, Kamidono S. Stem cell factor in human seminal plasma as a marker for spermatogenesis. *Urology*. 1998 Mar; 51(3): 460-3.
- 60- Marmar JL, Agarwal A, Prabakaran S, Agarwal R, Short RA, Benoff S, Thomas AJ Jr. Reassessing the value of varicocelectomy as a treatment for male subfertility with a new meta-analysis. *Fertil Steril*. 2007 Sep; 88(3): 639-48.
- 61- Cayan S, Erdemir F, Ozbey I, Turek PJ, Kadioğlu A, Tellaloğlu S. Can varicocelectomy significantly change the way couples use assisted reproductive technologies? *J Urol*. 2002 Apr; 167(4): 1749-52.
- 62- Tefekli A, Cayan S, Uluocak N, Poyanli A, Alp T, Kadioğlu A. Is selective internal spermatic venography necessary in detecting recurrent varicocele after surgical repair? *Eur Urol*. 2001 Oct; 40(4): 404-8.

- 63- Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril*. 2002 May; 77(5): 873-82.
- 64- Nagler HM, Luntz RK, Martinis FG. Varicocele. In: Lipshutz LI, Howard SS, eds. *Infertility in the Male*. 3rd ed. St Louis, Missouri: Mosby- Year Book, 1997: 336-339
- 65- Hopps CV, Lemer ML, Schlegel PN, Goldstein M. Intraoperative varicocele anatomy: a microscopic study of the inguinal versus subinguinal approach. *J Urol*. 2003 Dec; 170(6 Pt 1): 2366-70
- 66- Raman JD, Goldstein M. Intraoperative characterization of arterial vasculature in spermatic cord. *Urology*. 2004 Sep; 64(3): 561-4.
- 67- Kass EJ, Marcol B. Results of varicocele surgery in adolescents: a comparison of techniques. *J Urol*. 1992 Aug; 148(2 Pt 2): 694-6.
- 68- Matsuda T, Horii Y, Yoshida O. Should the testicular artery be preserved at varicoelectomy? *J Urol*. 1993 May; 149(5 Pt 2): 1357-60.
- 69- Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr* 1998; 18: 39–61.
- 70- Izgut-Uysal VN, Agac A, Derin N. Effect of L-carnitine on carrageen aninduced inflammation in aged rats. *Gerontology* 2003; 49: 287–292
- 71- Dokmeci D, Akpolat M, Aydogdu N, Doganay L, Turan FN. L-carnitine inhibits ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. *Pharmacol Rep* 2005; 57: 481–488.

- 72- Derin N, Agac A, Bayram Z, Asar M, Izgut-Uysal VN. Effects of Lcarnitine on neutrophil-mediated ischemia-reperfusion injury in rat stomach. *Cell Biochem Funct* 2005; Aug 30 (doi: 10.1027/cbf.1251).
- 73- Atila K, Coker A, Sagol O, et al. Protective effects of carnitine in an experimental ischemia-reperfusion injury. *Clin Nutr* 2002; 21: 309–313.
- 74- Ng CM, Blackman MR, Wang C, Swerdloff RS. The role of carnitine in the male reproductive system. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1033: 177–188.
- 75- Ruiz-Pesini E, Alvarez E, Enriquez JA, Lopez-Perez MJ. Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int J Androl* 2001; 24: 335–340.
- 76- Gurbuz B, Yalti S, Ficicioglu C, Zehir K. Relationship between semen quality and seminal plasma total carnitine in infertile men. *J Obstet Gynaecol* 2003; 23: 653–656.
- 77- Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *J Androl*. 1986 Jan-Feb; 7(1): 23-31.
- 78- Oktar T, Ahmedov İ, Kadioglu A. Varikosel teavisi: ‘Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi’ (Editörler: Kadioglu A, Çayan S, Semerci B ve ark.). Türk Androloji Derneği yayını, İstanbul, 2004; 463-472.
- 79- French DB, Desai NR, Agarwal A. Varicocele repair: does it still have a role in infertility treatment? *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2008 Jun; 20(3): 269-74.

- 80- Yamamoto M, Tsuji Y, Ohmura M, Hibi H, Miyake K. Comparison of artery-ligating and artery-preserving varicocelectomy: effect on post-operative spermatogenesis. *Andrologia*. 1995 Jan-Feb; 27(1): 37-40.
- 81- Huk J, Fryczkowski M, Bihun M, Połać R. Laparoscopic varicocele ligation. The comparative assessment of artery-ligating and artery-preserving varicocelectomy. *Wiad Lek*. 2001; 54(11-12): 621-31.
- 82- Okuyama A, Fujisue H, Matsui T, Doi Y, Takeyama M, Nakamura N, Namiki M, Fuijoka H, Matsuda M. Surgical repair of varicocele: effective treatment for subfertile men in a controlled study. *Eur Urol*. 1988; 14(4): 298-300.
- 83- Lee RK, Li PS, Goldstein M. Simultaneous vasectomy and varicocelectomy: indications and technique. *Urology*. 2007 Aug;70(2):362-5.
- 84- Zampieri N, Corroppo M, Zuin V, Cervellione RM, Ottolenghi A, Camoglio FS. Longitudinal study of semen quality in adolescents with varicocele: to treat or not? *Urology*. 2007 Nov; 70(5): 989-93.
- 85- Wu AK, Walsh TJ, Phonsombat S, Croughan MS, Turek PJ. Bilateral but not unilateral testicular hypotrophy predicts for severe impairment of semen quality in men with varicocele undergoing infertility evaluation. *Urology*. 2008 Jun; 71(6): 1114-8.
- 86- Zhao GQ, Deng K, Labosky PA, Liaw L, Hogan BL. The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev*. 1996 Jul 1; 10(13): 1657-69.

- 87- Tourtellotte WG, Nagarajan R, Auyeung A, Mueller C, Milbrandt J. Infertility associated with incomplete spermatogenic arrest and oligozoospermia in *Egr4*-deficient mice. *Development*. 1999 Nov; 126(22): 5061-71.
- 88- Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquillier D, LeMeur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in *CREM*-mutant mice. *Nature*. 1996 Mar 14; 380(6570): 159-62.
- 89- Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Mori C, Nakamura N, Poorman-Allen P, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of *Hsp70-2* results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 16; 93(8): 3264-8.
- 90- Barlow C, Hirotsune S, Paylor R, Liyanage M, Eckhaus M, Collins F, Shiloh Y, Crawley JN, Ried T, Tagle D, Wynshaw-Boris A. *Atm*-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*. 1996 Jul 12; 86(1): 159-71.
- 91- Russell ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet*. 1979; 20: 357-459.
- 92- Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. Human proto-oncogene *c-kit*: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J*. 1987 Nov; 6(11): 3341-51.
- 93- Qiu FH, Ray P, Brown K, Barker PE, Jhanwar S, Ruddle FH, Besmer P. Primary structure of *c-kit*: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--oncogenic activation of *v-kit* involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J*. 1988 Apr; 7(4): 1003-11.

- 94- Manova K, Bachvarova RF. Expression of c-kit encoded at the W locus of mice in developing embryonic germ cells and presumptive melanoblasts. *Dev Biol.* 1991 Aug; 146(2): 312-24.
- 95- Godin I, Deed R, Cooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie CC. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature.* 1991 Aug 29; 352(6338): 807-9
- 96- Sorrentino V, Giorgi M, Geremia R, Besmer P, Rossi P. Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells. *Oncogene.* 1991 Jan; 6(1): 149-51.
- 97- Schrans-Stassen BH, van de Kant HJ, de Rooij DG, van Pelt AM. Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology.* 1999 Dec; 140(12): 5894-900.
- 98- Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Ricca R, Geremia R. Follicle-stimulating hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in Mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Dev Biol.* 1993 Jan; 155(1): 68-74.
- 99- Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood.* 1997 Aug 15; 90(4): 1345-64.
- 100- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer,*1972; 26: 239-245.

101- Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM et al. In situ end-labeling of human testicular tissue demonstrates increased apoptosis in conditions of abnormal spermatogenesis. Fertil Steril 1997; 68: 1065-1069.

102- Baccetti B, Colledel G and Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated cells. J Submicrosc Cytol Pathol 1996; Abstract 28: 587-596.

103- Yılmaz I. Eriskin ratlarda deneysel varikosel olusturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi (ed). Taksim Eğitim ve Arastırma Hastanesi Üroloji A.D, uzmanlık tezi 2005; 45-49.