



1993

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**Üroloji Anabilim Dalı**

**DENEYSEL SOL VARİKOSEL SIÇAN MODELİNDE ANJİYOGENEZ**  
**İNHİBİTÖRÜ OLARAK SPİRONOLAKTONUN TESTİS ve İZOLE**  
**SOL VAZ DEFERENS DOKULARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Mustafa Gökhan KÖSE**

**Ankara, 2007**



1993

**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**

**Üroloji Anabilim Dalı**

**DENEYSEL SOL VARİKOSEL SIÇAN MODELİNDE ANJİYOGENEZ  
İNİHİTÖRÜ OLARAK SPİRONOLAKTONUN TESTİS ve İZOLE  
SOL VAZ DEFERENS DOKULARI ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Mustafa Gökhan KÖSE**

**Tez Danışmanları**

**Prof. Dr. Levent PEŞKİRCİOĞLU**

**Doç. Dr. Remzi ERDEM**

**Ankara, 2007**

## ÖZET

Varikoselin erkek üreme sistemi üzerinde morfolojik ve işlevsel bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir. Anjiyogenez mevcut damarlardan yeni damar oluşumunu ifade eder. Varikoselin anjiyogenezi uyardığı gösterilmiştir, ancak anjiyogenezin varikoseldeki etkisi net değildir. Bu çalışmada varikoselin sıçan testisindeki histopatolojik ve izole vaz deferens dokusundaki işlevsel etkileri, anjiyogenezin varikoseldeki fonksiyonu ve anjiyogenez inhibitörü olan spironolaktonun bu fonksiyonları ne derecede etkilediği araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan 24 adet erişkin *Wistar albino* sıçan, deneysel sol varikosel (DSV), varikosel ve spironolakton (V+S), *sham* ve kontrol grupları olmak üzere 4 eşit gruba ayrıldı. Varikosel sol renal venin parsiyel ligasyonu ile oluşturuldu. V+S grubundaki hayvanlara 20 mg/kg/gün dozunda spironolakton, DSV grubuna ise aynı dozda serum fizyolojik orogastrik gavaj yoluyla verildi. Kırk beş gün sonra tüm hayvanlar sakrifiye edildi. Sağ ve sol testislerdeki morfoloji ve germ hücre değişiklikleri hematoksilin - eozin; anjiyogenez CD 31 immünohistokimyasal boyamayla değerlendirildi. İzole organ banyosunda sol vaz deferens dokusundaki kolinerjik, adrenerjik ve serotonerjik kasılma ve gevşeme yanıtları incelendi. Spironolaktonun biyokimyasal etkilerini görmek için bazal ve işlem sonrasındaki serum sodyum, potasyum ve total testosteron değerleri çalışıldı.

Sol testiste DSV ve V+S grubunda spermatogenezde bozulma belirgindi (sırasıyla,  $p < 0.05$  ve  $p < 0.001$ ), sağ testiste ise gruplar arasında fark yoktu. DSV grubunda mikrodamar yoğunluğu ve anjiyogenez diğer gruplara göre daha fazlaydı. Spironolaktonun DSV grubundaki adrenerjik ve özellikle de serotonerjik yanıtları değiştirme eğiliminde olduğu izlendi. Hiçbir grupta asetilkoline anlamlı yanıt oluşmadı. Bazal ve işlem sonrasındaki sodyum ve total testosteron değerleri arasında fark izlenmedi.

Bu bulgulara göre, varikoselde artan anjiyogenezin koruyucu etkisi vardır ve spironolakton testiste anjiyogenezi inhibe ederek spermatogenezin daha da bozulmasına neden olmaktadır. Anjiyogenez ve varikosel arasındaki ilişkinin net olarak tanımlanabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar kelimeler:** varikosel, spironolakton, anjiyogenez, anjiyogenez inhibitörü, deneysel

## ABSTRACT

Varicocele causes morphological and functional dysfunction in male reproductive system. Angiogenesis is the formation of new vessels from an existing vasculature. It is shown that varicocele promotes angiogenesis, however it is not clear how varicocele is effected by angiogenesis. In this study, the morphological and functional effects of varicocele and inhibition of angiogenesis by spironolactone on the testicles and vas deferens were examined.

Twenty-four adult Wistar albino rats were randomized into 4 groups as experimental left varicocele (ELV); varicocele and spironolactone (V+S); sham and control. ELV was performed by partial ligation of left renal vein. Spironolactone and sterile saline, 20 mg/kg/day, were administered by orogastric gavage to V+S and ELV groups, respectively. After 45 days the rats were sacrificed. In testes, morphological changes and angiogenesis were checked by hematoxyline - eosine and CD 31 immunohistochemistry, respectively. Cholinergic, adrenergic and serotonergic tension and relaxation responses of vas deferens were investigated. Basal and the post-procedure serum values of sodium, potassium and total testosterone were measured.

Spermatogenesis in the left testes was disturbed in ELV and V+S groups ( $p < 0.05$  and  $p < 0.001$ , respectively). No such disturbance was observed in the right testes. Microvessel density and angiogenesis were more clear in ELV group. Spironolactone seemed to have a tendency to change adrenergic and especially the serotonergic responses in the ELV group. There were no cholinergic responses in the groups. Basal and the post-procedure serum sodium and total testosterone values did not change.

The findings suggest that angiogenesis increases in varicocele. The inhibition of angiogenesis by spironolactone in the rat testes has a negative effect on the spermatogenesis. Studies with long term results are required to explain the relationship between varicocele and angiogenesis.

**Key words:** varicocele, spironolactone, angiogenesis, angiogenesis inhibitor, experimental

# İÇİNDEKİLER

	<i>Sayfa</i>
Özet.....	<i>iii</i>
Summary.....	<i>iv</i>
İçindekiler.....	<i>v</i>
Kısaltmalar .....	<i>viii</i>
Şekiller Dizin.....	<i>ix</i>
Tablolar Dizini.....	<i>xiii</i>
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler .....	4
2.1 Tarihçe .....	4
2.2 Anatomi .....	7
2.2.1 Testis .....	7
2.2.2 Epididim .....	8
2.2.3 Vaz deferens .....	9
2.2.4 Spermatik kordon ( <i>Funiculus spermaticus</i> ) .....	9
2.3 Testisin Histolojik Yapısı .....	10
2.4 Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı .....	12
2.5 Varikosel Etiyolojisi .....	13
2.6 Varikosel Patofizyolojisi .....	15
2.6.1 Testiküler Kan Akımı ve Venöz Basınç Değişiklikleri .....	16
2.6.2 Oksidatif Stres .....	16
2.6.3 Hipertermi.....	17
2.6.4 İnterstisyel Sıvı Formasyonu ve Nutrisyonel Değişiklikler .....	18
2.6.5 Renal ve/veya Adrenal Metabolitlerin Reflüsü .....	18
2.6.6 Hormonal Disfonksiyon .....	19
2.6.7 Akrozom Reaksiyonu .....	20
2.6.8 Otoimmünite.....	20
2.6.9 Apoptozis.....	20
2.7 Varikoseldeki Histolojik Değişiklikler .....	21
2.8 Varikosel Tanısı.....	21
2.8.1 Fizik Muayene .....	21

2.8.2	Skrotal Ultrasonografi .....	23
2.8.3	Renkli Doppler Ultrasonografi .....	23
2.9	Varikoselde Tedavi Endikasyonları .....	24
2.10	Varikosel Tedavisi.....	25
2.11	Adölesan Varikosel: Tanı ve Tedavi .....	27
2.12	Anjiyogenez.....	28
2.12.1	Anjiyogenezin Tipleri.....	28
2.12.2	Anjiyogenik Büyüme Faktörleri.....	29
2.12.3	Anjiyogenez İnhibitörleri .....	31
3.	Gereç ve Yöntem.....	33
3.1	Deney Hayvanları .....	33
3.2	Anestezi.....	34
3.3	DeneySEL Sol Varikosel Modeli Oluşturulması .....	34
3.4	Sham Grubunda Yapılan İşlemler .....	37
3.5	Cerrahi Sonrası Uygulanan İşlemler.....	37
3.6	Sakrifikasyon .....	38
3.7	İzole Organ Banyosu .....	40
3.7.1	<i>In-vitro</i> Deneylerde Uygulanan Test Maddeleri .....	41
3.8	Deneyler.....	42
3.8.1	İzometrik Gerim Değişikliği Deneyleri.....	42
3.8.2	Kolinerjik ve Serotonerjik Yanıtlar .....	42
3.9	Biyokimyasal Değerlendirme .....	43
3.10	Histopatolojik İnceleme.....	43
3.10.1	Testis ve Germ Hücre Patolojilerinin Değerlendirilmesi .....	44
3.10.2	Anjiyogenezin Değerlendirilmesi.....	44
3.11	İstatistiksel Analiz .....	45
4.	Bulgular .....	47
4.1	Histopatolojik Değerlendirme .....	47
4.1.1	Testis ve Germ Hücre Patolojileri .....	47
4.1.2	Anjiyogenez.....	50
4.1.3	İmmünohistokimyasal Boyamalar .....	51
4.2	İzole Organ Banyosu Deneyleri.....	52
4.2.1	Fenilefrin Yanıtları .....	52

4.2.2	Asetilkolin Konsantrasyon- Yanıtları.....	54
4.2.3	Serotonin Konsantrasyon- Yanıtları.....	54
4.3	Biyokimyasal Değerlendirme .....	57
4.3.1	Serum Na <sup>+</sup> Değerleri .....	57
4.3.2	Serum K <sup>+</sup> Değerleri .....	57
4.3.3	Serum Total Testosteron Değerleri.....	58
5.	Tartışma.....	60
6.	Sonuç ve neriler .....	68
7.	Kaynaklar .....	69

## KISALTMALAR

- 5-HT:** 5- hidroksitriptamin (serotonin)  
**ABP:** Androjen bağlayıcı protein  
**ACh:** Asetilkolin  
**ASA:** Antisperm antikor  
**cm:** Santimetre  
**°C:** Derece Celcius (santigrad)  
**DII 4:** Delta benzeri ligand 4  
**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü  
**DSV:** Deneysel sol varikozel  
**ELV:** *Experimental left varicocele*  
**eNOS:** *Endothelial nitric oxide synthase* (Endotelial nitrik oksit sentaz)  
**FE:** Fenilefrin  
**FGF-2:** *Fibroblast growth factor -2* (Fibroblast büyüme faktörü- 2)  
**FGF-b:** *Fibroblast growth factor -beta* (Fibroblast büyüme faktörü- beta)  
**FSH:** Follikül stimüle edici hormon  
**GnRH:** *Gonadotrophine releasing hormone* (Gonadotropin salıverdirici hormon)  
**HE:** Hematoksilen – eozin  
**HHT:** Hipotalamus-hipofiz-testis  
**HIF-1 $\alpha$ :** *Hypoxia inducible factor 1 $\alpha$*  (Hipoksi ile indüklenen faktör 1 $\alpha$ )  
**HSP:** *Heat shock protein* (Isı şok proteini)  
**ISE:** *Ion selective electrode* (İyon selektif elektrot)  
**i.p.:** İntraperitoneal  
**K:** Potasyum  
**KET:** Ketanserin  
**kg:** Kilogram  
**LH:** Luteinleştirici hormon  
**M:** Molar  
**MDY:** Mikrodamar yoğunluğu  
**mg:** Miligram  
**ml:** Mililitre  
**mm:** Milimetre  
**mmol:** Milimol



**MMP:** *Matrix metalloproteinase* (Matriks metalloproteinaz)  
**ng:** Nanogram  
**NO:** Nitrik oksit  
**NOS:** Nitrik oksit sentaz  
**PBS:** *Phosphate buffer saline*  
**pO<sub>2</sub>:** Parsiyel oksijen basıncı  
**PZ:** Prazosin  
**RIA:** *Radioimmune assay*  
**SF:** Serum fizyolojik (%0.9'luk sodyum klorür çözeltisi)  
**sn:** Saniye  
**SOR:** Serbest oksijen radikalleri  
**SPL:** Spironolakton  
**TT:** Total testosteron  
**USG:** Ultrasonografi  
**V+S:** Varikozel+spironolakton  
**VEGF:** *Vascular endothelial growth factor* (Vasküler endotelyal büyüme faktörü)  
**VEGFR-2:** *Vascular endothelial growth factor receptor-2*  
(Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü-2)  
**yy:** Yüz yıl  
**µl:** Mikrolitre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: <i>Aulus Cornelius Celsus</i> .....	4
Şekil 2.2: <i>Hartmann</i> 'ın radikal skrotal eksizyon yöntemi.....	5
Şekil 2.3: <i>Narath</i> 'ın varikoselektomi yöntemi .....	6
Şekil 2.4: Şerefeddin Sabuncuoğlu.....	6
Şekil 2.5: Erkek üreme sistemi.....	7
Şekil 2.6: Testiküler arter ve venlerin anatomisi.....	8
Şekil 2.7: Epididimin anatomisi .....	9
Şekil 2.8: Testisin histolojik yapısı.....	10
Şekil 2.9: Testisin germinal epiteli.....	11
Şekil 2.10: Leydig hücresi .....	12
Şekil 2.11: Varikoselde kapakçık sistemine bağlı olarak gelişen geri akım mekanizması.....	14
Şekil 2.12: Sol varikoseli olan bir hastanın venogramı.....	15
Şekil 2.13: Solda <i>grade 3</i> varikosel.....	22
Şekil 2.14: Spironolaktonun kimyasal yapısı .....	32
Şekil 3.1: Barsakların sağ tarafa deviye edilmesinden sonra sol renal venin ve sol spermatik venin açığa çıkarılması .....	35
Şekil 3.2: Sol renal venin çevre yağ ve bağ dokularından izole edilmesinden sonra altından oluşturulan tünelden sol sürrenal ven ve sol internal spermatik ven lateralde kalacak şekilde 4/0 ipek bağlamanın geçirilmesi .....	36
Şekil 3.3: Sol renal ven üzerine yerleştirilen 0.85 mm çaplı künt bir kılavuz tel üzerinden daha önce geçirilen sütürün bağlanması .....	36
Şekil 3.4: Sütür bağlandıktan sonra dilate olan sol spermatik ven ve renal ven .....	37
Şekil 3.5: Sakrifikasyondan hemen önce sağ ve sol testislerin boyutları.....	38
Şekil 3.6: Pampiniform pleksusta dilatasyon .....	39
Şekil 3.7: Dilate sol spermatik venin sol renal vene drene oluşu.....	39
Şekil 3.8: Sol vaz deferensin izole organ banyosu için <i>en bloc</i> ayrılması.....	40
Şekil 3.9: Solda izole organ banyosu sistemi ve sağda izole organ banyosunda vaz deferens doku örneği.....	41
Şekil 4.1: Sıçanlarda uygulamalardan sonra izole edilen sol ve sağ testis dokularında kalitatif olarak değerlendirilen mikst atrofi .....	47

Şekil 4.2: Sıçan sol testislerinde spermatogenezde değişik derecelerde bozulmalar ve seminifer tübül yapılarının ışık mikroskopisi bulguları .....	48
Şekil 4.3: Sıçan sol testisinde seminifer tübüllerde yaygın kalsifikasyon alanlarının ışık mikroskopisi görüntüsü (DSV grubu) .....	49
Şekil 4.4: Sıçanlarda uygulamalardan sonra izole edilen sol ve sağ testis dokularında kalitatif olarak değerlendirilen ödem.....	49
Şekil 4.5: Sıçanlarda uygulamalardan sonra izole edilen sol ve sağ testis dokularında kalitatif olarak değerlendirilen konjesyon .....	50
Şekil 4.6: Sıçanlarda uygulamalardan sonra izole edilen sol ve sağ testis dokularında kalitatif olarak değerlendirilen MDY .....	50
Şekil 4.7: Sıçan sol testislerinde mikrodamar yoğunluklarının ışık mikroskopisi bulguları.....	51
Şekil 4.8: Sıçan sol testislerinde, ışık mikroskopisi altında, CD31 ile immünohistokimyasal olarak anjiogenezin gösterilmesi.....	52
Şekil 4.9: Deney gruplarında sıçan izole vas deferens dokusunda fenilefrinle oluşan konsantrasyona bağımlı izometrik kasılmaların $\alpha_1$ adrenoseptör antagonisti prazosin ile inhibisyonu.....	52
Şekil 4.10: Kontrol, sham, varikozel ve varikozel + spironolakton gruplarında sıçan izole vas deferens dokusunda fenilefrinle oluşan konsantrasyona bağımlı izometrik kasılmaların $\alpha_1$ adrenoseptör antagonisti prazosin ile inhibisyonu .....	53
Şekil 4.11: Sıçan izole vaz deferens dokusunda ACh konsantrasyon-cevab eğrileri.....	54
Şekil 4.12: Deney gruplarında sıçan izole vas deferens dokusunda serotoninle oluşan konsantrasyona bağımlı izometrik kasılmaların 5-HT <sub>2a</sub> ve $\alpha_1$ adrenoseptör antagonisti ketanserin ile inhibisyonu.....	55
Şekil 4.13: Kontrol, sham, varikozel ve varikozel + spironolakton gruplarında; sıçan izole vaz deferens dokusunda serotoninle oluşan konsantrasyona bağımlı izometrik kasılmaların 5-HT <sub>2a</sub> ve $\alpha_1$ adrenoseptör antagonisti ketanserin ile inhibisyonu .....	56
Şekil 4.14: Sıçanlarda bazal ve uygulamalardan sonra ölçülen serum Na <sup>+</sup> düzeyleri .....	57
Şekil 4.15: Sıçanlarda bazal serum K <sup>+</sup> düzeyleri.....	57

Şekil 4.16: Sıçanlarda uygulamalardan sonra serum K <sup>+</sup> düzeyleri.....	58
Şekil 4.17: Kontrol ve varikozel + spironolakton gruplarında bazal ve uygulama sonrası serum K <sup>+</sup> düzeyleri .....	58
Şekil 4.18: Sıçanlarda bazal (A) ve uygulamalardan sonra (B) ölçülen serum TT düzeyleri.....	59

## TABLolar DİZİNİ

*Sayfa*

Tablo 2.1: Varikozel tedavisinden daha çok fayda görebilecek hastaların özellikleri..	24
Tablo 2.2: Varikozelde tedavi seçenekleri.....	26
Tablo 2.3: Çocukluk çağı ve adolesan varikozelde tedavi endikasyonları .....	27
Tablo 2.4: Anjiyogenezini uyaran büyüme faktörleri .....	30

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Varikosel, testisleri drene eden pampiniform pleksusu oluşturan spermatik venlerin elonge, dilate ve tortuöz hal alması ve venöz dolaşımda ters akım (reflü) meydana gelmesi olarak tanımlanır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 9,043 hastada yaptığı çalışmanın verilerine göre varikosel insidansının anormal semen parametrelerine sahip olan erkeklerde %25.4, normal semen parametrelerine sahip erkeklerde ise %11.7 olduğu bildirilmiştir (1). Varikosellerin %80'den fazlası infertilite ile ilişkili değildir (2). Buna rağmen primer infertilite nedeniyle kliniklere başvuran erkeklerde varikosel insidansı %35-40 oranındadır ve bu oran sekonder infertil olgularda %69-81'e kadar ulaşmaktadır (3, 4).

Erkek infertilitesinin etyopatogenezinde en sık rastlanan ve en kolay düzeltilebilir nedenlerden biri olan varikosel klinik olarak %75-95 olguda solda görülür. İzole sağ varikosel insidansı sağlıklı ve infertil erkeklerde oldukça düşüktür (%2) ve sıklıkla spermatik ven ya da vena kava üzerindeki patolojik bir kompresyona sekonderdir. Bilateral varikosel, infertil erkeklerde özellikle *Doppler* ultrasonografinin kullanılmaya başlamasıyla %50'lere varan oranlarda saptanmaktadır (5).

Yüzyıllar önce tanımlanmış olmasına rağmen varikoselin ne etiyolojisi, ne de patofizyolojisi günümüzde net olarak anlaşılamamıştır. Varikosel nedenleri arasında en çok kabul görmüş teoriler; sağ ve sol testiküler venler arasındaki anatomik farklılıklar, kompetan venöz valvlerin yokluğuna bağlı olarak gelişen venöz kanın reflüsü ve findikkıran (*nutcracker*) fenomeni olarak da bilinen sol renal venin aorta ve superior mezenterik arter arasında kompresyonuna bağlı olarak testiküler venin kısmi obstrüksiyonudur (6).

Varikosel patofizyolojisinde savunulan hipotezler ise hipertermi, testis kan akımı değişiklikleri, renal veya adrenal ürünlerin reflüsü, hormonal disfonksiyon, otoimmünite, akrozom reaksiyon defekti, apoptozis ve oksidatif stres (7-13). Bu hipotezlerin büyük bir kısmı hayvan çalışmaları sonrasında elde edilen sonuçlar üzerine kurulmuştur. Testiküler vasküler yapının insandakine benzemesinden ve damarsal yapılarının fazla varyasyon göstermemesinden dolayı sıçanlar bu çalışmalarda en çok tercih edilen deney

hayvanlarıdır. Ayrıca varikosel etkisinin insanlarda oluşturulmasının getireceği etik sorunlar da varikoselde hayvan deneylerinin gerekliliğini artırmaktadır.

Günümüzde varikoselin tek tedavisi cerrahi olmakla beraber, her varikoselli olguda sperm parametreleri bozulmamakta ve her olguda cerrahi onarım gerekmemektedir. Varikoselin oluşmasını engelleyecek ya da cerrahi tedavi yerine kullanılacak -seçilmiş bazı olgulardaki semptomatik tedavi dışında- medikal tedavi bulunmamaktadır.

Varikoselli her erkekte sperm parametrelerinde bozulma izlenmemektedir. Bunun nedeni net olarak ortaya konamamıştır. Ancak varikoselin testiste histopatolojik değişikliklere ve vaz deferens gibi dokularda nörotransmitter salıverilmesinde değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (1, 14). Bu durum varikoselin sadece testiste değil, ayrıca sperm transportu ve matürasyonu gibi fonksiyonlarda da bozulmalara neden olduğunu düşündürmektedir.

Anjiyogenez, var olan damarlardan yeni damar oluşumunu ifade eder. *Menstruasyon* ve yara iyileşmesi gibi pek çok fizyolojik olayda rol aldığı gibi, tümör gelişimi ve inflamasyon gibi patolojik durumlarda da kritik öneme sahiptir (15). *In vitro* çalışmalar vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)'nin anjiyogenezin kuvvetli bir uyarıcı olduğunu göstermiştir (16, 17).

VEGF, endotel hücreleri üzerinde bulunan VEGF reseptörü-2 (VEGFR-2)'ye bağlanarak bir tirozin kinaz sinyal akışı başlatır ve bu olay endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve nitrik oksit (NO) gibi, damar geçirgenliğini değişik derecelerde düzenleyen faktörlerin açığa çıkmasına, çoğalmasına, migrasyonuna ve nihayetinde yeni damar oluşumuna neden olur.

Varikoselde anjiyogenezin ve VEGF ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir ve bu durum varikoselin testis dokusunda hipoksiyi artırıcı etkisine bağlanmıştır (18). Yine de varikoselde anjiyogenezin rolü net değildir. Anjiyogenez toksik metabolitlerin testiküler dokuda dağılmasına neden oluyorsa, anjiyogenezin inhibisyonu ile sperm parametrelerinin düzelmesi beklenir. Tam tersine, anjiyogenez hipoksiye karşı bir savunma mekanizması olarak testisi koruyorsa bu inhibisyon sperm parametrelerini daha da bozacaktır.

Spirolakton (SPL), bir mineralokortikoid hormon olan aldosteronun kompetitif antagonistidir. Potasyum tutucu diüretik olarak oral yoldan kullanılabilen bir ilaçtır. Son yıllarda, diüretik etkisinden bağımsız olarak SPL'nin anjiyogenezi inhibe ettiği ve bu etkisinin VEGF tarafından engellenemediği gösterilmiştir (19).

Varikosel, morfolojik ve işlevsel bozukluklara neden olabilmektedir. Morfolojik etkileri en çok testisler üzerinde olmaktadır. Üreme sistemi üzerindeki işlevsel bozuklukları sperm olgunlaşma veya iletim yolları üzerindeki etkilerine bağlı olabilir. Vaz deferens kontraktıl yapısı olan bir organdır ve vaz deferenste adrenerjik cevapların kuvvetli olduğu bilinmektedir. İzole vaz deferens dokusunda nöroefektör ve farmakoloji modelleri kolaylıkla çalışılabilir (20). Bu özelliği ile vaz deferens varikoselin işlevsel özelliklerinin gösterilebilmesi açısından ideal bir organdır (21).

Bu çalışmanın amacı varikoselin sıçan testisindeki histopatolojik ve izole vaz deferens dokusundaki işlevsel etkilerini, anjiyogenezin varikoseldeki fonksiyonunu ve anjiyogenez inhibitörü olan SPL'un bu fonksiyonları ne derecede etkilediğini araştırmaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Tarihçe

Milattan sonra 1'inci yüzyılda (yy) Yunanlı bir hekim olan *Cornelius Celcus* (Şekil 2.1), varikosel ve cerrahi tedavisini açıklayan ilk ayrıntılı raporu yayımlamıştır (22). *Celsus*'a göre varikosel skrotum cildinin damarlarının zararsız dilatasyonu ve kıvrımlaşmasını, günümüz varikosel tabirine uyan *cirsocele* ise ağrı ve testiste atrofiye neden olan hastalığı ifade etmekteydi. *Celsus* yalnızca varikosel ve testis atrofisi arasındaki ilişkiyi ortaya koymamış, ayrıca varikoselin cerrahisini de tanımlamıştır. Buna göre genişlemiş damar izole ediliyor, bağlanıyor ve rezeke ediliyordu.



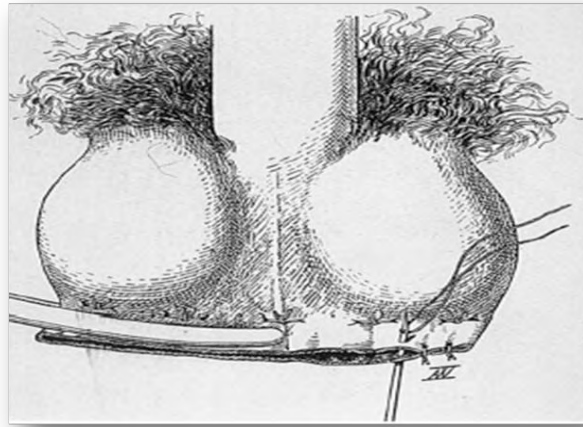
Şekil 2.1: Aulus Cornelius Celsus.

On yedinci yy sonlarına doğru *Dionis* varikosel ve *cirsocele*'i ayrı iki olgu olarak tanımlamış, varikoseli skrotum ya da tunika dartostaki üzüm salkımı şeklinde olan ve gözle görülebilen, *cirsocele*'i ise spermatik kordun solucan şeklinde görünüm almasına neden

olan ve palpasyonla tanı konabilecek bir hastalık olarak nitelemiştir. Yine de bu tabir günümüzdeki varikozel tanımını net olarak karşılamamaktadır.

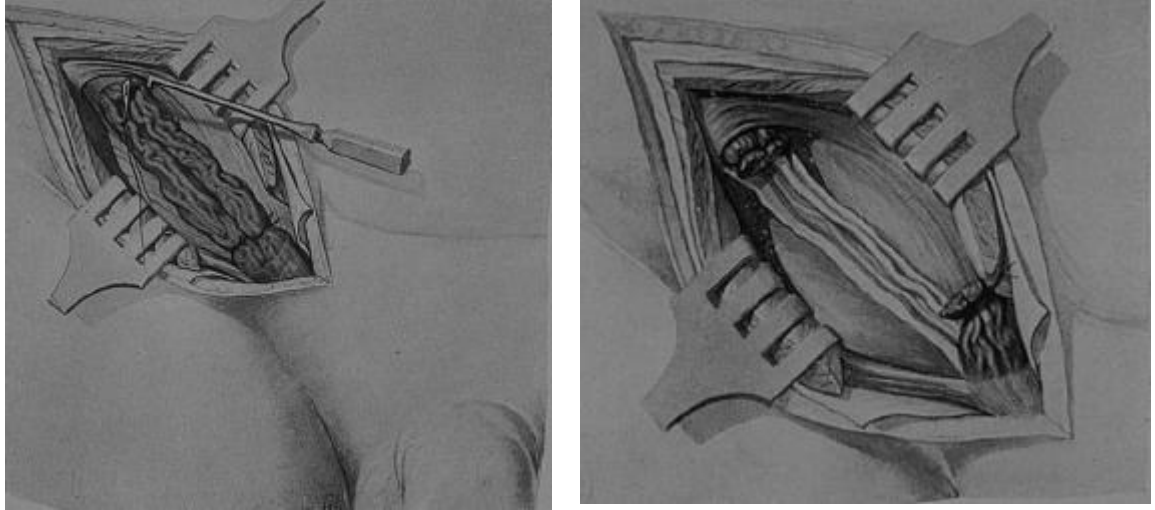
Varikozel tarihçesinde belki de en trajik olay 1832 yılında ünlü Fransız cerrah *J. Delpech*'in bilateral varikozel onarımı sonrasında bilateral testis atrofisi gelişen bir hastası tarafından öldürülmesidir (22). Bu olay cerrahların varikozel onarımında daha titiz, belki de daha endişeli davranmalarına neden olmuştur.

İlk kez İngiliz cerrah *T. B. Curling* 1843'te *cirsocele* tanımını devre dışı bırakarak varikozel terimini "pampiniform pleksus içindeki testiküler venlerin anormal dilatasyonu" şeklinde ifade etmiştir. Böylece skrotum cildindeki damarların dilatasyonu tanımlama dışında bırakılmış ve varikozel günümüzdeki tanımına kavuşmuştur. *Cooper*, varikozel cerrahisinde parsiyel skrotum eksizyonunu önermiş, *H. Hartmann*, 1900'lü yılların başında *Cooper*'ın tekniğini geliştirerek daha radikal bir cerrahi olan transvers skrotum eksizyonunu kullanmıştır. Bu yöntemle hem venöz pakeler daha rahat eksize ediliyor, hem de testislere doğal bir süspansiyon sağlanıyordu (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Hartmann'ın radikal skrotal eksizyon yöntemi

*Narath* (1864-1924), varikozel cerrahisinde intrainguinal rezeksiyonu uygulamıştır (Şekil 2.3). *Narath*'dan sonra 1918'de *O. Ivanissevich* ve *H. Gregorini* inguinal; 1942'de *Bernardi* supravajinal; ve 1949'da da *A. Palomo* yüksek ligasyon yöntemini tanımlamışlardır ve bu yöntemler geniş çapta kabul görmüştür (23).



**Şekil 2.3:** Narath'ın varikoselektomi yöntemi

Türklerde ise varikosel, Osmanlı İmparatorluğu döneminde yaşamış olan Şerefeddin Sabuncuoğlu tarafından *Cerrahiyyetü'l Hayniye* adlı kitabında “*devali*” olarak adlandırılmış ve “Devali, testis damarlarının bükülüp üzüm salkımına benzer şekilde olması ve bu nedenle testisin aşağıya doğru sarkmasıdır” diye açıklanmıştır (Şekil 2.4) (24).



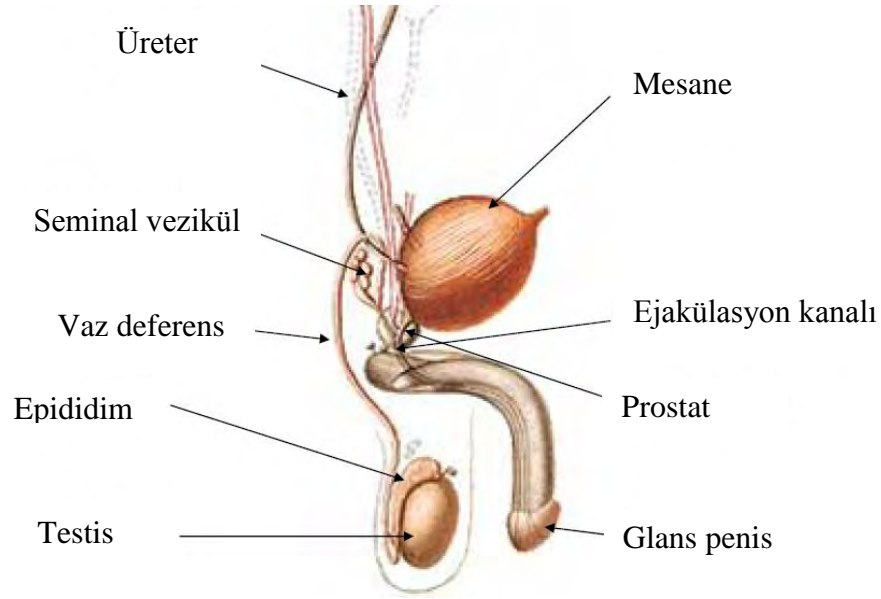
**Şekil 2.4:** Şerefeddin Sabuncuoğlu

Sabuncuoğlu, günümüzdeki toksik metabolitlerin reflüsü hipotezinden pek de farklı olmayan bir ifadeyle hastalığın nedeninin kirli kan olduğunu belirtmiştir. Varikoselektomi için yüksek skrotal bir insizyon uygulamış, venleri tanımladıktan sonra vaz deferensten ayırarak yoğun olarak buldukları yerde izole etmiştir. Kalın bir iğne ve ipek iplikler

yardımla altından ve üstünden tamamen bağladıktan sonra venleri her iki ipin arasından kesmiştir.

## 2.2 Anatomi

Erkek genital organları testis, epididim, vaz (duktus) deferens, prostat, seminal vezikül, skrotum ve penisten oluşmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Erkek üreme sistemi.

### 2.2.1 Testis

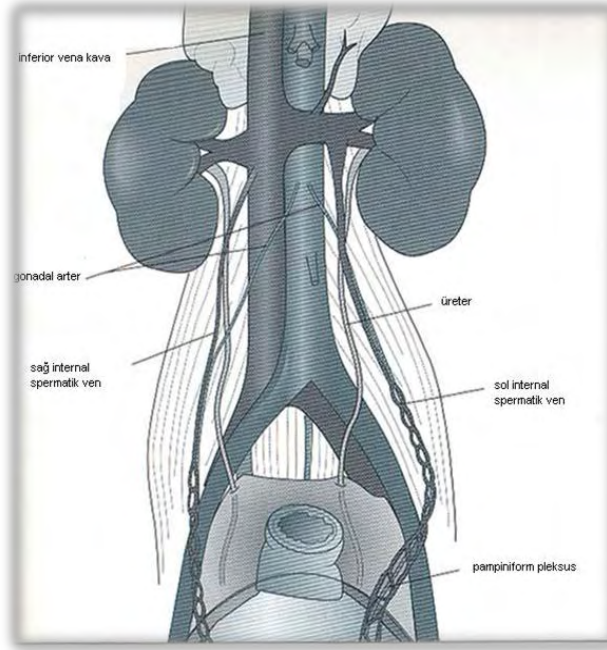
Spermatik kord tarafından skrotum içinde asılı tutulan her bir testis, ortalama 15-25 mililitre (ml) hacminde ve 4x3x2.5 santimetre (cm) boyutundadır. Dıştan içe doğru tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza ile sarılıdır.

Testisin ana arteri abdominal aortadan çıkan testiküler arterdir. Hipogastrik arterin dalları olan deferensiyel ve kremasterik arterler de testis kanlanmasına katkı sağlarlar. Testiküler arterde farklı sayıda dallanmalar olabilir.

Testisin venöz drenajı arteriyel sistemle benzerlik göstermez. Küçük venlerin döküldüğü *rete testis* bölgesindeki venler deferensiyel venlerle birleşerek *plexus pampiniformis*'i

oluştururlar. Bu pleksus ve arterin kollateralleri arasında yakın ilişki vardır, bunun sıcaklık değişim mekanizmasında etkili olduğu düşünülmektedir (25). Sol testiküler ven böbrek alt kutbuna yakın mesafede genellikle adrenal venin lateralinden sol renal vene dik açı ile girmektedir. Sağ testiküler ven ikinci lomber vertebra seviyesinde renal venin altından vena kavanın anterolateral yüzeyine oblik olarak dökülür. Yaklaşık %10 olguda sağ testiküler ven sağ renal vene dökülür (Şekil 2.6) (26).

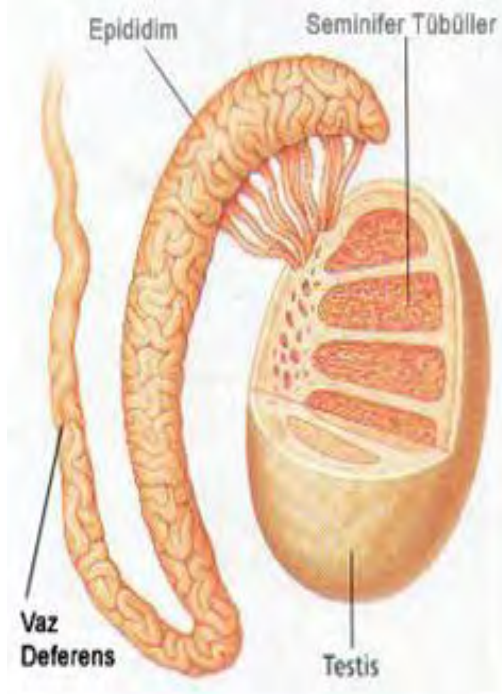
Testisin lenfatik damarları yüzeysel ve derin olmak üzere ikiye ayrılır. Yüzeysel lenfatikler tunika vajinalisin altında, derin lenfatikler ise parankim içinde ve epididimde seyreder. Bu lenfatikler spermatik kord içinde seyreder ve aorta çevresindeki lenf nodlarına dökülürler. Testis içinde lenfatik drenaj sadece intertübüler bölgeden olmaktadır. Seminifer tübüller içinde lenfatik akım yoktur (27).



Şekil 2.6: Testiküler arter ve venlerin anatomisi.

### 2.2.2 Epididim

Sperm iletilmesi, depolanması ve matürasyonunda rol oynayan epididim, testisin arka dış tarafında testis superiorundan inferioruna doğru uzanır. Ortalama uzunluğu 5-6 metre kadardır; baş, gövde ve kuyruk olmak üzere 3 bölüme ayrılır (Şekil 2.7). Epididimin baş kısmı testisin üst kutup arka kısmına sıkıca yapışmıştır ve *globus major* olarak adlandırılır. Gövde kısmına doğru çap artar ve daha sonra sabit kalarak vaz deferense kadar uzanır. Kuyruk kısmı ise *globus minor* olarak adlandırılır.



Şekil 2.7. Epididimin anatomisi.

### 2.2.3 Vaz Deferens

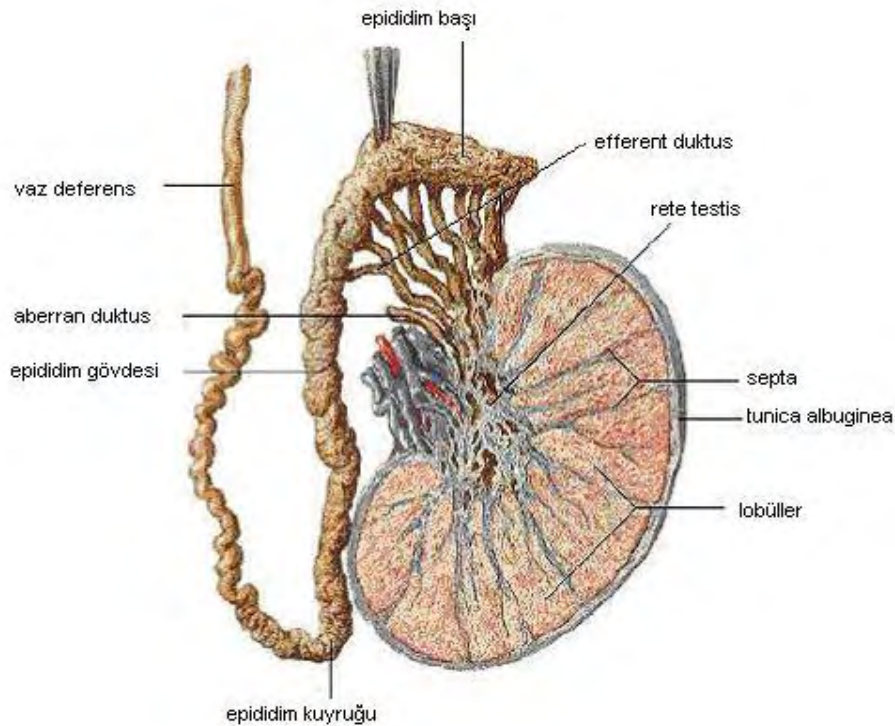
Vaz deferens sperm iletim yolunda epididimden sonraki kısmı oluşturur. Anatomik olarak epididimal, skrotal, inguinal, retroperitoneal kısım ve ampulla olarak 5 bölüme ayrılır. Ampulla, vaz deferensin en geniş kısmıdır. Alt tarafında daralarak seminal vezikülün kanalı olan *ductus excretorius* ile birleşir ve *ductus ejaculatorius* olarak prostatik üretrada *veru montanum* üzerine açılır. Vaz deferensin temel görevleri spermatozoanın taşınması, absorpsiyon ve sekresyondur.

### 2.2.4 Spermatik Kordon (*Funiculus Spermaticus*)

Spermatik kordon, inguinal kanal iç hizasından başlar ve içerisinde vaz deferens, testiküler arter, deferensiyal arter, kremasterik arter, plexus pampiniformis, genitofemoral sinirin genital dalı, sempatik ve parasempatik sinir lifleri, lenf damarları ve prosesus vajinalisin fibröz kalıntısı yer alır.

### 2.3 Testisin Histolojik Yapısı

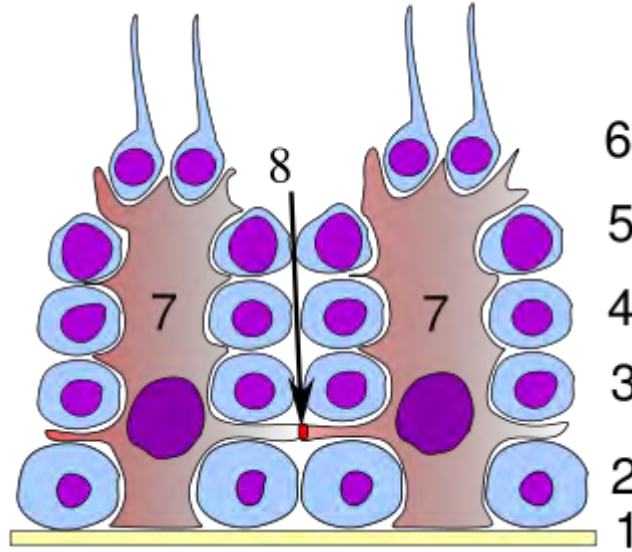
Testisler sperm üretimi yanında hormonal salgılar (testosteron, inhibin, vb) da ürettiklerinden bileşik, tübüler, holokrin, iç ve dış salgı bezleridirler. Testisi dışarıdan saran kapsül *tunica albuginea* olarak adlandırılır. Bu yapı testisin her bölgesinde devamlılık göstermez, üst yüzünde kesintiye uğrar ve bu bölge *mediastinum testis* ve epididimin yerleştiği bölgedir. Mediastinum içerisinde testisi lobüllere ayıran interstisyum elemanları yer alır (Şekil 2.8). Bu lobüllerden her biri 1-4 adet seminifer tübül içermektedir. Seminifer tübüllerin ağırlığı testis ağırlığının %60-70'i kadardır. Seminifer tübüller peritübüler doku vasıtasıyla interstisyel dokudan ayrılmıştır ve damarsız yapılardır. Seminifer tübül içerisindeki germinal epitelin beslenmesi peritübüler dokunun geçirgenliği oranında perfüzyon yoluyla olmaktadır. Peritübüler dokunun fibröz ve hyalin kalınlaşmalar göstermesi sonucu ara dokulardan tübül içerisine madde geçişi bozulduğunda germinal hücrelerin beslenmesi dolayısıyla da üreme fonksiyonları bozulmaktadır.



Şekil 2.8: Testisin histolojik yapısı.

Seminifer tübül içerisinde bir bazal membranla sınırlanmış ve bazaldan lümeneye doğru dizilmiş bir sıra epitel hücresi bulunmaktadır. Germinal epitel olarak adlandırılan bu yapı içerisinde destek hücreleri şeklinde Sertoli hücreleri ve farklı bölünme ve olgunlaşma süreçleri içerisindeki germinal (spermatogenik) hücreler bulunur.

Sertoli hücreleri, seminifer tübül içerisindeki somatik hücrelerdir. Erişkin bir erkekte seminifer tübülün enine kesitinde yaklaşık 10 adet Sertoli hücresi bulunur ve bunların bölünme yetenekleri çok sınırlıdır. Bu hücreler tübüller boyunca birbirleriyle sıkı bağlantı noktaları (*gap junction*) kurarak seminifer tübülün germinal epitelini bazal kompartman ve *adluminal* kompartman olarak iki bölüme ayırırlar. Bazal kompartmanda spermatogonyum ve preleptoten spermatositler, *adluminal* kompartmanda spermatositler ve spermatidler bulunur (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9:** Testisin germinal epitelini.

1. Bazal lamina
2. Spermatogonya
3. Spermatosit, primer
4. Spermatosit, sekonder
5. Spermatid
6. Matür spermatid
7. Sertoli hücresi
8. Sıkı bağlantı

Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar kan-testis bariyerini oluşturur. Mayoz bölünmedeki germ hücrelerinin beslenmesi Sertoli hücreleri tarafından sağlanır. Bunun yanında Sertoli hücrelerinin fagositoz, steroid biyosentezi, endokrin fonksiyon (inhibin ve az miktarda androjen salgılanması, follikül stimüle edici hormon (FSH) salgılanmasının kontrolü) ve germ hücrelerinin lümene doğru pasif hareketlerinin sağlanması gibi görevleri de vardır.

Germinal hücreler spermatogonyum, spermatosit, spermatid ve spermatozoonlardır. A tipi spermatogonyumlar kök hücreleri, B tipi spermatogonyumlar ise *progenitor* hücreleri



içerirler. B tipi spermatogonyumların son mitotik bölünmelerinden sonra primer spermatositler oluşur, bunlar da mayoz bölünmeyle sekonder spermatositlere dönüşürler. Sekonder spermatositler ikinci bir mayoz bölünme geçirerek spermatidleri oluştururlar. Spermatidler bölünmezler ancak bir seri değişikliklere uğrayarak spermatozoonları oluştururlar. Sekonder spermatositten spermatozoona kadar olan evreye spermiyogenez, ilkel spermatogonyumdan ileri derecede özelleşmiş spermatozoona kadar geçen sürece ise spermatogenez denir ve bu süre insanlarda yaklaşık olarak 64-73 gündür.

Leydig hücreleri interstisyumda yer alırlar, testosteronun üretiminden ve salgılanmasından sorumludurlar (Şekil 2.10). Erişkin Leydig hücrelerinin bölünme yeteneği yoktur. Bu hücreler testis hacminin %12'sini oluşturur. Puberteyle birlikte hipofizden salınan lüteinleştirici hormon (LH), Leydig hücresi üzerindeki reseptörlerine bağlanarak testosteron salgılanmasını sağlar (28).



**Şekil 2.10:** Leydig hücresi (siyah oklar).

#### **2.4 Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı**

Hipotalamus-hipofiz-testis (HHT) aksı, spermatogenez ve testisin endokrin fonksiyonu (testosteron üretimi, vb) açısından önemlidir.

Hipotalamus, beyin tabanında bulunur ve hipofizin endokrin fonksiyonlarını düzenler. Hipotalamustan salgılanan ve hipofiz fonksiyonlarını düzenleyen en önemli HHT aksı hormonu, gonadotropin salıverdirici hormon (GnRH)'dur. GnRH salgılanması stres,

egzersiz, diyet gibi ekzojen; opioidler, katekolaminler, prostaglandinler ve testiküler steroidler gibi endojen faktörler tarafından regüle edilir.

Portal yolla hipotalamusa bağlı olan hipofizden GnRH etkisiyle FSH ve LH'nın sentez ve salgılanması düzenlenir. FSH ve LH glikoprotein yapılı hormonlardır ve alfa ve beta zincirlerinden oluşurlar. Alfa zinciri her iki hormonda da aynı özellikleri taşıırken, beta zinciri fonksiyonel özelliği belirler.

FSH, Sertoli hücreleri ve germinal epitele etki ederek seminifer tübül oluşumunu ve spermatogenezi kontrol eder. Buna ek olarak, testisin LH'a cevabının artmasında ve androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezinde rol oynar. ABP, seminifer tübülde testosteronu bağlayarak intratestiküler testosteron miktarının plazmaya göre 20-50 kat fazla konsantrasyonda tutulmasını sağlar. FSH testisten salgılanan aktivin hormonu ile aktive, inhibin hormonu tarafından inhibe edilmektedir.

Testosteron, LH etkisiyle Leydig hücreleri tarafından salgılanır ve %98 oranında bağlı, %2 oranında serbest formdadır. Leydig hücreleri, sentez edilen testosteronu 5- alfa redüktaz enzimi vasıtasıyla periferik dokuda etkisini göstermesi için gereken formu olan dihidrotestosterona çevirir. Testosteronun inhibisyonu LH düzeyi tarafından sağlanır.

HHT aksı tarafından kontrol edilen spermatozoa halen motilite ve fertilizasyon kapasitesine sahip değildir. Bu olgunlaşma epididim, vaz deferens ve seminal veziküller tarafından yürütülen bir sürecin sonucunda sağlanmaktadır (29, 30).

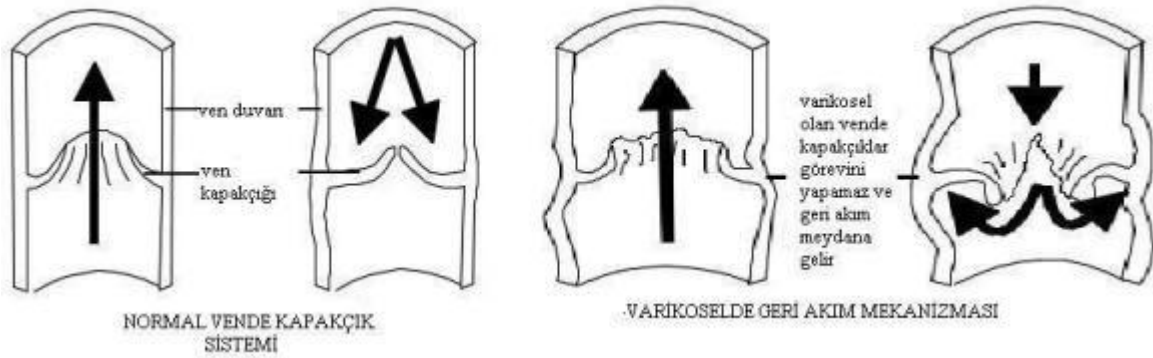
## **2.5 Varikosel Etiyolojisi**

Varikosel pampiniform pleksusun patolojik dilatasyonudur. Varikosel erişkin erkek popülasyonunda %15 oranında görülürken, bu oran infertilite açısından araştırılan erkeklerde %40'lara, sekonder infertilite nedeniyle başvuranlarda %70-80'lere çıkmaktadır (4, 31, 32). Varikosel sadece erişkin erkeklerde görülen bir hastalık değildir. Prevalans 2 ile 10 yaş arasında %0.92, 11 ile 19 yaş arasında %11'dir (33). Ayrıca varikoseli olan erkeklerin birinci derece akrabalarında %53 oranında varikosel saptanmaktadır (34).

Varikoselin etiyojisi günümüzde net olarak açıklanamamıştır ancak kabul görmüş olan 3 teori bulunmaktadır.

1. *Sağ ve sol testiküler venler arasındaki anatomik farklılıklar:* Sağ testiküler ven, vena kavaya oblik olarak açılırken sol spermatik ven sol renal vene dik bir açıyla açılır (35). Sol spermatik ven sağa göre yaklaşık olarak 8-10 cm kadar uzundur. Buna bağlı olarak da solda hidrostatik basınç artar ve pampiniform pleksusa iletilen bu artmış basınç venlerde dilatasyon ve tortuoziteye neden olur (Bkz. Şekil 2.6).

2. *Kompetan venöz valvlerin olmayışı:* Sol renal ven ve internal spermatik ven birleşim bölgesinde valv bulunmadığı saptanmıştır (36). Retrograt venografi çalışmalarında da bu bulguları destekleyen sonuçlar elde edilmiştir (6). Kompetan venöz valvlerin olmayışı venöz kanın reflüsüne neden olur (Şekil 2.11). Ancak yeterli valv sistemine sahip olan hastalarda %26.2 oranında varikozel görüldüğünden bu teori varikoselin etiyojisini ortaya koymakta yetersiz kalmaktadır. Bazı araştırmacılara göre varikozel gelişiminde valvlerin yetersizliği altta yatan neden değil, varikozel gelişimine katkıda bulunan bir faktördür (6, 37). Bazı çalışmalarda bazı kişilerde valvler olmadığı halde varikozel gelişmediği de gösterilmiştir (35).



Şekil 2.11: Varikoselde kapakçık sistemine bağlı olarak gelişen geri akım mekanizması.

3. *Sol renal venin, aorta ve süperior mezenterik arter arasındaki kompresyonuna bağlı olarak gelişen testiküler venin parsiyel obstrüksiyonu (findikkıran fenomeni):* Bu durum sonucunda kollateral gelişimi, venöz basınç artışı ve staz oluşur (Şekil 2.12) (38; 39). İki tip findikkıran fenomeni tanımlanmıştır. Proksimal (klasik) tipte sol renal ven aortanın anterioru ile süperior mezenterik arter arasında uzanır ve bu iki arter arasında kompresyona

uğrar. Distal tipte ise sol ana iliyak arterin sol ana iliyak vene basısı söz konusudur. Proksimal tip %0.7, distal tip ise %0.5 oranında görölmektedir (6).



**Şekil 2.12:** Sol varikoseli olan bir hastanın venogramı.

Verilen kontrast maddenin dilate sol internal spermatik ven (beyaz oklar) ve adrenal vene (küçük siyah ok) reflüsü görölüyor. Sol renal ven (büyük siyah ok) aorta ve superior mezenterik arter arasında komprese olmuş.

(Woo Sun Kim, et al. Hemodynamic investigation of the left renal vein in pediatric varicocele. Radiology, 241(1):232, 2006'dan uyarlanmıştır).

## 2.6 Varikosel Patofizyolojisi

Varikoselin fertilitıyla olan ilişkisi semen parametrelerinde (semen sayısı ve motilite) bozulma, testiküler volümde ve Leydig hücre fonksiyonlarında azalma ile ilgilidir (1). Sperm sayısındaki azalma varikosel boyutu ile doğru orantılıdır.

Günümüzde varikosel patofizyolojisini açıklamaya çalışan hipotezler,

- Testiküler kan akımı ve venöz basınç değişiklikleri
- Oksidatif stres
- Hipertermi
- İntersitisyel sıvı formasyonu ve nutrisyon değişiklikleri
- Renal ve/veya adrenal metabolitlerin reflüsü
- Hormonal disfonksiyon
- Akrozom reaksiyon defekti
- Otoimmünite
- Apoptozis

olarak sıralanabilir.

### **2.6.1 Testiküler Kan Akımı ve Venöz Basınç Değişiklikleri**

Deney hayvanlarında, tek taraflı varikoselin her iki testiste de kan akımını artırdığı ve varikosektomi sonrasında testiküler kan akımının normale döndüğü gösterilmiştir (8). Bazı çalışmalarda ise varikoselin testiküler kan akımını azaltarak Sertoli hücre fonksiyonlarını bozduğu gösterilmiştir (40). İnsanlarda renkli Doppler ultrasonografi (USG) ile yapılan çalışmalarda da varikoselin testis kan akımında anlamlı değişiklikler oluşturduğu izlenmiş ancak hipoperfüzyon ya da mikrosirkülasyon bulgularının “*power Doppler*” USG kullanılarak desteklenmesi gerektiği bildirilmiştir (41).

Testis içindeki venöz basınç artışı ile varikoselin ilişkisi gösterilmiştir (42). İntratestiküler onkotik ve hidrostatik basınç değişiklikleri sonucunda oluşan vazokonstriksiyonun beslenme üzerindeki olumsuz etkileri spermatogenezi bozabilir. İnsanlarda yapılan çalışmalarda varikoselin pampiniform pleksus içindeki basıncı artırdığı ve varikosektomi sonrası venöz basınç değerlerinde büyük oranda azalma olduğu saptanmıştır (43). Varikosektomi sonrası venöz basınçların düzeldiği olgularda sperm parametreleri de daha iyi bulunmuştur (43).

### **2.6.2 Oksidatif Stres**

Vücuttaki bir dizi metabolik olaylar sonucunda son yörüngelerinde eşlenmemiş elektron bulunduran ve bu yüzden son derece reaktif özellik taşıyan bazı serbest radikaller açığa çıkmaktadır. Serbest oksijen radikalleri (SOR)’ni de içeren bu radikallerden başlıcaları,

- Hidroksil radikalleri
- Hidrojen peroksit
- Hipoklorik asit
- Süperoksit anyonlar
- Nitrik oksit

olarak sayılabilir.

Sağlıklı erkeklerde seminal plazma aşırı SOR üretiminin etkilerini ortadan kaldıran antioksidanlar içermektedir. Patolojik durumlarda bu dengenin bozulması sonucunda artan SOR, sperm morfolojisini bozabilir, sperm motilitesinde azalmaya ve yetersiz sperm oosit

birleşmesine neden olabilir, spermin yapısında bulunan yağların peroksidasyonu sonucunda defektif sperm fonksiyonu oluşturabilir. Oksidatif stres erkek infertilitesinin birçok tipinde de suçlanmaktadır (44).

Varikoselde semen analizlerinde sağlıklı erkeklere göre SOR'de artış, antioksidan kapasitede ise sağlıklı gruplarla kıyaslandığında azalma olmaktadır. Varikozel tedavisinin seminal SOR seviyelerinde azalma ve antioksidan seviyelerinde artışa neden olduğu bilinmektedir (12).

### **2.6.3 Hipertermi**

Varikozele ikincil olarak gelişen testiküler işlev değişikliği açısından en yaygın kabul gören mekanizma hipertermidir. Deneysel varikozel modellerinde testis kan akımında ve histolojisinde değişiklikler yanında, testiküler sıcaklıkta da artış olduğu gösterilmiştir (7). Bu değişiklikler tedaviyle normale dönebilmektedir (8). Varikozel ve testiküler sıcaklık artışı arasındaki ilişki tanımlandıktan sonraki çalışmalar tek taraflı lezyonların bilateral etkisi olduğunu göstermiştir (45, 46). Asemptomatik varikozeli olan erkekler ve sağlıklı erkekler arasında skrotal sıcaklık açısından anlamlı fark saptanmamıştır (47). Deney hayvanlarında yapılan bazı çalışmalarda ise varikozel tedavisi sonrası testiküler sıcaklığın normale döndüğü gösterilmiş ve bu saptama, insanlarda yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır (48).

Skrotal sıcaklığı kontrol eden iki *termoregülatör* sistem vardır. Bunlardan ilki skrotumun kendisidir. Bu bölgedeki ince ciltte subkütan yağ dokusu bulunmaz ve dartos kası tarafından kontrol edilen yüzey alanı değişken olarak kalır. İkinci sistem ise arteriyel ve venöz kan arasındaki karşı akım (*countercurrent*) ısı sistemidir ve pampiniform pleksus tarafından sağlanır (25). Bu sistemde arteriyel kan testise girerken soğutulur ve testis sıcaklığı düşürülür. Bu sistemin düzgün çalışması için venöz kanın sıcaklığının testise giren arteriyel kandan daha düşük olması gerekmektedir (49). Varikozel işte bu mekanizmayı bozmaktadır.

Sıcaklık artışı, metabolizma ve Sertoli hücre fonksiyonunda değişikliğe neden olur. Sonuçta apoptozis ve artmış arteriyovenöz şantlara bağlı venöz değişikliğe yol açar.

Ayrıca, DNA sentezinde görevli olan enzimlerin aktivitesini veya testis içinde besin veya oksijen taşınmasını azaltarak germ hücreleri üzerine etki eder (49-51).

#### ***2.6.4 İnterstisyel Sıvı Formasyonu ve Nutrisyonel Değişiklikler***

Varikosele bağlı olarak internal spermatik vende oluşan hidrostatik basınç artışı, testiküler kapiller ve vasküler geçirgenliğin değişmesine yol açar. Geçirgenlikte meydana gelen bu değişiklik interstisyel sıvı oluşumunda da değişikliğe neden olarak testiküler hücreler ve dolaşım arasındaki etkileşimi bozar. Çünkü testiküler interstisyel sıvı testiküler hücreler ve dolaşım arasındaki endokrin etkileşimi ve hücreler arasındaki parakrin metabolizmaları düzenlemektedir. Bu sıvının oluşumu ise testisteki kapiller kan akımı ve geçirgenliği tarafından düzenlenmektedir.

Varikoselde kan damarlarında polimorfonükleer hücre birikimi olduğu saptanmıştır ve bunun venöz hidrostatik basınç artışı ile gelişen vasküler geçirgenliğe ikincil ödeme bağlı olduğu düşünülmektedir (52).

#### ***2.6.5 Renal ve/veya Adrenal Metabolitlerin Reflüsü***

Güçlü bir vazodilatör olan adrenomedullinin ekspresyonu normalde adrenal, akciğer, böbrek, kalp ve endotelial dokularda saptanırken testiste görülmemektedir. Varikozel onarımı yapılan hastaların periferik ve spermatik kan örnekleri incelendiğinde spermatik vendeki adrenomedullin düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu izlenmiştir (53). Daha detaylı çalışmalara gereksinim olsa da adrenomedullinin karşı akım ısı sisteminin bozulmasında etkili olduğu düşünülmüştür.

Mevcut olan adrenal veya renal geri akım, varikoselli hastalarda böbrek ve adrenallerden katekolaminler, prostaglandin E ve prostaglandin F gibi metabolitlerin reflüsüne neden olabilir (54, 55). Katekolamin reflüsü içinde büyük bir kesimi norepinefrinin oluşturduğu ve norepinefrin düzeyi yüksek olan hastalarda yıllık takip sonrasında gebelik oluşumunun ve sperm parametrelerindeki düzelmenin daha düşük olduğu izlenmiştir. Bu geri akımın düzeltilmesi sonucu olayın geri dönüşlü olduğu belirtilmiştir (54). Varikoselli erkeklerde renin, dehidroepiandrosteron ve kortizol seviyelerinin arttığı gösterilememiştir (56).

Varikosel oluşturulan sıçanlarda yapılan bir çalışmada varikoselle birlikte sol sürrenalektomi uygulanmış ve intratestiküler testosteron ve sperm motilitesi açısından *sham* grubuna göre anlamlı fark bulunmamıştır (9).

### **2.6.6 Hormonal Disfonksiyon**

Varikoselin endokrin fonksiyon üzerine etkileri de araştırılmıştır. Varikoselin genellikle endokrin disfonksiyona yol açtığı ve steroidogenezi bozduğu görülmüştür (57-60).

Varikoselin serum testosteronu üzerine etkisine ilişkin değişik sonuçlar bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda belirtilen düşük değerlere karşın, bazı yayınlarda normal testosteron düzeyleri belirtilmektedir (61-63). Varikosel modellerinde bilateral intratestiküler testosteronun azaldığı, ipsilateral arttığı veya bilateral ve eşit düzeyde azaldığı gösterilmiştir (57, 64, 65). GnRH uygulaması artmış gonadotropin cevaplarıyla sonuçlanır, bunun Leydig hücre ve seminifer tübül disfonksiyonuna bağlı olduğuna inanılmaktadır (10). GnRH uyarımına aşırı yanıt elde edilen olgularda oligospermi derecesinden bağımsız olarak varikosel onarımı sonrasında semen parametrelerinde iyileşme görülmektedir. Varikosel onarımı sonrasında GnRH uyarımına LH yanıtının normalleştiği olgularda cerrahi sonrası fertilitite ve gebelik oranları korelasyon göstermektedir (66).

Sertoli hücre disfonksiyonu, artmış inhibin, transferin ve ABP seviyelerine karşılık azalmış FSH düzeyiyle gösterilebilir. Buna en iyi kanıt varikoseli olan erkeklerde FSH artışı ve testosteron azalmasıdır. Bu erkeklerin büyük bir kısmı varikoselektomiye yanıt vermektedir (60). Buna rağmen oligospermi ve normal hormon düzeylerine sahip bazı alt gruplarda varikoselektomi herhangi bir iyileşme sağlamamaktadır. Bu erkeklerin insidental varikoselele sahip olduğu ve infertilite sebebinin başka faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (10). Bu yüzden, normal hormon profiline sahip ciddi oligospermik olgularda varikosel onarımı öncesi infertilitenin diğer nedenleri de göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak varikosel, HHT aksını olumsuz olarak etkilemekte ve anormal Leydig hücre işlevi olan olgular varikosel onarımı sonrasında yarar görmemektedir (67).



### **2.6.7 Akrozom Reaksiyonu**

Zona reaksiyonu oluşturulmuş insan yumurtalarında yapılan çalışmada varikoseli olan fertil grubun spermlerinin varikoseli olmayan infertil gruptaki erkeklere göre belirgin olarak daha fazla ancak varikoseli olmayan fertil gruptaki erkeklere göre belirgin olarak daha az bağlandığı gösterilmiştir (68). Hamster zona bağlanma reaksiyonu varikoselli erkeklerde fertil ya da varikoseli olmayan infertil gruba göre daha düşüktür. Bu çalışmalar varikoselde sperm sayısı ve morfolojisinden çok, sperm fonksiyonundaki defektin daha ağır bastığını düşündürmüştür (68, 69).

### **2.6.8 Otoimmünite**

Varikoseli olmayan diğer infertil hasta popülasyonu ile karşılaştırıldığında varikoselli infertil hasta grubunda antisperm antikorlar (ASA) daha fazla bulunmuştur (11). Kan testis bariyerinin bozulduğu testis torsiyonu, duktal tıkanıklıklar, epididimit, prostatit ve testis travması gibi durumlarda ASA oluşmaktadır (70). Varikoselde oluşan ASA'nın kan testis bariyerini bozmadan nasıl oluştuğu bilinmemektedir (71). Bazı araştırmacılara göre ise cerrahi onarım antikor düzeyini değiştirmedikten veya cerrahiye yanıtı önceden kestirmemizi sağlamadığından varikosele bağlı infertilite immünolojik bir komponente bağlıymış gibi durmamaktadır (72).

### **2.6.9 Apoptozis**

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü, bütün çok hücreli canlılarda organ boyutunun sabit kalmasını sağlamak için durmadan yenilenen dokularda hücre proliferasyonunun kontrolünü tanımlamaktadır (73). Varikosel olgularında testis dokusunda apoptozis artmakta ve varikoselli erkeklerde apoptotik germ hücre miktarı %10'a kadar yükselmektedir. Bu oran sağlıklı erkeklerde %0.1'dir (74). Varikoselde apoptotik süreçte sıcaklık artışı, androjen yoksunluğu ve toksik metabolitler birliktelik göstermektedir (75). Varikoselli olgularda sıcaklık artışı evreye ve hücreye özgül olarak apoptozisi artırmaktadır. Isı etkili belirteçlerden *heat shock protein* (HSP)'lerinin bulunmaması apoptozisi belirgin olarak azaltmakla beraber HSP'lerin varikosel patofizyolojisindeki rolü henüz bilinmemektedir (76, 77). Sıçanlarda hipofizektomi ve GnRH antagonistleriyle apoptozisin indüklendiği gösterilmiştir (78). Toksik ajanlar içerisinde 2-metoksiasetik asit,

nikotin, kadmiyum gibi ajanların sperm parametrelerini bozduğu belirtilmiştir. Varikoselli olgularda ortaya çıkan kadmiyum maruziyeti, androjen baskılanması ve ısı stresi gibi durumlar apoptozisle sonuçlanmaktadır.

Kadmiyum, çevrede ve sigara dumanında bulunan bir gonadotoksindir ve varikosele bağlı spermatogenez bozukluğunda kilit rol oynadığı düşünülmektedir. Hayvan çalışmaları kadmiyumun apoptozisi indüklediğini göstermiştir (79). Varikoselde artmış olan testiküler kan akımı, artmış hidrostatik basınç ve vasküler endotel hasarının da etkisiyle kadmiyumun testis içerisinde taşınmasına neden olabilir (80). Varikoselli erkeklerde yüksek olan seminal kadmiyum düzeyleri serum kadmiyum düzeyi ile korelasyon göstermemektedir (13). Spermatogenezde azalma saptanan varikoselli erkeklerin testiküler kadmiyum düzeyleri obstrüktif azospermili veya spermatogenezini normal olan varikoselli erkeklere göre de belirgin olarak daha yüksektir (80).

## **2.7 Varikoseldeki Histolojik Değişiklikler**

Testiküler dokuda varikosele özgü patognomonik histolojik veya mayotik değişiklik yoktur. Başlıca histolojik değişiklikler *matürasyon arresti*, Leydig hücre hiperplazisi, seminifer tübül başına düşen Sertoli hücre sayısında azalma, germinal epitelyumda dökülme, seminifer tübül bazal membranında kalınlaşma, vasküler intimal fibrozis ve vasküler tunika mediada kollajen artışıdır. Buna karşın Sertoli-Sertoli hücre bağlantıları ve bazal kompartman genelde korunmuştur (81).

## **2.8 Varikosel Tanısı**

Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre varikosel tanısı klinik muayene ile konur ve renkli Doppler USG ile doğrulanır. Tedavide antegrat veya retrograt embolizasyonun uygulandığı yerlerde tanı spermatik venografiyle de konabilmektedir.

### **2.8.1 Fizik Muayene**

Varikoselin tanısı fizik muayene ile konmaktadır. Hasta ayakta ve yatar pozisyonda muayene edilmelidir. Karakteristik fizik muayene bulguları testisin üzerinde kalınlaşmış

venler ve -çoğunlukla solda olacak şekilde- aynı tarafta testis atrofisidir. Bu dilate venler fizik muayenede palpe edilebilirse “klinik”, fizik muayenede saptanamayıp yalnızca tanı yöntemleriyle belirlenebiliyorsa “subklinik” varikoselden bahsedilir. Her ne kadar izole sağ varikoseller *situs inversus* olgularında görülebilirse de, sadece sağ tarafta yer alan varikosellerin renal tümörler, retroperitoneal kitle veya lenfadenopatinin bir habercisi olduğu düşünülmektedir. Klasik olarak varikosel, Dubin tarafından tanımlanan şekilde derecelendirilmektedir (82):

- *Grade 1*— küçük, sadece Valsalva manevrasıyla palpe edilen varikosel.
- *Grade 2*— orta dereceli, hasta ayakta palpe edilebilen varikosel.
- *Grade 3* – geniş, skrotum cildinden de görülebilen varikosel (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: Solda *grade 3* varikosel.

Ayakta muayene yapıldıktan sonra yatar pozisyonda muayeneye devam edilmelidir. Hasta yattığında venlerde küçülme ve spermatic kordda incelme saptanıyorsa varikoselden şüphelenilmelidir. Hasta ayakta saptanan kordon kalınlaşması yatar pozisyonda da devam ediyorsa kordon lipomu, trombus veya tümör gibi nedenlere bağlı oluşabilen vena kavadaki bir obstrüksiyon açısından inceleme gerekebilir.

Kişi yatar pozisyondayken spermatic korda başparmak ve işaret parmağı arasında baskı uygulanarak hasta ayağa kaldırılır. Ayakta bu baskı bırakıldığında venlerde retrograd dolunun hissedilmesi varikosel lehine bir bulgudur.

Tek başına testis volümünde azalma varikozel tanısını ortaya koymak için yeterli değildir. Buna rağmen, spermatogenezin bozulduğu varikozelli olgularda testis volümünde azalma meydana gelebilir. Yüksek dereceli varikozel olgularında testis boyutundaki küçülmenin ve total motil sperm sayısında azalmanın daha fazla olduğu gösterilmiştir (83).

Varikozel tanısında en büyük kısıtlılık tanı ve derecelendirmede klinisyenler arasında farklı sonuçların elde edilmesidir. Fizik muayene ve görüntüleme yöntemleri karşılaştırıldığında, fizik muayene ile varikozel tanı ve derecelendirilmesinde %23-26 oranında yanlış pozitiflik saptanmış ve fizik muayenenin varikozel tanısındaki duyarlılığının %71, özgüllüğünün ise %69 olduğu belirtilmiştir (84-86).

### ***2.8.2 Skrotal Ultrasonografi***

Skrotal USG, varikozel tanısı için en sık başvuru olan görüntüleme yöntemidir. Bu yöntemle venlerin çapı ve reflü tespit edilebilir. Ancak, varikozel tanısı için standart ven çapı hakkında bir görüş birliği yoktur. Venografiyi altın standart olarak kabul ettiğimizde, varikozel tanısı için ven çapının 2.7 milimetre (mm) ve klinik varikozel için ven çapının 3.6 mm olması durumunda varikozel tanısının özgüllüğünün ve duyarlılığının en yüksek olduğu gösterilmiştir (87). Bunun yanında, ven çapının 2 mm olduğu olgularda, skrotal ultrasonografide 3 veya daha fazla ven varlığında ve bu venlerden en az birinin 3 mm'den daha geniş olduğu durumlarda veya dinlenme anında ölçülen ven çapının Valsalva manevrası sırasında 1 mm artması halinde subklinik varikozel tanısının bulunduğu belirtilmektedir (88-90).

Görüntüleme yöntemlerinin daha çok varikozel muayenesinin zor olduğu şişman, spermatik kordu kısa, hiperaktif kremasterik refleksi olan, testis hassasiyeti nedeniyle testislerini rahat muayene ettiremeyen ve geçirilmiş ameliyatlara bağlı skrotis dokusu fazla olan olgularda kullanılması önerilmektedir.

### ***2.8.3 Renkli Doppler Ultrasonografi***

Renkli Doppler USG ile damarlardaki kan akımını, akımın yönü ve miktarı belirlenebilir. Bu yöntemle, Valsalva sırasında spermatik venlerdeki reflü görüntülenebilir, ancak klinik varikozeli olmayan olgularda da spermatik venlerde Valsalva ile reflü izlenmektedir (91).

Bu yüzden varikozel tanısı koymada fizyolojik durumlar (normal solunum ve derin solunum) sırasında reflü olması anlamlıdır.

## 2.9 Varikozelde Tedavi Endikasyonları

Varikozel tedavisindeki birincil amaç testiküler fonksiyonu ve semen parametrelerini düzeltmek ve gebelik oranlarını artırmaktır. Bu amaçla varikozel onarımı planlanmadan önce aşağıdaki şartların tümü sağlanmalıdır:

1. Varikozel fizik muayenede saptanmalıdır,
2. İnfertilite olmalıdır,
3. Erkeğin eşi fertil veya tedavi edilebilir fertilitte potansiyeline sahip olmalıdır,
4. Erkek anormal semen parametrelerine veya anormal sperm fonksiyon testlerine sahip olmalıdır.

Yukarıdaki şartları sağlayan her olguda varikozektomi sonrası düzelme beklendiği gibi olmamaktadır. Araştırmalar bazı hastaların varikozel onarımından daha fazla yarar gördüğünü göstermiştir. Bu hastaların özellikleri Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 2.1:** Varikozel tedavisinden daha çok fayda görebilecek hastaların özellikleri.

- *Grade 3* varikozel
- Testiküler atrofinin olmaması
- Normal FSH düzeyi
- Pozitif GnRH stimülasyon testi
- 5 milyon ve üzerinde total motil sperm sayısı
- %60'ın üzerinde motilite

Azospermisi olan varikozelli olgularda varikozel onarımı öncesinde testis biyopsisi yapılması önerilmektedir. Biyopsi sonucunda *Sertoli cell only* paterni veya matürasyon arresti saptanan olgular cerrahi onarımdan fayda görmemektedir. Total motil sperm sayısının 1 milyonun altında olduğu olgularda tedavi sonrası semen parametrelerinde

%70-85 oranında düzelme ve %38 oranında gebelik sağlanmaktadır. Bu gebeliklerin %20'si spontan gebeliktir (92).

FSH seviyesinin 300 ng/ml veya 117 mIU/ml'den daha düşük olması iyi prognostik faktördür. FSH seviyeleri yüksek ve sperm sayısının 10 milyonun altında olduğu olgularda prognoz kötüdür (92).

Genetik bozukluklara (Y kromozomu mikrodelsiyonları veya karyotip bozukluğu) sahip varikoselli olgularda onarım sonrası semen parametrelerinde düzelme veya gebelik oranında artış olmamaktadır (93). Semen parametrelerinde ciddi bozukluk olan olguların preoperatif genetik testler açısından değerlendirilmesi uygun olacaktır. Bununla beraber, genetik infertilite mevcutsa bu durum cerrahiyle düzelmeyecektir.

Subklinik varikozel olgularında cerrahi tedavi sonrasında semen parametrelerinde hafif düzelme sağlansa da bu durum gebelik oranlarına çok yansımamaktadır (94). Bu nedenle subklinik varikozel olgularında cerrahi tedavi tartışmalıdır.

Varikozelin en belirgin semptomları skrotal ağrı ve rahatsızlık hissidir. Bu bulgular varikoselli erkeklerin %2-10'unda gözlenir. Bu şikayetlerle başvuran ve semen parametreleri bozuk olmayan erkeklerde cerrahi onarım öncesinde semptomatik tedavi seçenekleri (skrotal elevasyon, antiinflamatuvar ve analjezik ajanlar) denenmeli, bu tedavilere rağmen şikayetlerde düzelme olmazsa varikozel onarımı düşünülmelidir. Skrotal ağrının ayırıcı tanısının yapılması cerrahiye karar vermek ve cerrahi başarısı açısından önem taşımaktadır.

## **2.10 Varikozel Tedavisi**

Varikozel tedavisi başlıca cerrahi ve perkütan embolizasyon olmak üzere iki şekilde olmaktadır (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2:** Varikoselde tedavi seçenekleri.

<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Cerrahi</b><ul style="list-style-type: none"><li>— Retroperitoneal</li><li>— İnguinal</li><li>— Subinguinal</li><li>— Skrotal</li><li>— Laparoskopik</li></ul></li><li>• <b>Perkütan embolizasyon</b></li></ul>
--

Retroperitoneal cerrahide arter korunmaz ve nüks oranı yüksektir. Buna rağmen yöntem basit ve hızlıdır. İnternal ve eksternal spermatic ven dallarının bağlanması; spermatic arter, lenfatik damarlar, spermatic kordon ve vaz deferensin korunması varikozel cerrahisinin temelini oluşturmaktadır. Bu amaca en iyi hizmet eden yöntem inguinal veya subinguinal varikozektomidir. Mikroskopik inguinal ve subinguinal varikozektomilerde postoperatif dönemde nüks, hidrosel oluşumu ve testis atrofisi daha az izlenmektedir. Bunun sebebi, spermatic kord içindeki lenfatik, arteriyel ve venöz yapıların mikroskop yardımıyla net olarak tanımlanması ve korumanın yapılabilmesidir. Laparoskopik yöntemler maliyeti fazla ve morbiditesi yüksek girişimlerdir. İnterabdominal majör damar ya da intestinal yaralanmalara bağlı laparotomi gerekebilir.

Perkütan embolizasyonda internal spermatic vene radyolojik olarak balon ya da *coil* ile oklüzyon yapılabildiği gibi skleroterapi de uygulanabilir. Bu işlem cerrahiye göre daha az ağrıya neden olur ve postoperatif dönemde daha erken iyileşme sağlar. Ancak, deneyim gerektirmesi ve tedaviyi uygulayan radyolog veya üroloğun tecrübesine bağlı olarak başarı oranlarının değişmesi tedaviyi kısıtlayıcı faktörlerdendir. Radyasyona ve kontrast maddeye maruz kalma nedeniyle çoğunlukla cerrahi tedavi sonrası nükslerde alternatif bir tedavi olarak düşünülmektedir.

Hidrosel oluşumu mikroskop kullanılmayan cerrahi olgularda %3-33 oranında izlenir ve varikozektominin en sık rastlanan komplikasyonudur. Hidrosel oluşmasının nedeni lenfatiklerin bağlanması sonucu lenfatik dolaşımın bozulmasıdır. Mikroskopik varikozektomilerde hidrosel oluşumu oldukça azdır.

Cerrahi sonrası nüks oranları literatürde birbirinden farklıdır. Genel olarak rekürrens kollateral venlere bağlıdır ve %1-45 oranında gözlenir. Mikroskobik varikoselektomide bu oran %1 veya daha altındadır. Cerrahi sırasında testiküler arterin bağlanması ya da zarar görmesi durumunda testis atrofsi gelişebilir.

Perkütan embolizasyonda komplikasyon oranı %6 civarındadır. Başlıca komplikasyonlar vasküler perforasyon, *coil* veya balon migrasyonu, pampiniform pleksusun trombozu ve kontrast allerjisidir.

### 2.11 Adölesan Varikosel: Tanı ve Tedavi

Adölesan varikoselin tanısında altın standart fizik muayenedir, rutin olarak her olguda Doppler USG önerilmemektedir. İleri derecede sol varikoseli olan ve semen parametrelerinde bozukluk saptanan olgularda bilateral varikosel varlığını ortaya koyması açısından Doppler USG yardımcı olabilir.

Adölesan varikoselde tedavi endikasyonları Tablo 2.3'te görülmektedir.

**Tablo 2.3.** Çocukluk çağı ve adölesan varikoselde tedavi endikasyonları.

<p><b>Kesin endikasyonlar</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Etkilenen testiste 2 ml veya %10'dan fazla volüm kaybı</li></ul> <p><b>Göreceli endikasyonlar</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Testis kıvamında yumuşama</li><li>• Sperm parametrelerinde bozulma</li><li>• Bilateral palpe edilebilir varikosel olması</li><li>• Semptomatik (ileri derecede) varikosel</li><li>• GnRH uyarımına aşırı FSH ve LH yanıtı</li></ul>
---

Adölesan varikosellerin tedavisi sonrasında testis boyutlarında düzelme sağlanmaktadır (95). Bu yüzden testis volümlerinin ölçülmesi tedaviye karar vermek kadar cerrahi sonrasında kontroller açısından da önemlidir. Testis volümü için orkidometrelerin kullanılması yeterlidir.



Genelde asemptomatik seyretmesine rağmen adölesan varikozel olgularında skrotal ağrı, etkilenen testiste yumuşama, testis gelişiminde bozulma ve volüm kaybı izlenebilir (96). Bu olgularda spermatogenezdeki bozulmaya bağlı olarak FSH değeri artabilir, testosteron değeri düşebilir.

Bu olguların tedavisindeki güncel yaklaşım mikroskobik inguinal veya subinguinal yaklaşımlardır. Bu yöntemde eksternal spermatic (kremasterik) ven ve gubernaküler ven de bağlanabildiğinden nüks oranı oldukça düşüktür. Ayrıca testiküler arter ve lenfatik damarlar da korunduğundan testis atrofisi ve hidrosel gelişimi daha az olmaktadır. Preoperatif testis atrofisi bulunan 14 yaş altı olgularda cerrahi sonrasında testis atrofisi düzelebilirken, 14 yaş üstü olgularda testis kıvamındaki artışa rağmen atrofi düzelmemektedir (97).

## **2.12 Anjiyogenez**

Anjiyogenez daha önceden var olan kan damarlarından yeni damar oluşumunu içeren fizyolojik bir durumdur. Tartışılan noktaları olsa da vaskülogenez spontan yeni damarlanmayı, filizlenme ise var olan damar tomurcuklarından yeni damar oluşumunu ifade eder. Örneğin endotelial hücrelerin tek tabakası, kapiller oluşturmak için dallanmaya başlamışsa bu anjiyogenezdir.

Anjiyogenez büyüme, gelişme ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik olaylarda rol oynadığı gibi, tümörlerin sessiz durumdan daha invazif bir hale geçmesine de neden olabilir. Tümörün malign karakter kazanmasının temel basamaklarından biri de tümörün anjiyogenik özelliklerinin artmasıdır.

### **2.12.1 Anjiyogenezin Tipleri**

Filizlenme anjiyogenezin ilk tanımlanan tipidir. İyi bilinen aşamalar sonrasında oluşmaktadır. İlk önce anjiyogenik büyüme faktörleri denen biyolojik sinyaller mevcut damarlarda bulunan endotelial hücreler üzerindeki reseptörleri aktive ederler. Aktive olan endotelial hücreler proteazlar denen enzimleri salgılayarak endotelial hücrelerin ana damar duvarından dışarı kaçmasını sağlarlar. Daha sonra endotelial hücreler çevreyici bir matrikse çoğalırlar ve komşu damarlara tutunan tomurcuklar oluştururlar. Bu

tomurcuklar anjiyogenik uyarının kaynağına doğru uzandığında endotelial hücreler integrinler denene ve hücre yüzeyine tutunmalarını sağlayan moleküllerin yardımıyla artarda göç etmeye başlarlar. Anjiyogenez bölgesine ulaşan bu tomurcuklar daha sonra damar lümeni oluşturacak şekilde bükülmeler gösterirler (98).

Ayrılma (*splitting*) ile oluşan anjiyogenez ilk olarak neonatal sıçanlar üzerinde gösterilmiştir. Bu tip damar oluşumunda, kapiller duvarı lümene doğru uzanarak tek bir damardan iki damar oluşmasını sağlar. İlk önce karşılıklı iki kapiller duvarı bir temas bölgesi oluştururlar. Daha sonra endotelial hücre birleşimleri yeniden organize olur ve damar tabakası delinerek büyüme faktörlerinin ve hücrelerin lümen içine nüfuz etmesine olanak sağlar. Üçüncü aşamada iki yeni damarın temas bölgelerinin arasında bir çekirdek oluşur ve perisit ve miyofibroblastlarla dolar. Bu hücreler çekirdek içeriğini kollajen lifleriyle sıvayarak damar lümenin büyümesini sağlayan ekstraselüler matriks oluşumunu sağlarlar. Sonuçta, çekirdek herhangi bir değişikliğe uğramadan temel yapıya dönüş gösterir. Bu form, var olan hücrelerin yeniden organizasyonu olması açısından önemlidir. Böylece endotelial hücrelerin sayısında artma olmaksızın yeni kapillerlerin sayısında artma sağlanır. Bu, özellikle geniş mikrodamar ağı oluşturmak için gereken hücre sayısının yetersiz olduğu embriyonik gelişme döneminde önemli olan bir anjiyogenez formudur.

### **2.12.2 Anjiyogenik Büyüme Faktörleri**

Anjiyogenezi uyarıcı büyüme faktörleri Tablo 2.4'te görülmektedir.

**Tablo 2.4.** Anjiyogenezi uyaran büyüme faktörleri.

- Anjiyogenin
- Anjiyopoetin-1
- Fibroblast büyüme faktörü: asidik (aFGF) ve bazik (bFGF)
- Follistatin
- Granülosit koloni- uyarıcı faktör
- Hepatosit büyüme faktörü
- İnterlökin-8
- Leptin
- Plasental büyüme faktörü
- Pleiotrofin
- Progranulin
- Proliferin
- Transforme edici büyüme faktörü-alfa
- Transforme edici büyüme faktörü -beta
- Trombosit-kaynaklı endotelial hücre büyüme faktörü
- Trombosit -kaynaklı büyüme faktörü-BB
- Tümör nekroz faktörü-alfa
- Vasküler endotelial büyüme faktörü/vasküler permeabilite faktörü

VEGF, anjiyogenezin en önemli uyaranlarından biridir ve belirli bir bölgede kapillerlerin artmasını sağlamaktadır. *In vitro* çalışmalarda VEGF ve fibroblast büyüme faktörü beta (FGFb)'nin uyarılmasına bağlı olarak sığır kapiller endotelial hücrelerinin çoğaldığı, tübüler oluşumlar gösterdiği ve VEGF'e ilişkin sonuçların daha belirgin olduğu bildirilmiştir (99). Benzer çalışmalarda VEGF'in anjiyogenezin güçlü bir uyarımı olduğu, çünkü bu büyüme faktörünün varlığında endotelial hücrelerin çoğaldığı, migrasyon gösterdiği ve nihayetinde kapillerlere benzeyen tübüler yapılar oluşturduğu gösterilmiştir (100). VEGF uyarımının, egzersiz ve yara iyileşmesi gibi durumlarda fizyolojik veya tedavi edici etkisi olduğu da düşünülmektedir (101).

VEGF, endotelial hücreler üzerinde yoğun bir sinyal akışına neden olmaktadır. Bu proteinin, reseptörü olan VEGFR-2'ye bağlanmasıyla bir tirozin kinaz sinyal kaskadı başlar. Sonuçta damar geçirgenliğini değişik oranlarda etkileyen ajanların (NO üreten eNOS enzimi gibi), çoğalmayı artırıcı FGFb gibi faktörlerin ve migrasyonu sağlayan faktörlerin üretimi uyarılarak olgun damarlara dönüşüm sağlanır.

Anjiyogenik sinyal akışının bir parçası olarak NO'in anjiyogenik yanıtı artırıcı bir etkisi olduğu düşünülmüştür, çünkü NO inhibisyonu anjiyogenik büyüme faktörlerinin etkilerinde azalmaya yol açmaktadır. Yine de, egzersiz sırasında NO üretiminin inhibe

olması anjiyogenezi inhibe etmemektedir. Bu durum anjiyogenik yanıtta başka faktörlerin de rolünün olduğunu düşündürmektedir (100, 101).

Anjiyopoietinler, olgun kan damarları oluşumu için gereklidir. Anjiyopoietin 1 ve 2, spesifik tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak etki ederler. Böylece bir dimerizasyon oluşur ve tirozinler üzerinde fosforilasyon meydana gelir. Bu olay da hücre sinyallerini uyarmaktadır.

Matriks metalloproteinazları (MMP) anjiogeneizde etkili diğer bir ajandır. MMP, damar duvarı bütünlüğünü sağlayan (bazal membran ve ekstraselüler matriks) proteinleri yıkarlar. Bu proteoliz filizlenme tipi anjiogeneizde olduğu gibi endotelial hücrelerin interstisyel alana kaçışını sağlamaktadır. MMP inhibisyonu yeni kapiller oluşumunu engellemektedir (102). Bu enzimler özellikle damar oluşumu aşamasında regüle olmaktadır, çünkü ekstraselüler matriksin harabiyeti mikrovasküler ağın bütünlüğünü bozmaktadır (100).

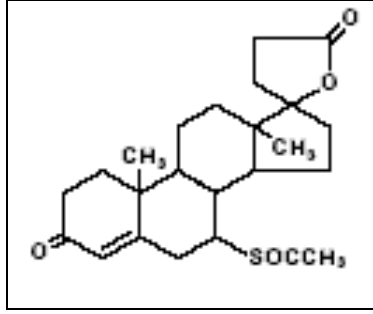
Fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF2), endotelial hücre çoğalmasını tetiklemekte ve endotelial hücrelerin tübuler yapılara organize olmasını sağlayarak anjiyogenezi uyarmaktadır. FGF, VEGF ve trombosit kaynaklı büyüme faktöründen çok daha potent bir anjiyogenik faktördür. FGF2, damar gelişiminin uyarılmasından başka, yara iyileşme sürecinde de erken dönemlerde yara alanını doldurarak bir granülasyon dokusu oluşturan fibroblastların proliferasyonunu düzenler.

Delta benzeri ligand 4 (Dll 4), yeni keşfedilmiş ve anjiyojenik potansiyeli VEGF'e benzeyen önemli bir anjiyogenik faktördür (103). Dll 4, *Notch* reseptör ailesinin üyesi olan bir transmembran ligandır.

### **2.12.3 Anjiyogeneiz İnhibitörleri**

Anjiyogeneiz inhibitörleri özellikle aşırı damar yoğunlaşmasının olduğu malign hastalıklarda ve maküler dejenerasyon gibi durumlarda artan bu damarlanmayı azaltmak için kullanılmaktadır. Anjiyostatin, endostatin, fibronektin, heparinazlar ve metalloproteinaz inhibitörleri gibi vücutta bulunan anjiyogeneiz inhibitörlerinin yanında tıbbi kullanımda farklı endikasyonlar için uygulama alanı bilinen SPL'un da anjiyogeneiz inhibitörü olduğu bildirilmiştir (19, 104).

Spironolakton (3-3-oxo-7 $\alpha$ -asetilthio-17 $\beta$  hidroksi-4-androsten 17  $\alpha$ -yl propionik asit  $\gamma$  lakton) potasyum tutucu bir diüretiktir ve aldosteronun kompetitif antagonistidir (Şekil 2.14.).



Şekil 2.14: Spironolaktonun kimyasal yapısı.

SPL, klinik olarak hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliğinde oral olarak kullanılan bir ilaçtır. Antiandrojenik etkisinden faydalanılarak akne, sebore ve hirsutizmde de kullanım alanı bulmuştur (105, 106).

SPL kullanımına bağlı olarak gelişen amenorenin anjiyogenezi inhibe etmesine bağlı olduğu düşünülmüş ve çalışmalar SPL'un anjiyogenez inhibitörü olduğunu göstermiştir (19, 104, 107). SPL'un bu etkisi antimineralkortikoid ve antiandrojenik etkisinden bağımsızdır (19, 108). Bu etkilerinden dolayı SPL'un solid tümör büyümesi, maküler dejenerasyon, hemanjiyom ve psoriasis gibi anjiyogeneze bağlı hastalıklarda kullanılabileceği düşünülmüştür (104).

Bu tez çalışmasında uygulanabilecek başka anjiyogenez inhibitörleri olmasına karşın, SPL'un sıçanlardaki farmakokinetik özelliklerinin bilinmesi tercih edilmesinin nedenlerinden birisidir (109).

Bilgilerimize göre literatürde varikoselde anjiyogenez inhibitörü olarak SPL'un etkilerini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızdaki deneylere Başkent Üniversitesi Araştırma Kurulu ve Hayvan Deneyleti Etik Kurulundan onay alındıktan sonra başlandı (Proje No. DA07/12).

#### 3.1. Deney Hayvanları

Deneysel sol varikösel modeli için Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen, ortalama ağırlığı  $282.75 \pm 20.47$  g olan 24 adet yetişkin (14 aylık) erkek Wistar Albino sıçan kullanıldı. Bütün deney hayvanları vivaryumda 12 saatlik gece/gündüz düzeninde,  $20 \pm 2$  santigrad derece ( $^{\circ}\text{C}$ ) oda sıcaklığında ve  $\%50 \pm 10$  nemli ortamda barındırıldı. Sıçanlar standart sıçan yemi ile beslendi. Deney hayvanlarına yem ve su kısıtlaması uygulanmadı.

Sıçanlar her grupta 6 adet sıçan olacak şekilde aşağıdaki 4 gruba rasgele olarak ayrıldı.

- **Deneysel Sol Varikösel (DSV) Grubu:** Bu gruptaki sıçanlarda anestezi altında cerrahi olarak sol varikösel oluşturuldu. Sıçanlara 45 gün boyunca orogastrik gavaj ile 20 mg/kg/gün dozunda serum fizyolojik (SF) uygulandı.
- **Varikösel + Spironolakton (V+S) Grubu:** Bu gruptaki hayvanlara DSV grubundaki deney hayvanlarındaki gibi sol varikösel oluşturuldu. Postoperatif 1. günden itibaren bu gruptaki hayvanlara anjiyogenez inhibitörü SPL, orogastrik gavaj ile 20 mg/kg/gün dozda 45 gün boyunca uygulandı.
- **Sham Grubu:** Bu gruptaki deney hayvanlarında renal veni bağlamak dışında DSV grubunda uygulanan tüm cerrahi işlemler gerçekleştirildi. Postoperatif dönemde bu gruptaki hayvanlara ilaç ve/veya SF verilmedi.
- **Kontrol Grubu:** Bu gruptaki hayvanlara herhangi bir işlem ve/veya ilaç uygulanmadı.

Cerrahi işlem öncesinde tüm hayvanların kuyruk venlerinden anestezi altında periferik kan örneği alındı. Bu örnekler 3,000 devirde 5 dakika (dk) boyunca santrifüj edildi. Elde edilen serumlar plastik tüpler içerisinde,  $-20$   $^{\circ}\text{C}$ 'de muhafazaya alındı. Cerrahi uygulanacak hayvanlara genel anestezi verildi, steril ortam sağlandıktan sonra orta hat kesisiyle abdomen açıldı. Karın içi organlar sağa deviyeye edilerek sol renal vene ulaşıldı. Varikösel

oluşturulmak istenen hayvanlarda sol renal ven ve sol spermatik ven birleşim bölgesi serbestlenerek 4/0 ipek sütürlerle gevşek bir düğüm atıldı. Son işlem *sham* grubuna uygulanmadı.

Cerrahiden 45 gün sonra tüm hayvanlara genel anestezi uygulandı. Steril şartlar altında hayvanlarda orta hat insizyonla sol renal ve spermatik venlere ulaşıldı, spermatik venlerdeki dilatasyon kontrol edildi. Takiben bilateral orşiektomi uygulandı. Testisler patolojik inceleme için *Bouine* solüsyonuna konuldu. Orşiektomi sırasında sol vaz deferensler *en bloc* olarak çıkartıldı ve soğuk *Krebs-Henseleit* solüsyonu ([milimol (mmol)] sodyum klorür, 11.82; potasyum klorür, 4.7; magnezyum sülfat, 12; kalsiyum klorür, 2.5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; sodyum bikarbonat, 25; glukoz, 11.1) içerisinde izole organ banyosu sistemine nakledilerek burada izometrik gerim değişiklikleri değerlendirildi.

Yukarıda tarif edilen yöntemle tüm hayvanlardan yeniden periferik venöz kan örnekleri alındı. Hayvanlar yüksek doz anestezi ve dekapitasyon yöntemiyle sakrifiye edildi.

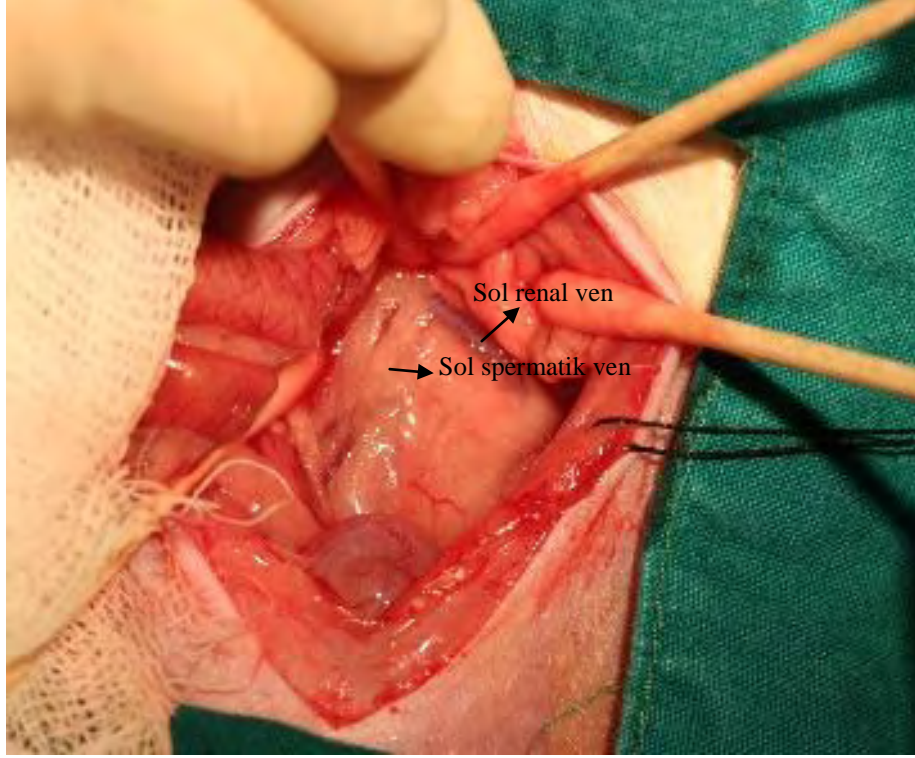
### **3.2. Anestezi**

Deneysel sırasında her türlü cerrahi girişim anestezi altında uygulandı. Bu amaçla deney hayvanlarının cerrahi anestezi derinliğine ulaşması için dissosiyatif anestetik olan ketamin hidroklorür (Alfamine %10, Ege Vet, Türkiye) 50-60 mg/kg intraperitoneal (*i.p.*), sedatif ve düz kas gevşetici olarak ksilazin hidroklorid (Rompun %2, Bayer, Türkiye) 10 mg/kg, (*i.p.*) dozunda uygulandı.

### **3.3 Deneysel Sol Varikosel Modeli Oluşturulması**

Bu çalışmada uygulanan DSV modeli Turner ve arkadaşlarının tanımladığı şekilde sol internal spermatik venin açıldığı yerin medialinde sol renal venin parsiyel daraltılması esasına dayanmaktadır (110). Bu daralma sonrasında ortaya çıkan venöz basınç artışı önce spermatik vene ardından da pampiniform pleksusa yansımaktadır.

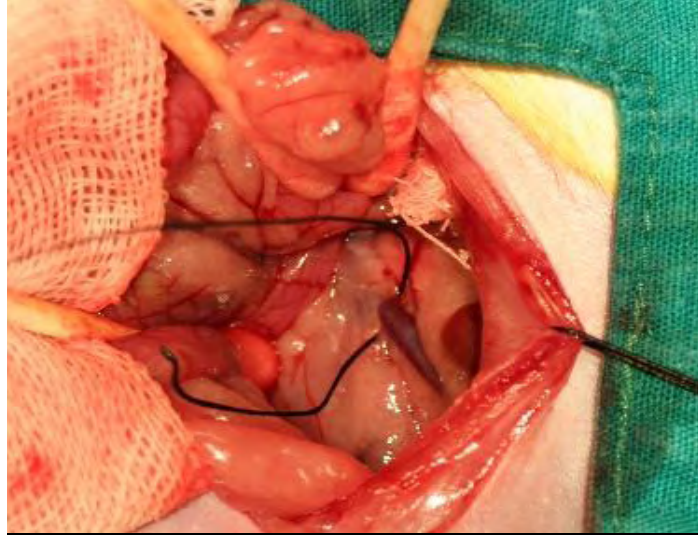
Yukarıda tanımlanan anesteziyi takiben DSV oluşturulacak hayvanların karın bölgesindeki tüyler traş edildi. Hayvanlar supin pozisyonda tespit edildi ve traş edilen bölge %10'luk povidon iyot (Isosol, Merkez Labrotuarı İlaç Sanayi, Türkiye) ile dezenfekte edildi. Orta hat insizyonla karın açıldı ve sol üst kadrana ulaşıldı. Barsaklar sağa deviye edilerek sol böbrek, sol renal ven, sol sürrenal ven ve sol internal spermatic vene ulaşıldı (Şekil 3.1).



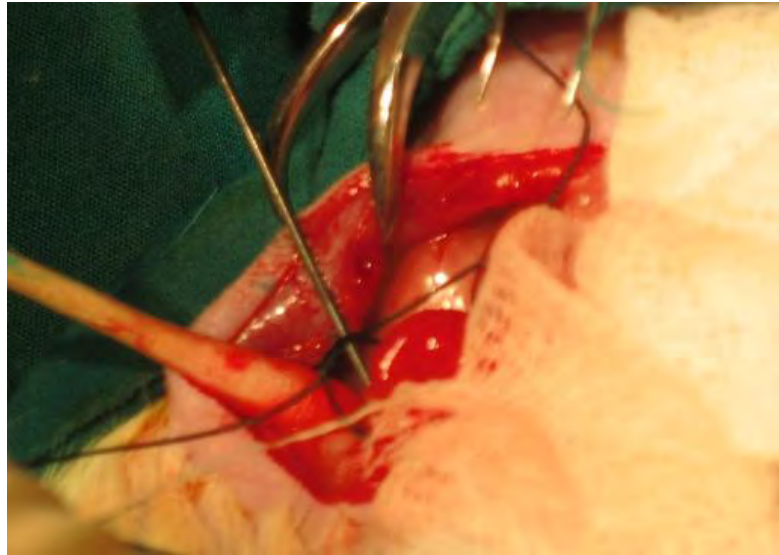
**Şekil 3.1:** Barsakların sağ tarafa deviye edilmesinden sonra sol renal venin ve sol spermatic venin açığa çıkarılması.

Sol spermatic ven, renal ven ve vena kava birleşim alanı tanımlandı. Sol renal ven bu alanda çevre yağ ve bağ dokudan temizlenerek serbestlendi ve venin altından bir tünel oluşturuldu. Sol sürrenal ven ve sol internal spermatic ven lateralde kalacak şekilde 4/0 bir ipek bağlama serbestlenen bu tünelin altından geçirildi (Şekil 3.2). Renal ven üzerine yerleştirilen 0.85 mm çapında küt uçlu bir kılavuz tel üzerinden bu sütür bağlandı (Şekil 3.3).



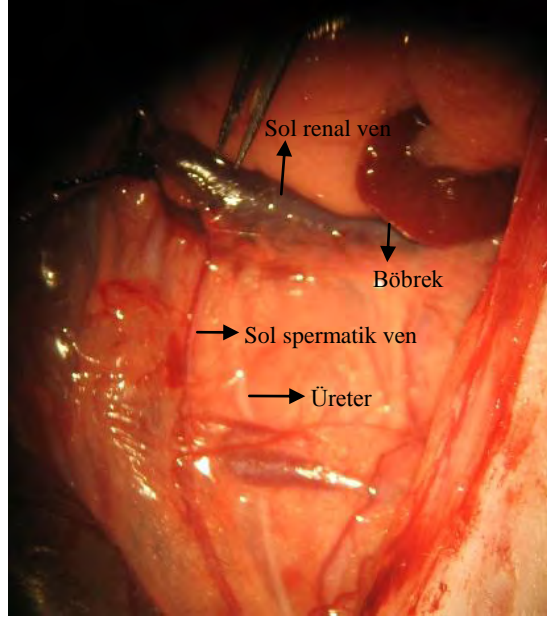


**Şekil 3.2:** Sol renal venin çevre yağ ve bağ dokularından izole edilmesinden sonra altından oluşturulan tünelden sol sürrenal ven ve sol internal spermatik ven lateralde kalacak şekilde 4/0 ipek bağlamının geçirilmesi.



**Şekil 3.3:** Sol renal ven üzerine yerleştirilen 0.85 mm çaplı küt bir kılavuz tel üzerinden daha önce geçirilen sütünün bağlanması.

Metal kılavuz telin dikiş arasından çekilmesinden sonra spermatik venin çapında artış olduğu izlendi (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4:** Sütür bağlandıktan sonra dilate olan sol spermatik ven ve renal ven.

Kanama kontrolü yapıldıktan sonra periton içi 2 ml SF ve gentamisin sülfat (10 mg/ml) ile yıkandı ve karın içi organlar yerleştirildikten sonra 4/0 polipropilen suturele katlar devamlı olarak kapatıldı.

### **3.4 Sham Grubunda Yapılan İşlemler**

*Sham* grubundaki hayvanlara aynı anestezi ve sterilizasyon tekniği sonrasında orta hat laparotomi yapıldı. Batın içi organlar sağa deviye edilerek sol renal vene ulaşıldı. Sol renal ven çevre yağ ve bağ doku elemanlarından serbestlendi. Bu aşamadan sonra renal vene bağlama uygulanmadı. Periton lavajı ve kapatma işlemi yukarıda tarif edilen yöntemle yapıldı.

### **3.5 Cerrahi Sonrasında Uygulanan İşlemler**

Cerrahiden bir gün sonra ilaç uygulanacak hayvanlar hassas terazide yeniden tartılarak ağırlıkları kaydedildi. Orogastrik yoldan 20 mg/kg/gün dozunda spironolakton (Aldactone, 25 mg, Aris İlaç, Türkiye) uygulanmaya başlandı. İki adet spironolakton tablet (25 mg spironolakton ve tatlandırıcı olarak nane içeren); 10 ml su içinde tamamen çözününceye kadar oda sıcaklığında karıştırılarak ilaç içeriği 5 mg/ml olan bir solüsyon hazırlandı. Bu

solüsyondan ilaç dozu 20 mg/kg (=4 ml/kg) olacak şekilde hesaplanan hacim sıçanlara orogastrik yoldan uygulandı. Tartma işlemi her hafta tekrar edilerek uygulanacak solüsyonun hacimleri hayvanların ağırlığına göre güncellendi. İlaç uygulamasına 45 gün devam edildi.

Cerrahiden bir gün sonra DSV grubundaki sıçanlar hassas terazide tartıldı. Hayvanlara orogastrik yoldan 20 mg/kg/gün dozunda ilaç uygulansaydı verilecek hacme eşit hacimde SF uygulandı. Hayvanların ağırlıkları her hafta tartılarak uygulanacak SF hacmi güncellendi. Uygulama 45 gün devam etti.

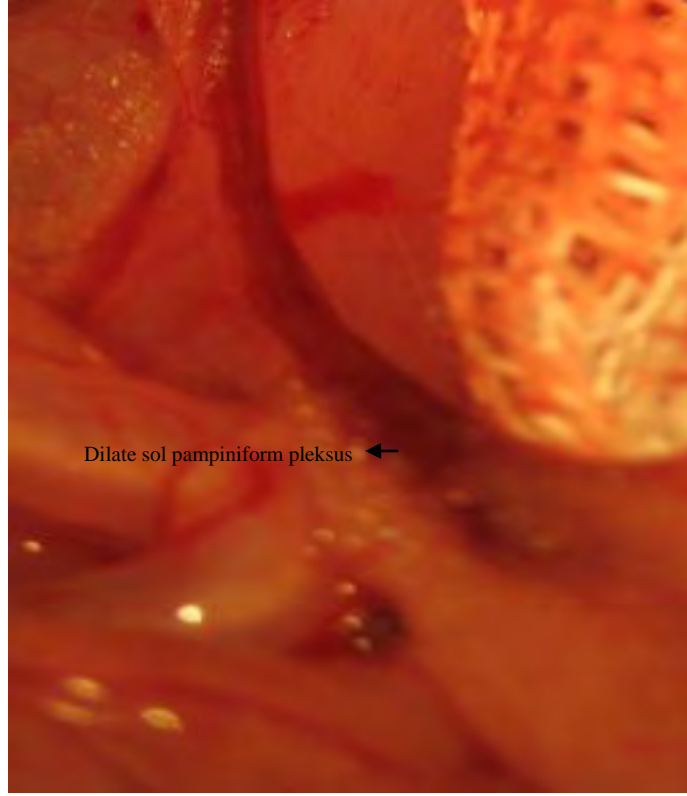
### 3.6 Sakrifikasyon

İlk cerrahiden 45 gün sonra tüm hayvanlara ksilazin 10 mg/kg (*i.p.*) ve ketamin 150 mg/kg (*i.p.*) uygulandı. Hayvanlar supin pozisyonda tespit edildi.

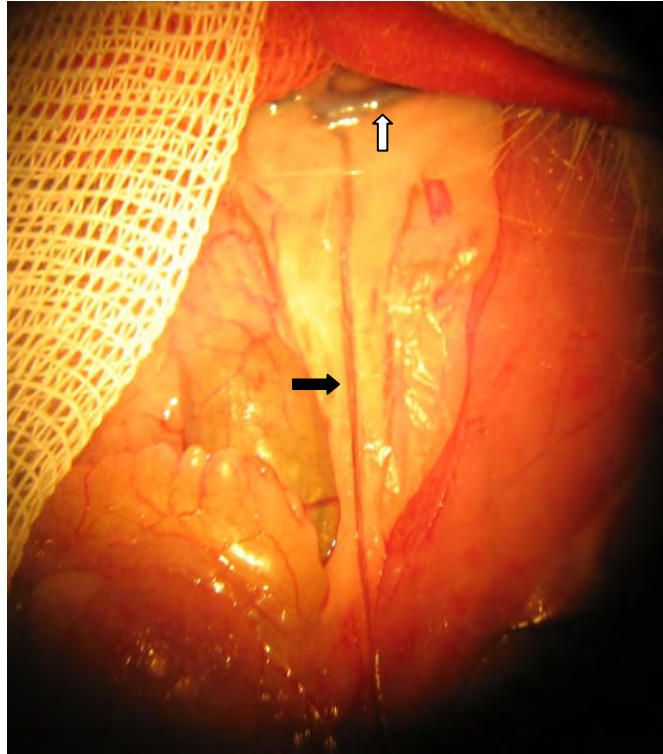
Uygun sterilizasyon ve örtümü takiben orta hat laparotomi uygulandı. Karın içi organlar sağa yatırılarak sol renal vene ulaşıldı. Renal ven ve spermatik ven çapları kontrol edildi. Laparotomi daha da genişletilerek sağ ve sol testis karın içine doğurtuldu. Sağ ve sol testislerin boyutları ve pampiniform pleksus çapları değerlendirildi (Şekil 3.5 ve Şekil 3.6). DSV ve V+S gruplarındaki hayvanlarda sol spermatik venlerin dilate olduğu gözlemlendi (Şekil 3.7).



Şekil 3.5: Sakrifikasyondan hemen önce sağ ve sol testislerin boyutları.

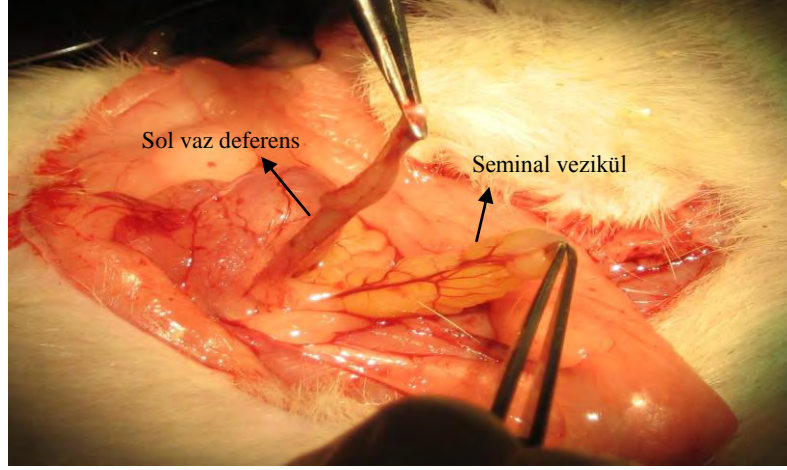


Şekil 3.6: Pampiniform pleksusta dilatasyon.



Şekil 3.7: Dilate sol spermatik venin (siyah ok) sol renal vene (beyaz ok) drene oluşu.

Sağ ve sol testislere spermatik kordon çevresinden klempler konarak tüm hayvanlara sol ve sağ orşiektomi uygulandı. Orşiektomi esnasında sol vaz deferensler testislerden *en bloc* ayrıldı ve içinde soğuk *Krebs-Henseleit* solüsyonu bulunan petri kaplarına alınarak izole organ banyosu için hazırlandı (Şekil 3.8). Testisler ise *Bouine* solüsyonu içinde tamamen gömülecek şekilde flakonlara kondu ve en geç 4 saat içinde parafinle işleme tutularak patolojik inceleme için hazırlandı.



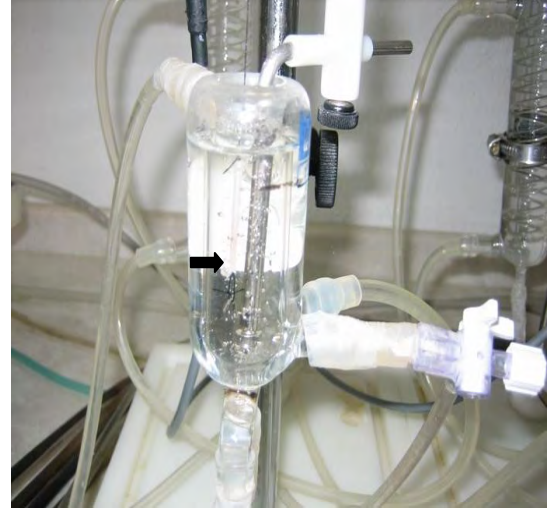
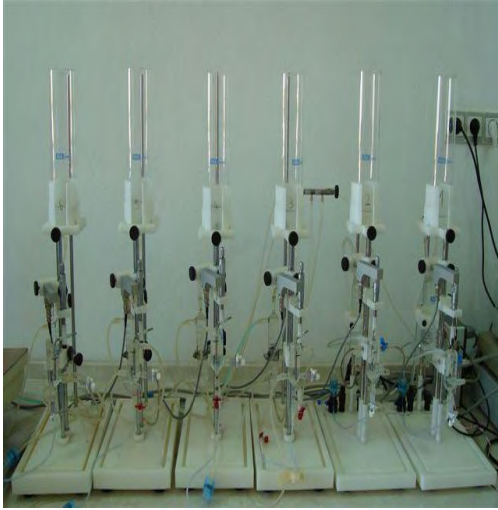
Şekil 3.8: Sol vaz deferensin izole organ banyosu için *en bloc* ayrılması.

Hayvanlar yüksek doz anestezik ve dekapitasyon yöntemiyle dört ardışık gün boyunca her grup için rasgele olacak şekilde her gün 6 sıçan sakrifiye edildi.

### 3.7 İzole Organ Banyosu

Deney hayvanlarından elde edilen vaz deferens dokuları izole organ banyosu sisteminde (BioPac, MP100, MAY, Türkiye) izometrik gerim değişiklikleri açısından karşılaştırıldı.

İzole organ banyosu sistemi, bir ucu sabit, diğer ucu bir transdüra bağlı olan bir dokunun (özellikle düz kas içeren) fizyolojik şartlar altında, çeşitli biyoaktif ajanlara verdiği kasılma, gevşeme gibi izometrik gerim değişikliklerini araştırmaya yönelik bir sistemdir (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9:** Solda izole organ banyosu sistemi ve sağda izole organ banyosunda vaz deferens doku örneği (siyah ok).

Dokular, %95 O<sub>2</sub> + %5 CO<sub>2</sub> karışımı ile sürekli olarak gazlandırılan, sıcaklığı (37 °C) ve pH'sı (7) sabit tutulan *Krebs-Henseleit* solüsyonu ile dolu 10 ml'lik izole organ banyolarına asılarak, kuvvet-yerdeğiştirme transdüsları (FT03) aracılığı ile algılanan izometrik gerim değışiklikleri bir fizyolojik veri toplama ve değeriendirme sisteminde (BioPac, MP100, MAY, Türkiye) analiz edilmek üzere kaydedildi. Optimum yanıtların elde edilmesi amacıyla dokular 1 g dinlenme gerilimi altında 1 saat süresince dinlendirildi. Bu sırada organ banyoları her 15 dk'da bir taze *Krebs-Henseleit* solüsyonu ile yıkandı.

### 3.7.1 In-vitro Deneylerde Uygulanan Test Maddeleri

İzole organ banyosu deneylerinde uygulanan ilaçlar ve uygulandığı konsantrasyonlar aşığıdaki gibidir:

- Fenilefrin (FE) (Sigma, St. Louis, USA):  $\alpha_1$  adreno reseptör agonisti,  $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  Molar (M)
- Prazosin (PZ) (Sigma): Kompetitif  $\alpha_1$  adreno reseptör antagonisti,  $10^{-7}$  -  $3 \times 10^{-4}$  M
- Asetilkolin (ACh) (Sigma): Kolinerjik agonist,  $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M
- Atropin (Sigma): Muskarinik kolinerjik reseptör antagonisti,  $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M
- Serotonin (5-HT) (Sigma): Serotoninerjik agonist  $10^{-7}$  -  $10^{-4}$  M
- Ketanserin (KET) (Sigma): Kompetitif serotonin (5-HT<sub>2a</sub>) reseptör ve  $\alpha_1$  adreno reseptör antagonisti,  $10^{-7}$  -  $3 \times 10^{-4}$  M

İlaçların tamamı distile suda çözünerek hazırlandı. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlar izole organ banyosundaki son konsantrasyonları göstermektedir. Bu amaçla, ilaçlar banyolara mikropipet aracılığı ile mikrolitre ( $\mu\text{L}$ ) düzeyinde eklendi. İlaçlar izole organ banyosuna kümülatif olarak eklendi. İnhibitör ve antagonistler, banyo ortamına agonistlerden 15-30 dk önce eklenerek dokunun antagonistle inkübe olması sağlandı. Farklı ilaç uygulamaları arasında banyolar 5 dk ara ile 3 kez taze *Krebs-Henseleit* solüsyonu ile yıkanarak önceki ilacın dokudan uzaklaştırılması sağlandı.

### **3.8 Deneyler**

Vaz deferens dokusunda kolinerjik, adrenerjik ve serotonerjik kasılma ve gevşeme yanıtlarında DSV modeline bağlı olarak meydana gelen değişiklikler diğer gruplar ile karşılaştırıldı.

#### ***3.8.1 İzometrik Gerim Değişikliği Deneyleri***

Vaz deferens dokularının fenilefrinin ardışık olarak artan logaritmik konsantrasyonlarına verdikleri yanıtlar ile FE konsantrasyon- kasılma eğrileri elde edildi. Dokuların bireysel farklılıklarından doğması muhtemel yanıt değişkenliğini önlemek amacı ile her doku submaksimal FE konsantrasyonu ( $10^{-5}$  M) ile oluşan kasılma yanıtına göre standardize ve normalize edildi.

#### ***3.8.2 Kolinerjik ve Serotoninerjik Yanıtlar***

Vaz deferens dokularında  $10^{-5}$  M FE ile ön-kasılma oluşturulduktan sonra, ACh ve 5-HT ile oluşması muhtemel konsantrasyon-gevşeme yanıtlarının yukarıda belirtilen şekilde standardize edilerek incelenmesi planlandı. Kolinerjik ve serotoninerjik yanıtları incelerken de dokuların bireysel farklılıklarından doğması muhtemel yanıt değişkenliğini önlemek amacı ile her doku submaksimal FE konsantrasyonu ( $10^{-5}$  M) ile oluşan kasılmaya göre standardize edildi (submaksimal FE kasılmasının yüzdesi).

### 3.9 Biyokimyasal Değerlendirme

Deney başlangıcında ve sakrifikasyon sırasında tüm deney hayvanlarından periferik venöz kan örnekleri alındı. Başlangıçta kanlar tüm hayvanlarda periferik kuyruk veninden, sakrifikasyon sırasında ise vena kavadan ve renal venden elde edildi. Elde edilen kanlar 3,000 devirde 5 dk santrifüj edildi ve -20 °C’de saklandı. Biyokimyasal değerlendirme yapılmadan önce rnekler 4 °C’de 1 gün bekletildi.

Sodyum (Na<sup>+</sup>) ve potasyum (K<sup>+</sup>) değerleri iyon selektif elektrot (ISE) yöntemi ile çalışıldı. Örnekler plastik tp (Eppendorf, Almanya) içine otomatik pipet yardımıyla 50 µl hacimde alındı ve otoanalizör cihazında (Moduler otoanalizör, Roche, Almanya) 30 dk bekletildi. Değerler mmol/l cinsinden çalışıldı.

Total testosteron (TT), periferik kan örneğinden *radioimmn assay* (RIA) yöntemiyle (Testo-RIA-CT KIP 1709, Biosource, Belçika) çalışıldı. Serumlar oda sıcaklığında bekletildi ve otomatik çalkalayıcı yardımıyla karıştırıldı. Serum, kalibratörler ve kontroller -fabrikadan kit içinde sunulmaktadır- TT lm için özel olan tüplere 50 µl olacak şekilde otomatik pipet (Eppendorf, Almanya) yardımıyla konuldu. Tüpler her hayvan için ayrı ayrı etiketlendi. Serumların zerine 500 µl iyot<sup>125</sup> TT reaktifi eklendi ve otomatik çalkalayıcı yardımıyla karıştırıldı. Tüpler 37 °C’de 3 saat bekletildi. Bekleme süresi sonrasında tüpler tamamen aspire edildi ve kalibratör, kontrol ve serum içeren tüplerin hepsi 3 ml yıkama solüsyonu ile yıkandı. Tüpler ters çevrildi ve ileri tamamen kurumaya bırakıldı. Tüpler altışarlı gruplar halinde ve randomize olarak gama sayacı (Berthold LB 2111 *gama counter*, Almanya) içerisine kondu ve okutma yapıldı. Sonuçlar 1 dk içinde ± 0.2 hata payı ile ng/ml cinsinden bilgisayar yardımıyla hesaplandı.

### 3.10 Histopatolojik İnceleme

Her hayvandan elde edilen sağ ve sol testisler *Bouine* solüsyonu içinde muhafaza edilerek en geç 4 saat içerisinde parafine gömüldü. Histopatolojik değişimler ışık mikroskopisi, anjiyogenez immünohistokimya (CD31) yöntemleri ile değerlendirildi.



### **3.10.1 Testis ve Germ Hücre Patolojilerinin Değerlendirilmesi**

Testisler *Bouine* solüsyonu içinde muhafaza edilerek en geç 4 saat içerisinde parafine gömüldü. Histopatolojik değerlendirme için sağ ve sol testislerden hazırlanan histolojik kesitler hematoksinen eozin (HE) ile boyandı. Kesitler, Sertoli ve Leydig hücre yapısı ve sayısı, spermatogenez, ödem ve konjesyon açısından değerlendirildi. Histopatolojik olarak saptanan anormallikler/bulgular hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olmak üzere değerlendirildi. Tüm dokular tek ve aynı patolog tarafından incelendi.

HE boyanması için dokular deparafinize edildi. Deparafinizasyon işlemi dokular art arda 2 ayrı ksilen (Birpa, Türkiye) içerisinde 5'er dk bekletildi. Daha sonra, sırasıyla, %96'lık, %75'lik ve %35'lik alkol içerisinde 5'er dk bekletildi. Deparafinize edilen örnekler distile su ile yıkandı. Dokular hematoksinen (Merck, Almanya) ile 7 dk muamele edildi. Hematoksinen sonrasında suda yıkama yapılarak asit alkolde 3 saniye (sn) ve amonyaklı suda 7 sn bekletildi. Bu işlemler arasında örneklere suda yıkama yapıldı. Amonyaklı suda bekletildikten sonra tekrar yıkama yapılarak eozin (Merck, Almanya) içerisinde 5 dk bekletildi. Sonrasında %75'lik alkol ile 2 dk, %96'lık alkolle 3 dk muamele edilerek 2 ayrı ksilen içerisinde 5'er dk bekletildi. Son olarak da *Entellan* (Merck, Almanya) ile lamel kapandı.

Spermatogenezdeki bozulma ayrı ayrı sınıflandırılmadan mikst atrofi (germ hücre tipi ve sayılarında her Sertoli hücresi için ayrı ayrı olacak şekilde azalma) şeklinde *kalitatif* olarak yorumlandı.

İnterstisyel alandaki ve testis içindeki konjesyon bütün olarak değerlendirildi ve ayrı ayrı sınıflandırma yapılmadan *kalitatif* olarak değerlendirildi.

İnterstisyel alanda oluşan ödemin şiddeti de *kalitatif* olarak değerlendirildi ve yukarıda tanımlandığı şekilde sınıflandırıldı.

### **3.10.2 Anjiyogenezin Değerlendirilmesi**

Her örnekteki anjiyogenezin derecesi HE ile boyanan mikrodamarların sayılmasıyla değerlendirildi. Her örnekte en yüksek damarlanma seviyesine sahip üç alan küçük

büyütmede (x100) tanımlandı. Daha sonra seçilen bölgelerde intertübüler interstisyel bağ dokudaki damarların sayısı büyük büyütmede (x400) sayıldı. Her testis için en yüksek değer mikrodamar yoğunluğu (MDY) olarak not edildi. Sadece düzgün lümeni olan veya belirgin damarsal yapıya sahip olan oluşumlar mikrodamar olarak kabul edildi. MDY, her iki testiste ve her sıçanda ayrı ayrı değerlendirilerek hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olmak üzere *kalitatif* olarak skorlandı.

Anjiyogenezin gösterilmesi için CD31 (Rabbit Pab, RB-10333-PO, 100 µL, Neomarkers, ABD) ile immunohistokimyasal boyama yapıldı. HE boyamasında olduğu gibi deparafinize edilen dokular, 20 dk kadar EDTA tamponu (Labvision, ABD) ve distile su (1:9 oranında olacak şekilde) ile *antijen retrieval* yöntemine tabi tutuldu. Oda sıcaklığında 20 dk soğutmaya bırakıldıktan sonra distile su ile yıkama yapıldı. Dokular hidrojen peroksit içerisinde 20 dk bekletildi. Fosfat *buffer* salin (PBS) (Labvision, ABD) içerisinde 10 dk bekletildi. Daha sonra Ultra V (Labvision, ABD) ile 5 dk bloklama yapıldı. Dokular yıkanmadan PBS ile 1/50 dilüe edilmiş CD31 antikor damlatıldı ve 2 saat beklendi.

Daha sonra dokular yıkandı ve 15 dk biotin (Labvision, ABD) damlatıldı. Dokular 3'er kere ayrı ayrı PBS ile 5'er dk yıkandı ve 15 dk streptavidin peroksidaz (Labvision, ABD), damlatıldı. PBS ile tekrar yıkama sonrasında AEC kromojen (Labvision, ABD) ile 10 dk muamele edildi. Distile suda yıkandıktan sonra 10 sn hematoksilen ile muamele edildi ve çeşme suyunda yıkama yapıldı. Dokular kurutulduktan sonra Vision mount (Labvision, ABD) ile lamel kapatıldı.

### **3.11 İstatistiksel Analiz**

Veriler ortalama ve ortalamanın standart hatası olarak belirlendi. Bu verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism Versiyon 4.0 (GraphPad Software Inc., USA) paket programı ile gerçekleştirildi (111).

İzole organ banyosu verileri parametrik test varsayımlarını sağlıyorsa iki yönlü varyans analizi ve gerekiyorsa ardından *post hoc* Bonferroni testi ile değerlendirildi. Parametrik varsayımları sağlamayan koşullarda Kruskal-Wallis varyans analizi ve gerekiyorsa ardından Dunn testi uygulandı.

Biyokimyasal verilerin incelenmesinde parametrik test olarak tek yönlü *ANOVA* ile gruplar arasında farklılık tespit edilmesi durumunda, farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek üzere “*post hoc*” Bonferroni testi uygulandı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak önemli kabul edildi. İkili karşılaştırmalar için (örneğin, aynı grubun bazal ve uygulamalardan sonraki değerlerinin karşılaştırılması) “eşleştirilmiş veriler için iki uçlu t-testi” kullanıldı.

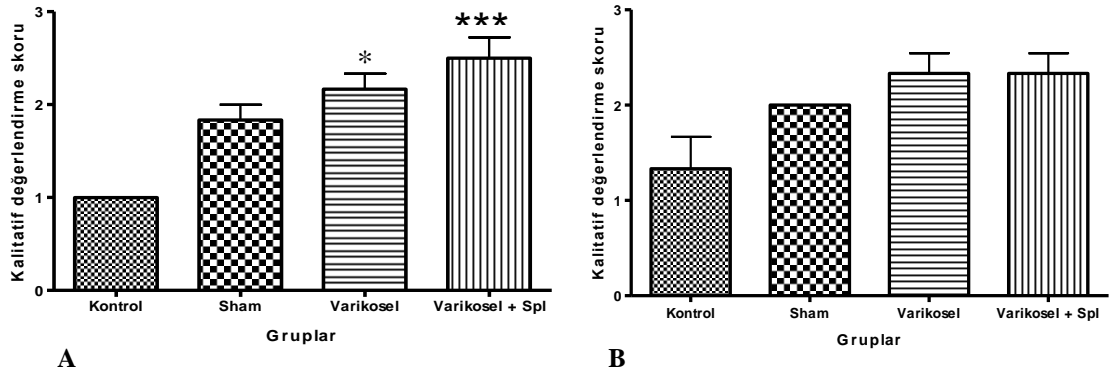
Özellikle histopatolojik bulguların incelenmesinde non parametrik test olarak Kruskal-Wallis varyans analizi ile gruplar arasında farklılık tespit edilmesi durumunda, farklılığın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek üzere “*post hoc*” Dunn testi uygulandı.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak önemli kabul edildi (111).

## 4. BULGULAR

### 4.1 Histopatolojik Değerlendirme

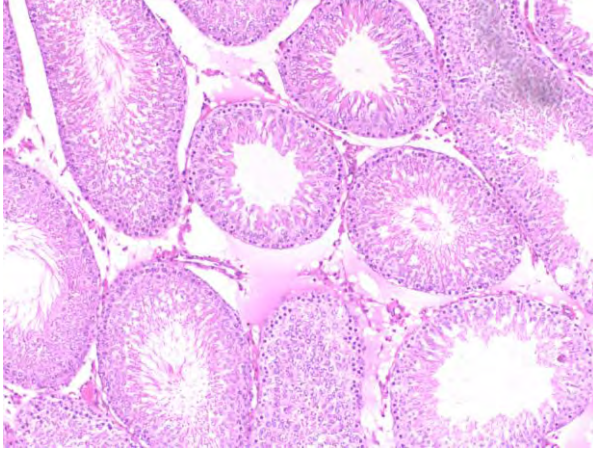
#### 4.1.1 Testis ve Germ Hücre Patolojileri

Spermatogenezdeki bozulma sol ve sağ testisler arasında fark gösterdi. Solda, DSV ve V+S gruplarında saptanan bozulma kontrol ile karşılaştırıldığında daha fazlaydı (sırasıyla,  $p < 0.05$  ve  $p < 0.001$ ) (Şekil 4.1).

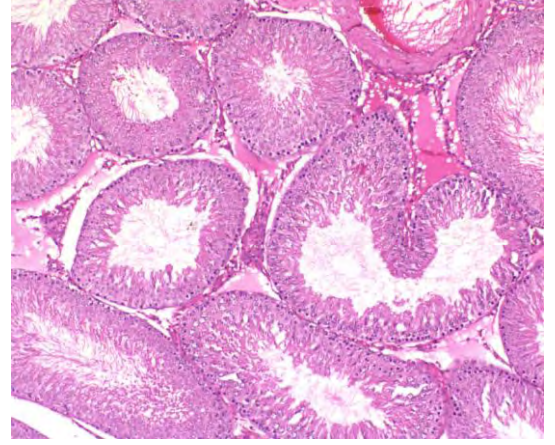


**Şekil 4.1:** Sıçanlarda uygulamalardan sonra izole edilen sol (A) ve sağ (B) testis dokularında *kalitatif* olarak değerlendirilen *mikst atrofi*. Sütunlar aritmetik ortalamaları, çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir (her biri için n= 6)  
\* $p < 0.05$   
\*\*\* $p < 0.001$   
Spl= spironolakton

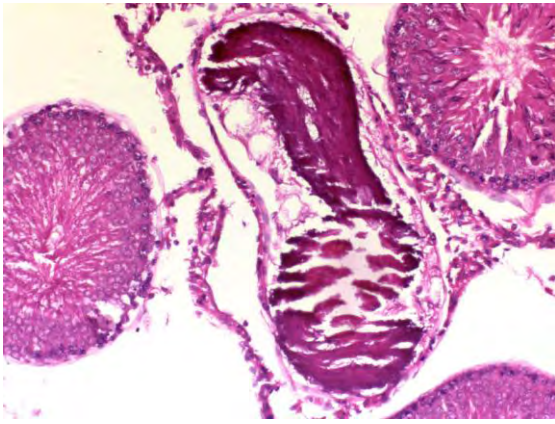
Spermatogenezdeki bozulma germ hücrelerinin yapısında bozulma ve sayısında azalma şeklindeydi (Şekil 4.2). Bu durum DSV ve V+S gruplarında kontrol grubuna göre belirgindi (sırasıyla,  $p < 0.05$  ve  $p < 0.001$ ). Bu bulgular, SPL'un diğer etkilerinden kaynaklanmıyorsa (antiandrojenik, antimineralokortikoid, vb), anjiyogenezin koruyucu etkisi olduğunu düşündürmektedir.



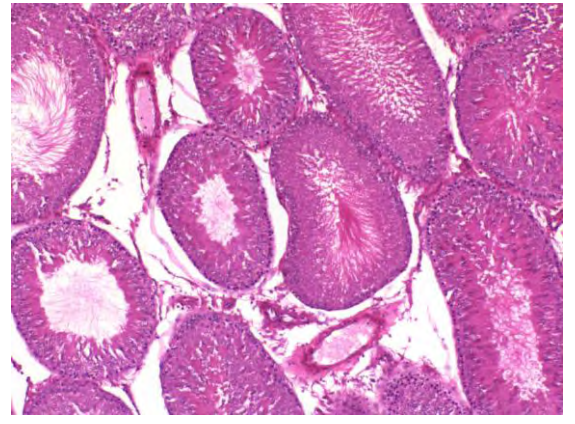
**A**



**B**



**C**

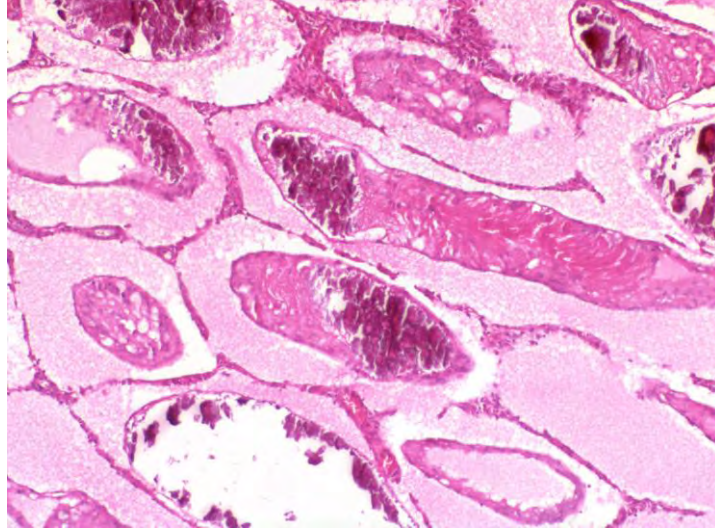


**D**

**Şekil 4.2:** Sıçan sol testislerinde spermatogenezde değişik derecelerde bozulmalar ve seminifer tübül yapılarının ışık mikroskopisi bulguları.

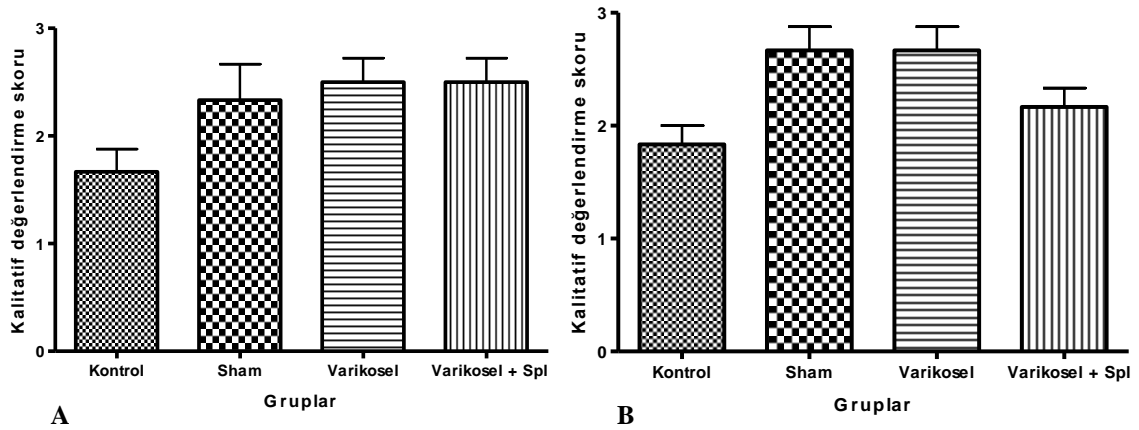
- A. Belirli aşamalarda spermatogenez durmuş (DSV grubu)
- B. Çoğunlukla normal yapıda izlenen tübüllerde spermatogenezin çeşitli aşamalarında izlenebilen germ hücreleri (Kontrol grubu)
- C. Seminifer tübülde kalsifikasyon (V+S grubu)
- D. Normal spermatogenik aktiviteye sahip hücreler yanında aktivite izlenmeyen seminifer tübüller (*Sham* grubu)

DSV grubunda sadece bir sıçanda sol testiste belirgin atrofi mevcuttu ve spermatogenez ve testiküler doku ileri derecede bozulmuştu (Şekil 4.3).



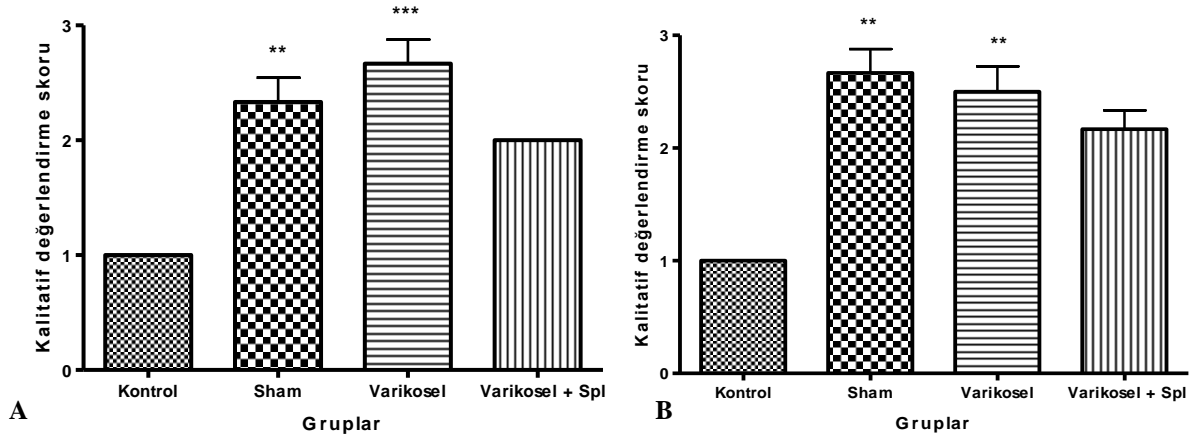
**Şekil 4.3:** Sıçan sol testisinde seminifer tübülde yaygın kalsifikasyon alanlarının ışık mikroskopisi görüntüsü (DSV grubu).

Her iki testiste de ödem açısından gruplar arasında fark yoktu (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4:** Sıçanlarda uygulamalardan sonra izole edilen sol (A) ve sağ (B) testis dokularında *kalitatif* olarak değerlendirilen ödem. Sütunlar aritmetik ortalamaları, çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir (her biri için n= 6). Spl= spironolakton

Konjesyon açısından değerlendirildiğinde sol testiste *sham* ve DSV grubunda belirgin farklılık vardı, ancak bu durum DSV grubunda daha belirgindi (sırasıyla,  $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$ ). Sağ testiste de *sham* ve DSV gruplarında belirgin konjesyon mevcuttu ancak DSV grubundaki konjesyon sağ testiste daha azdı ( $p < 0.01$ ). Oysa, V+S grubunda konjesyon açısından ne sağ ne de sol testiste kontrol grubuna göre fark vardı (Şekil 4.5). Bu durum SPL'un anjiyogenezi inhibe etmesine bağlı olabilir.

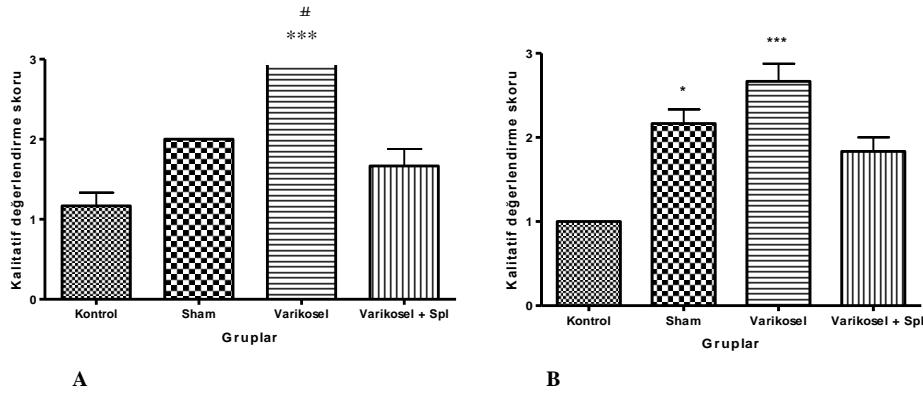


**Şekil 4.5:** Sıçanlarda uygulamalardan sonra izole edilen sol (A) ve sağ (B) testis dokularında *kalitatif* olarak değerlendirilen konjesyon. Sütunlar aritmetik ortalamaları, çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir (her biri için n= 6). Spl= spironolakton  
\*\* p< 0.01  
\*\*\* p< 0.001

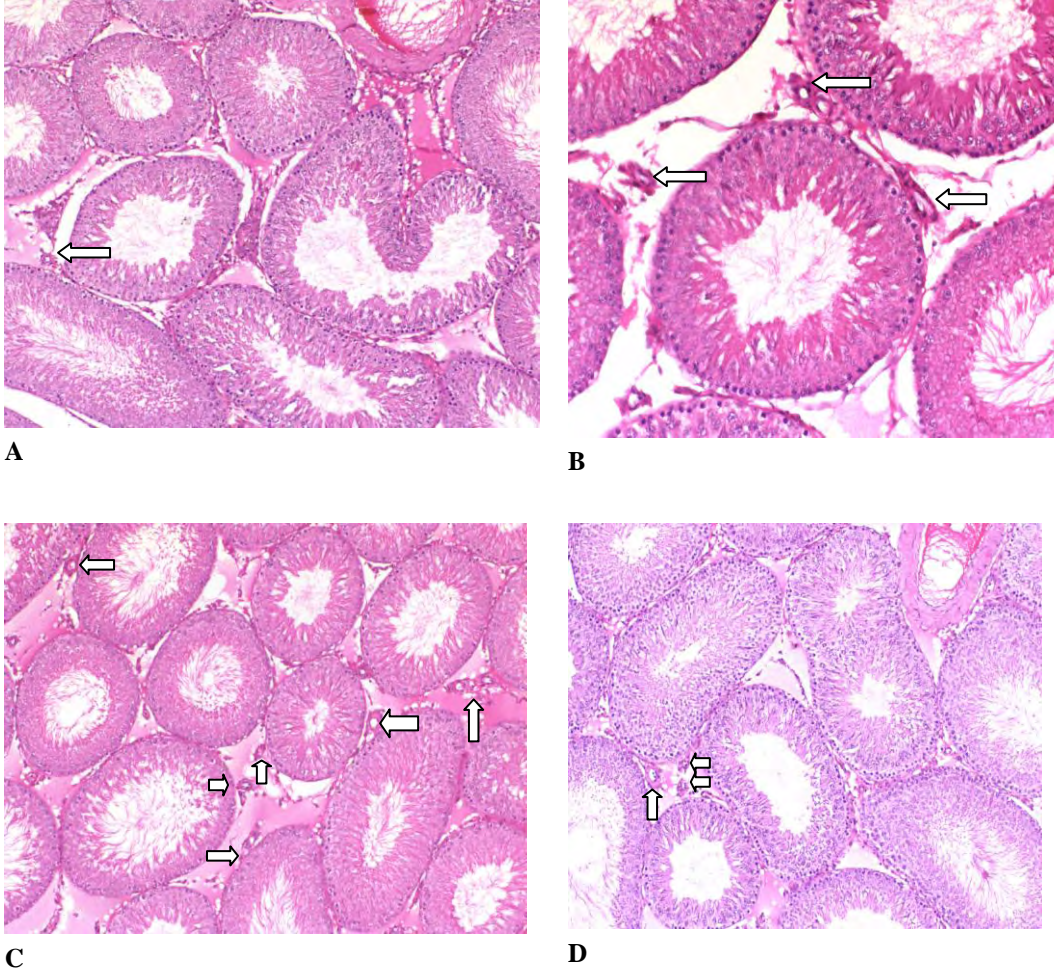
#### 4.1.2 Anjiyogenez

V+S grubunda MDY açısından her iki testiste de kontrol grubuna göre fark yoktu. Bunun yanında, sol testiste MDY, DSV grubunda kontrol grubu (p< 0.001) ve V+S grubuna göre (p< 0.05) anlamlı derecede artmıştı (Şekil 4.6).

Sağ testiste MDY, DSV (p< 0.001) ve sham grubunda (p< 0.05) kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazlaydı (Şekil 4.6, Şekil 4.7).



**Şekil 4.6:** Sıçanlarda uygulamalardan sonra izole edilen sol (A) ve sağ (B) testis dokularında *kalitatif* olarak değerlendirilen MDY. Sütunlar aritmetik ortalamaları, çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir (her biri için n=6). Spl= spironolakton  
# DSV vs V+S (p< 0.05)  
\* sham vs kontrol (p< 0.05)  
\*\*\* kontrol vs DSV (p< 0.001)



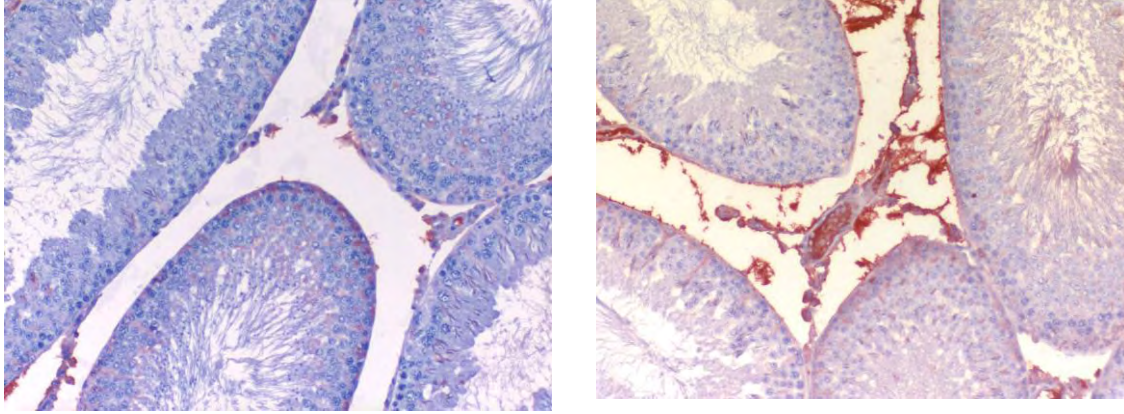
**Şekil 4.7:** Sıçan sol testislerinde mikrodamar yoğunluklarının ışık mikroskopisi bulguları.

- A. Kontrol grubu
- B. *Sham* grubu
- C. DSV grubu
- D. V+S grubu

#### **4.1.3 İmmünohistokimyasal Boyamalar**

CD31 ile yapılan immünohistokimyasal boyamada DSV grubunda diğer 3 grupta karşılaştırıldığında anlamlı fark vardı ( $p < 0.01$ ) (Şekil 4.8).





A

B

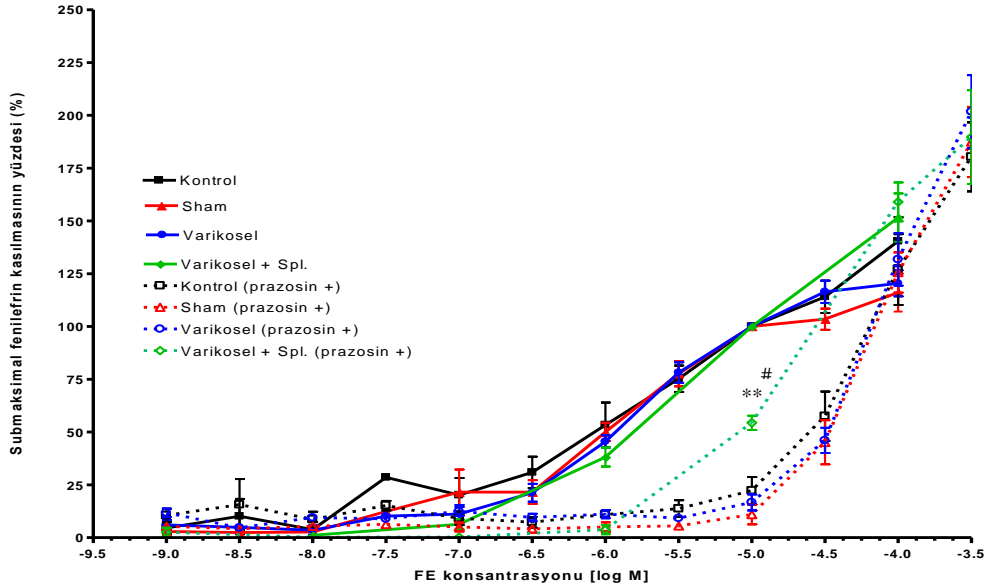
**Şekil 4.8:** Sıçan sol testislerinde, ışık mikroskopisi altında, CD31 ile immünohistokimyasal olarak anjiyogenezin gösterilmesi.

A. CD 31 ile boyanmanın daha az olduğu damarlar  
B. CD 31 ile boyanmanın daha fazla olduğu damarlar

## 4.2 İzole Organ Banyosu Deneyleri

### 4.2.1 Fenilefrin Yanıtları

Fenilefrin (FE) ile oluşan konsantrasyon-kasılma eğrileri incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi (Şekil 4.9).



**Şekil 4.9:** Deneysel gruplarında sıçan izole vaz deferens dokusunda fenilefrinle oluşan konsantrasyona bağımlı izometrik kasılmaların (düz çizgiler)  $\alpha_1$  adrenoseptör antagonisti prazosin ile inhibisyonu (kesikli çizgiler).

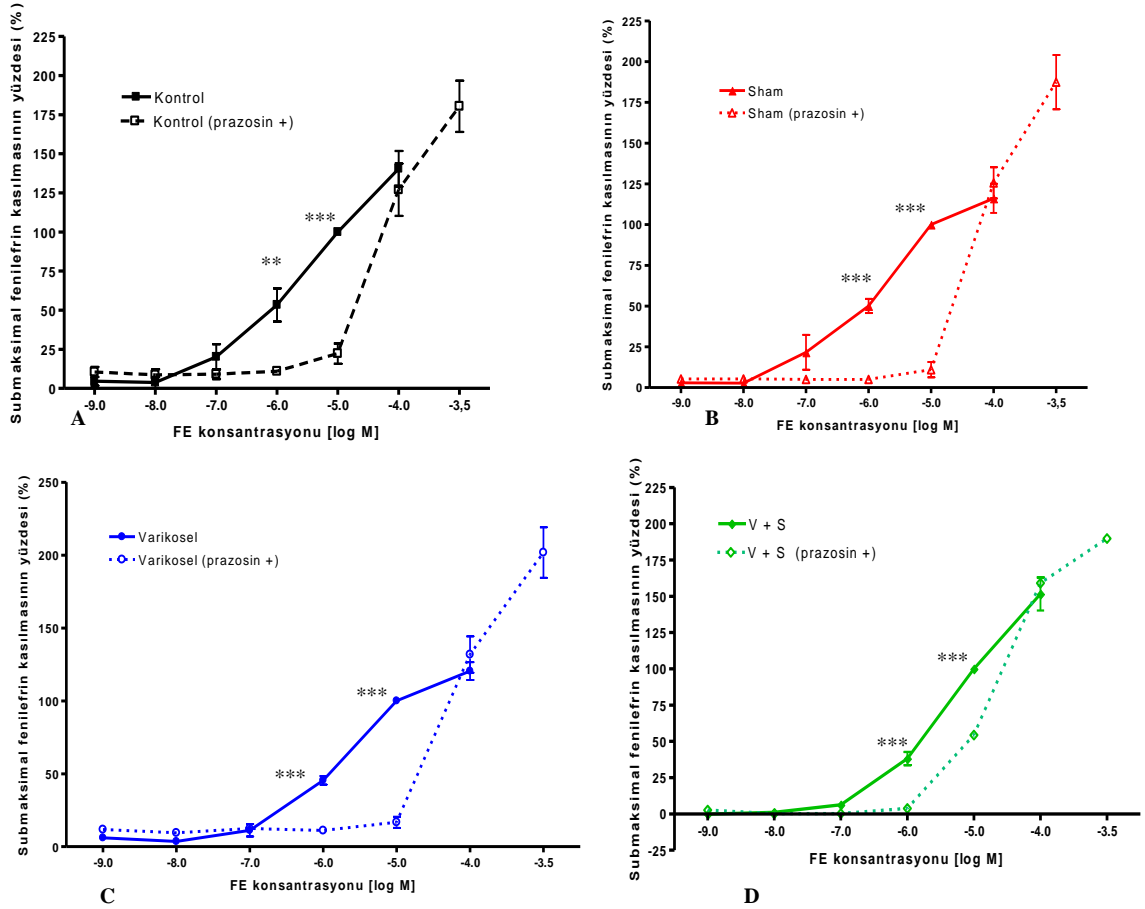
Çubuklar ortalamasının standart hatasını göstermektedir.

# V+S vs DSV ( $p < 0.05$ )

\*\* V+S vs sham ( $p < 0.01$ )

Spl= spironolaktan

Alfa-1 adrenoseptör antagonisti prazosin varlığında FE ile oluşan konsantrasyon-kasılma eğrileri sağa kaydı (Bkz. Şekil 4.9, Şekil 4.10). “Sağa kayma” doz-yanıt (konsantrasyon-yanıt) eğrisinin paralel olarak sağa kaymasını ve aynı yanıtın elde edilmesi için gereken ilaç dozunun (konsantrasyonunun) daha yüksek olması gerektiğini, bir başka deyişle inhibisyonu ifade etmektedir (Şekil 4.9). Maksimum etki düzeyine değışme yapmadan oluşan bir sağa kayma kompetitif antagonizmanın göstergesidir. Burada da beklendiği gibi prazosin kompetitif olarak FE ile oluşan konsantrasyon kasılma eğrilerini sağa kaydırđı.



**Şekil 4.10:** Kontrol (A), sham (B), varikösel (C) ve varikösel+spironolakton (D) gruplarında sıçan izole vaz deferens dokusunda fenilefrinle oluşan konsantrasyona bağımlı izometrik kasılmaların (düz çizgiler)  $\alpha_1$  adrenoseptör antagonisti prazosin ile inhibisyonu (kesikli çizgiler). Çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir.

\*\* p< 0.01

\*\*\*p< 0.001

V+S= varikösel + spironolakton grubu

Prazosinin,  $10^{-5}$  M FE ile oluşan kasılma yanıtları üzerindeki inhibitör etkisi V+S grubunda, sham ve DSV gruplarına göre daha azdı (sırasıyla, p< 0.01 ve p< 0.05). Gruplar

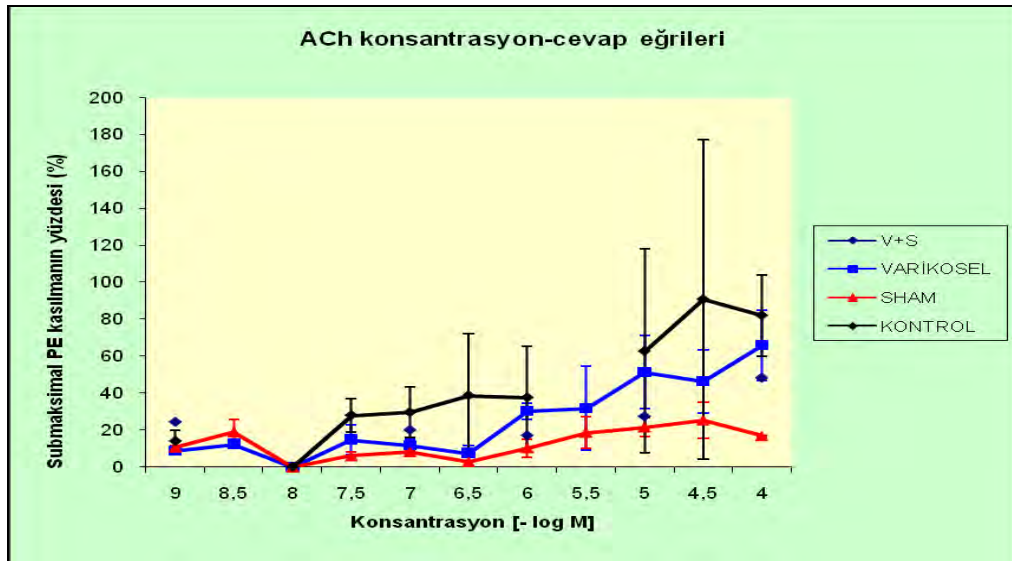
$\alpha_1$  adrenoseptör antagonizması açısından incelendiğinde, benzer şekilde ve tüm gruplarda, özellikle  $10^{-6}$ -  $10^{-5}$  M FE konsantrasyonlarında belirgin fark bulundu (Bkz. Şekil 4.10). SPL ön tedavisinin DSV grubundaki PZ'e bağlı sağa kaymayı nispeten azaltma eğilimi anlamlı olmasa da dikkat çekici bulundu.

#### 4.2.2 Asetilkolin Konsantrasyon- Yanıtları

Vaz deferens dokularındaki ACh yanıtları gruplar arasında geniş dağılım göstermekteydi. Çalışılan dokuların büyük bir bölümünde ekzojen ACh uygulamasına yanıt alınamadı. Bu yüzden yanıt alınamayan dokularda antagonist uygulaması yapılmadı.

Elde edilen sonuçlar istatistiksel değerlendirme için yeterli değildi. Bu yüzden DSV modelimizde vaz deferensteki ACh yanıtlarının standart olmaması gerekçesiyle bu parametre değerlendirmeye alınmadı.

ACh ile elde edilen konsantrasyon – yanıt eğrileri şekil 4.11'de gösterilmiştir.

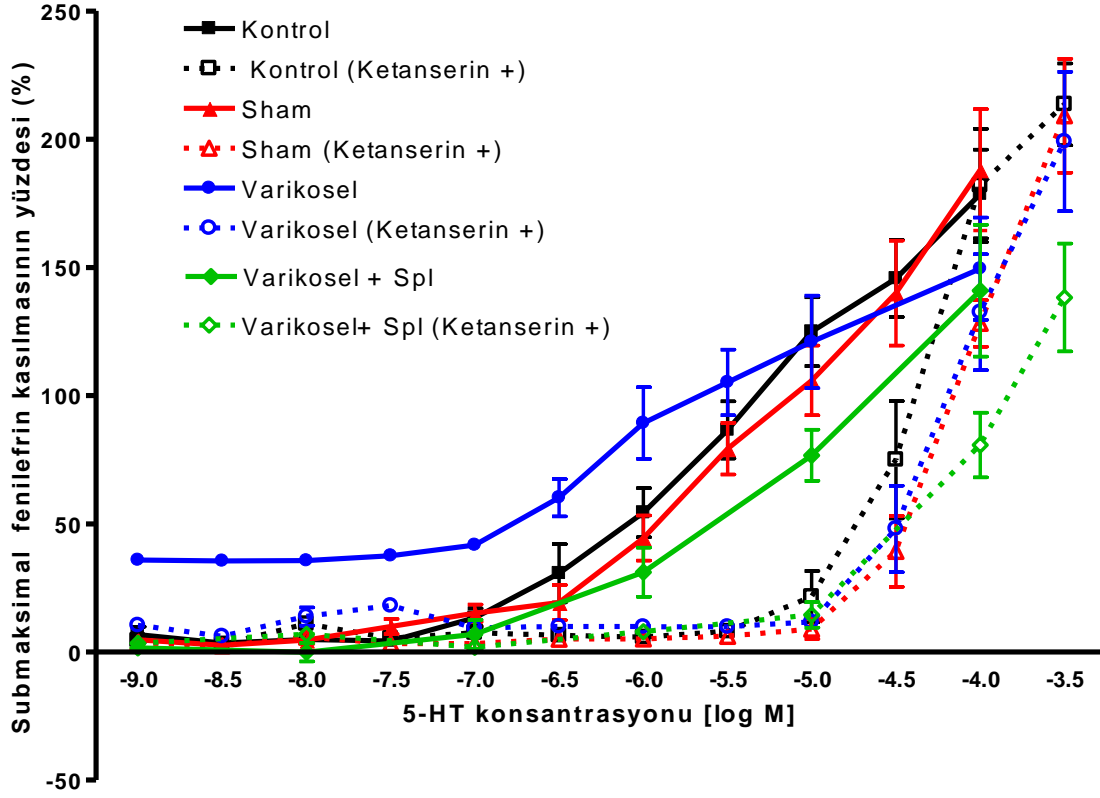


Şekil 4.11: Sıçan izole vaz deferens dokusunda ACh konsantrasyon-cevap eğrileri. Çubuklar ortalamasının standart hatasını göstermektedir.

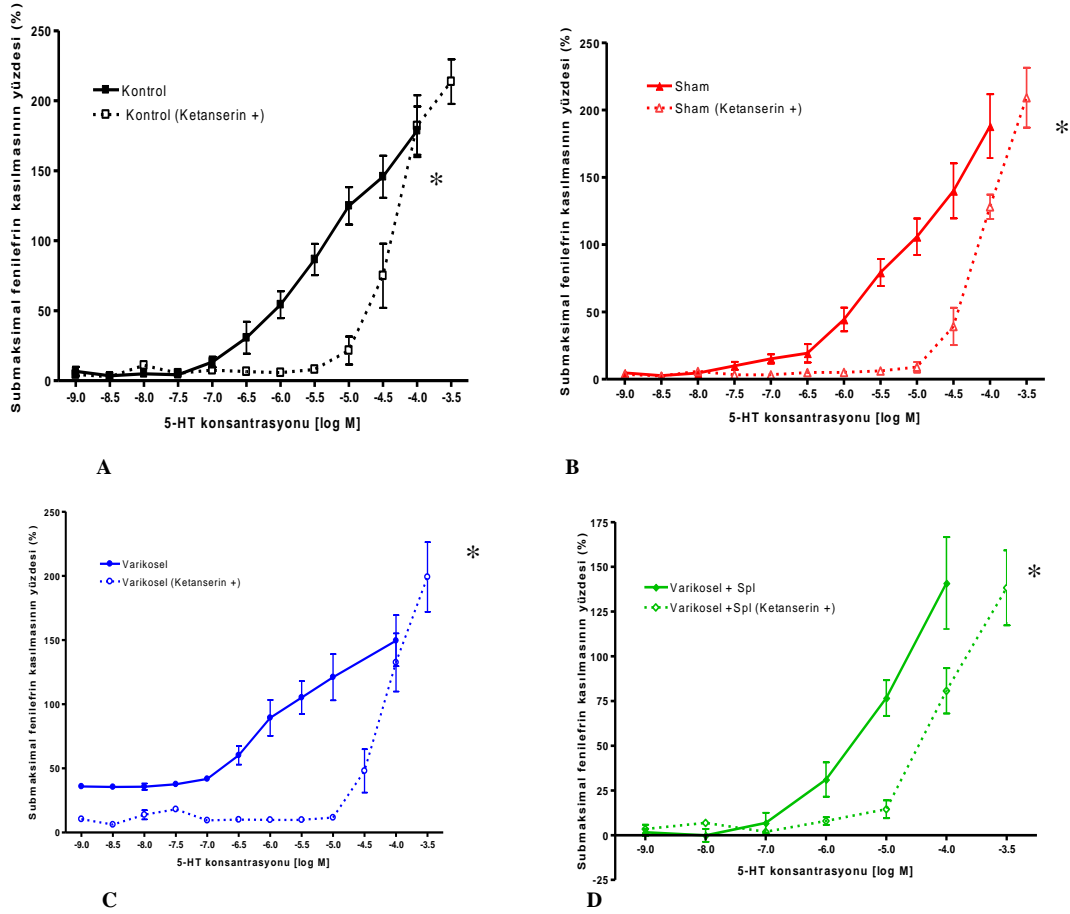
#### 4.2.3 Serotonin Konsantrasyon- Yanıtları

5-HT yanıtları açısından kontrol ve V+S grupları arasında  $10^{-4}$  M konsantrasyonda fark vardı ( $p < 0.05$ ). Serotonin konsantrasyon yanıt eğrileri şekil 4.12'de gösterilmiştir. KET

varlığında eğrinin sağa kaydığı ve maksimum cevaba ulaşmak için gereken konsantrasyonların her grupta arttığı görüldü (Şekil 4.13).



Şekil 4.12: Deney gruplarında sıçan izole vaz deferens dokusunda serotonine bağlı izometrik kasılmaların (düz çizgiler) 5-HT<sub>2a</sub> ve  $\alpha_1$  adrenoseptör antagonisti ketanserin ile inhibisyonu (kesikli çizgiler). Çubuklar ortalamanın standart hatasını göstermektedir. Spl= spironolakton



**Şekil 4.13:** Kontrol (A), sham (B), varikozel (C) ve varikozel + spironolakton (D) gruplarında; sıçan izole vaz deferens dokusunda serotonine oluşan konsantrasyona bağımlı izometrik kasılmaların (düz çizgiler) 5-HT<sub>2a</sub> ve  $\alpha_1$  adreseptör antagonisti ketanserin ile inhibisyonu (kesikli çizgiler) Çubuklar ortalamamın standart hatasını göstermektedir.  
\* p< 0.05  
Spl= spironolakton

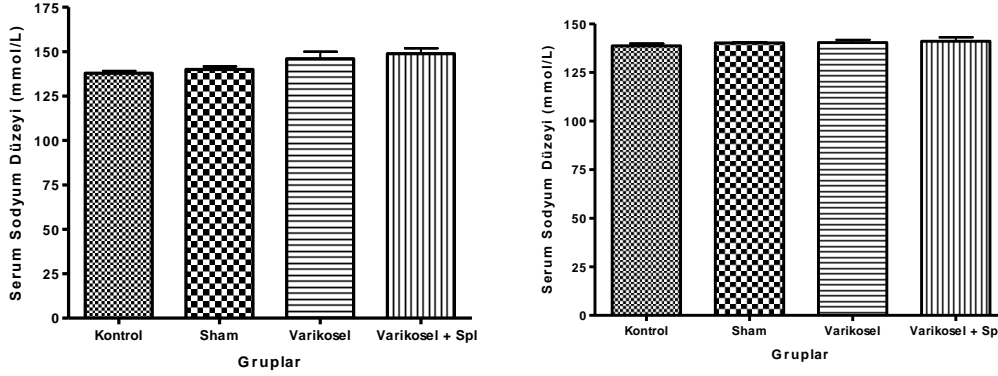
KET uygulaması ile 5-HT'in konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları tüm gruplarda inhibe oldu. Konsantrasyon-yanıt eğrilerindeki sağa kaymaların paterni incelendiğinde kontrol ve sham gruplarının benzer olduğu gözlemlendi. DSV grubunda ise inhibisyon daha belirgindi. SPL uygulaması bu grupta diğer gruplardan farklı bir paterne neden oldu. KET uygulamadan önceki ve sonraki 5-HT konsantrasyon-yanıt eğrileri tam olarak paralel seyretti ancak maksimum etki elde edilemedi (Bkz. Şekil 4.13).

KET sonrasında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında  $10^{-4}$  M konsantrasyondaki 5-HT cevaplarında sham (p< 0.01), DSV (p< 0.01) ve V+S grupları (p< 0.001) arasında fark vardı.

### 4.3 Biyokimyasal Değerlendirme

#### 4.3.1 Serum Na<sup>+</sup> Değerleri

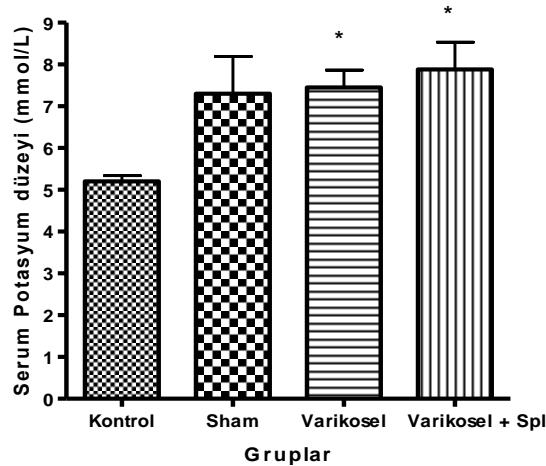
Başlangıçta (bazal) ve sakrifikasyon sonrasında serum Na<sup>+</sup> değerleri açısından grup içi ve gruplar arasında fark yoktu (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: Sıçanlarda bazal (A) ve uygulamalardan sonra (B) ölçülen serum Na<sup>+</sup> düzeyleri. Sütunlar aritmetik ortalamaları, çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir (her biri için n= 6). Spl= spironolakton

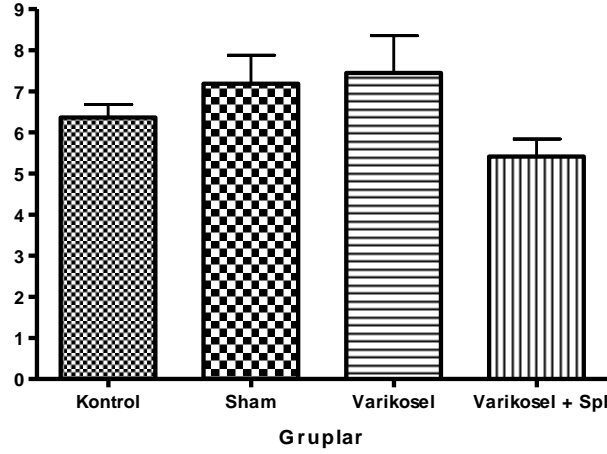
#### 4.3.2. Serum K<sup>+</sup> Değerleri

Başlangıçtaki (bazal) K<sup>+</sup> seviyeleri açısından kontrol grubuyla karşılaştırıldığında DSV ve V+S gruplarındaki değerler daha yüksekti (p< 0.05) (Şekil 4.15).

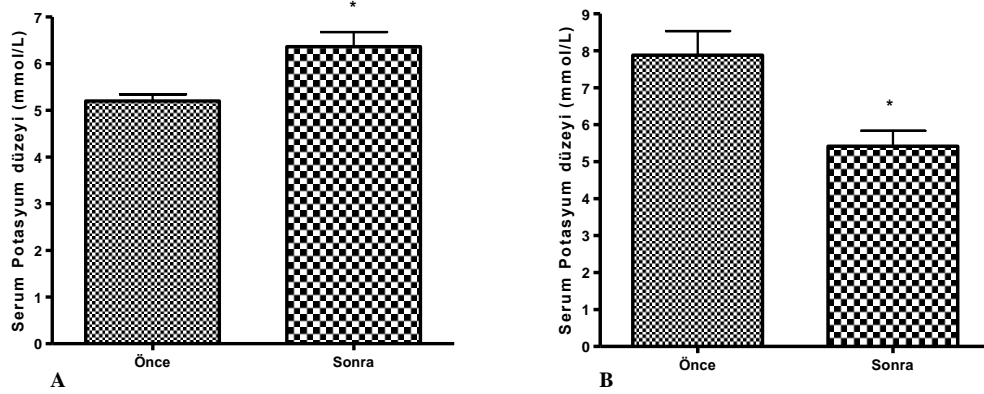


Şekil 4.15: Sıçanlarda bazal serum K<sup>+</sup> düzeyleri. Sütunlar aritmetik ortalamaları, çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir (her biri için n= 6). Spl= spironolakton \* p< 0.05

Çalışma sonunda gruplar arasında potasyum değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (Şekil 4.16). Buna karşılık potasyum değerlerinde kontrol grubunda yükselme ( $p < 0.05$ ), V+S grubunda ise azalma olduğu gözlemlendi ( $p < 0.01$ ) (Şekil 4.17).



**Şekil 4.16:** Sıçanlarda uygulamalardan sonra serum  $K^+$  düzeyleri. Sütunlar aritmetik ortalamaları, çubuklar ortalamasının standart hatasını temsil etmektedir (her biri için  $n=6$ ). Spl= spironolakton



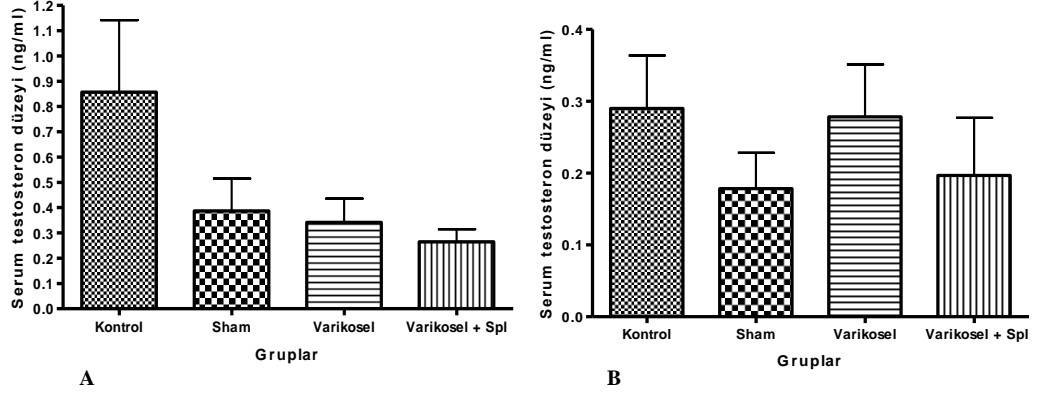
**Şekil 4.17:** Kontrol (A) ve varikösel+spironolakton (B) gruplarında bazal ve uygulama sonrası serum  $K^+$  düzeyleri. Sütunlar aritmetik ortalamaları, çubuklar ortalamasının standart hatasını temsil etmektedir (her biri için  $n=6$ ). Spl= spironolakton  
\*  $p < 0.05$

#### 4.3.3 Serum Total Testosteron Değerleri

Başlangıçtaki (bazal) ve uygulamalardan sonraki (son) serum TT değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık izlenmedi. Grup içi TT düzeyindeki

değişiklikler çift uçlu eşleştirilmiş t-testi ile değerlendirildi ve istatistiksel olarak fark saptanmadı.

Şekil 4.18'de başlangıç ve son serum TT değerleri gösterilmiştir.



**Şekil 4.18:** Sıçanlarda bazal (A) ve uygulamalardan sonra (B) ölçülen serum TT düzeyleri.

Sütunlar aritmetik ortalamaları, çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir (her biri için n= 6).

Spl= spironolakton



## 5. TARTIŞMA

Literatüre bakıldığında DSV modeli için en sık kullanılan tür sıçandır. İnsanlarda yapılan çalışmalarda sağ ile sol testiküler ven arasındaki %55 oranında gösterilen anastomozlar sıçan çalışmalarında gösterilememiştir (110, 112). İstisnalar olmakla birlikte, deney hayvanlarında spontan varikozel oluşumu da genellikle gözlenmemektedir. Bununla beraber, sıçanlarda insan ile benzer olarak testisin primer drenaj yolunun “internal spermatik ven” ve sekonder drenaj yolunun “internal iliak ven” olması bu çalışmalarda neden en fazla sıçan kullanıldığını açıklamaktadır. Bu çalışmalarda oluşturulan varikozelin ani başlangıçlı olması, iyatrojenik olarak oluşturulması ve zaman sınırlılığına bağlı olarak değişken özellikler göstermesi bazı kısıtlılıkları da beraberinde getirmektedir. Genellikle erişkin dönemdeki hayvanlarda yapılan bu çalışmalar varikozelin adölesan dönemden başlayıp giderek artan ve süreğen etkisini tam olarak ifade edememektedir.

Bu bilgiler ışığında, buradaki çalışmada Turner’ın tanımladığı DSV modeli kullanıldı (110). Bu yöntem findikkıran fenomenini taklit etmek esasına dayanmaktadır. Turner erişkin, iri Sprague-Dawley sıçanlarda (450-550 g) yaptığı çalışmalarda renal vende 0.85 mm çapta oluşturulacak bir darlığın kritik olduğunu belirtmiştir. Daha büyük çaplı daralmalar renal vende tam daralma oluşturacak ve böbrek nekrozuna neden olacaktır. Daha az çaplı daralmalarda ise renal vendeki basınç artışı DSV oluşturmak için yetersiz kalacaktır. Bizim çalışmamızda -yakın ırk olan *Wistar Albino* sıçanlarda- hiçbir hayvanda renal nekroz gözlenmemiştir. Cerrahi sırasında abdominal sol spermatik venin incelenmesi ve belirgin olarak gözlenen kollaterallerin bağlanması veya koterize edilmesi de önem taşımaktadır. Bu kollaterallerin dağılımı çoğunlukla değişken olmakla beraber sıklıkla mevcut değildir. Bu kollateraller DSV oluşturmak için gereken basıncın düşmesine, dolayısıyla başarısızlığa neden olmaktadır. Erişkin *Wistar* sıçanlarla yapılan ön çalışmada abdominal kollateraller görülmedi. Buna karşın Kılınç ve arkadaşları, Sprague Dawley sıçanlarda spontan varikozel olgusundan bahsetmişlerdir (18). Normalde 0.15-0.20 mm olan spermatik ven çapının cerrahiden 30 gün sonra 1-1.5 mm çapa ulaştığı belirtilmiştir (113). Bu noktalara dikkat edildiği takdirde DSV modelinde başarısızlık oranı %10’un altına düşmektedir. Buradaki deney hayvanlarında da 45 günün sonunda spermatik venlerin dilate olduğunu gözlemlendi.

Varikoselde oluşan kollateraller varikosel oluştuktan sonra testisten daha fazla kanın taşınmasını sağlar ve spermatik ven içerisindeki kan akımının direncini artırır. Varikosel onarımı sonrasında bazı olgularda başarı sağlanamamasının sebeplerinden bir tanesi oluşan bu kollaterallerdir. Turner, mitojenik faktörler ve vazoaktif ajanların varikoselli olgularda ortaya çıkan kan akımında artışa ve dolaylı olarak da testisteki sıcaklık artışının dokuda dağılmasına katkıda bulunduğunu düşünmektedir (110). Bu durumun anjiyogenik süreç tarafından etkilenip etkilenmediği, etkileniyorsa ne kadar etkilendiği konusunda net bilimiz yoktur. Yine de teorik olarak varikoselli olgularda testisten kan akımını artıran faktörler varsa spermatik venin ligasyonu, artan bu kan akımını azaltacak ve normale döndürecektir. Bu durum DSV modellerinde varikosel onarımı sonrasında testiküler kan akımının ve spermatogenezin neden düzeldiğini açıklayabilir (110).

Varikosel testis dokusunda inflamatuvar bir süreç başlatarak anjiyogenez oluşumunu uyarıyor olabilir. Bununla beraber, anjiyogenezin testis dokusunda nasıl bir etkiye neden olduğu açık değildir. İlk başlarda değişik deney hayvanlarında çalışılan DSV modellerinde varikoselin testiküler sıcaklıkta bilateral artışa neden olduğu ve buna bağlı olarak da spermatogenezini bozduğuna ilişkin kanıtlar elde edilmiştir (114, 115). Bu çalışmalar varikosel gelişimi sonrasında sıçan testisinde meydana gelen mikrovasküler kan akımı değişikliklerini saptamak için yapılan intravital mikroskopi çalışmalarıyla desteklenmiştir (116). Green ve arkadaşları, artmış kan akımı ve testiküler sıcaklığın spermatogenezini bozduğunu savunmuş ve erken dönemde uygulanan varikosektominin kan akımı ve testiküler sıcaklığın normal seviyelere dönmesini sağladığını göstermiştir (3). Bunun yanında, artmış kan akımının varikosel onarımı sonrasında geç dönemde kontrol seviyelerine döndüğü gösterilmiştir (3, 8). Anjiyogenez, yeni kollaterallerin oluşmasına katkıda bulunarak kan akımında ve testiküler sıcaklıkta meydana gelen değişikliklerin testis dokusunda daha fazla dağılmasına ve spermatogenezin bozulmasına neden oluyor olabilir. Erken dönemde yapılan varikosel onarımının testiküler sıcaklığı ve kan akımını düzeltmesi, anjiyogenezin olumsuz etkisinin daha erken önlenmesine bağlı olabilir. Varikosel onarımı sonrasında geç dönemlerde de kan akımının düzeliyor olması anjiyogenik sürecin testis dokusunda devam etmesine bağlı olabilir. Bu, ilerlemiş olgularda spermatogenezde bozulmanın neden daha fazla olduğunu ve neden testis atrofi geliştiğini açıklayabilir. Bu çalışmada, MDY'nun DSV grubunda daha fazla olduğunu, V+S grubunda ise kontrol grubuna göre fark olmadığı gösterildi ve bunun SPL'un varikoselde meydana

gelen anjiyogenezi inhibe etmesine bağılı olduğu düşünöldü. Buna karşılık, sol testiste spermatogenez hem DSV, hem de V+S grubunda diğer gruplara göre daha fazla bozulmuştu ve bu bozulma V+S grubunda daha belirgindi ( $p < 0.001$ ). Bu durum, aslında anjiyogenezin varikoselde koruyucu etkisi olduğunu düşöndürmektedir. Yine de neden her ilerlemiş varikozel olgusunda spermatogenezin fazla bozulmadığını ve testis atrofi gelişmediğini açıklamak için daha uzun süreli ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kapiller anjiyogenezi başlatan en kuvvetli uyarılardan biri hipoksidir. Hücre kültürlerindeki parsiyel oksijen basıncının ( $pO_2$ ) düşürölmesi hücre çoğalmasını, migrasyonunu ve tüböl formasyonunu uyarırken,  $pO_2$  düzeylerinin yükseltilmesi VEGF ekspresyonunu düşürür ve endotelial hücre aktivasyonunu azaltır (117). Hipoksi, varikoselin patofizyolojisinde suçlanan faktörlerden biridir (118). Hipoksi durumlarında *hypoxia inducible factor* (HIF) 1 $\alpha$  miktarında artış olur ve VEGF geninin transkripsiyonu uyarılır (117). Gerçekten de varikoselde anjiyogeneze beraber HIF1 $\alpha$  ve VEGF ekspresyonu olduğu gösterilmiştir (18). NO hem reproduktif fonksiyonlarda hem de anjiyogenik süreç içerisinde yer alır. Anjiyogeneze NO, eNOS tarafından oluşturulmaktadır. Testis dokusunda eNOS dejenere olan ya da apoptotik sürece uğramış, olgunlaşmamış veya bozuk yapıdaki germ hücrelerinin intraepitelial sitoplazmalarında gösterilmiştir. Bu durumun eNOS'un germ hücre dejenerasyonundaki rolüne bağılı olduğu belirtilmiştir (119). Artmış eNOS ekspresyonunun damar genişlemesini de artırdığı bilinmektedir (120). Shiraishi ve Naito, *grade 2* ve *3* varikoseli olan erkeklerin testislerinde NO konsantrasyonlarında artış olduğunu göstermiş ve artmış NO seviyelerinin varikoz venlerde dilatasyonu daha da artırarak spermatogenez üzerine varikoselin neden olduğu olumsuz etkiye katkıda bulunduğunu öne sürmüşlerdir (121). Gerçekten de deneysel olarak NO inhibisyonunun damar genişlemesini inhibe ettiği gösterilmiş, benzer bulgular izole organ banyosu çalışmalarında da tespit edilmiştir (14, 122). Her ne kadar NO ve eNOS'un anjiyogeneze ve varikoselde ortak bir yol üzerinden etki gösterip göstermediğı bilinmese de, bu bulgular varikoselde artmış olan anjiyogenik süreçte NO gibi serbest radikallerin açığa çıkması sonucunda spermatogeneze bozulma meydana gelebileceğini düşöndürmektedir. Bu doğruysa anjiyogenezin inhibisyonu ile testiste oluşan hipoksi engellenebilir. Bizim çalışmamızla bu hipotez desteklenmemiştir. Yine de, NO'in anjiyogenik süreç içerisinde testis üzerindeki etkilerini gösterebilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anjiyogenez testis dokusunda koruyucu etki de gösteriyor olabilir. Isoyama ve Sofikitis, varikozel oluşturulmuş sıçanlarda vaskülarizasyonu artıran faktörlerin *counter current* ısı sistemini ve besin maddelerinin dağılımını düzenleyerek spermatogenezi iyileştirdiğini belirtmişlerdir (123). Bu çalışmada da V+S grubunda spermatogenezin DSV grubuna göre daha kötü olması bu bulguyu desteklemektedir.

Spirolakton bir mineralokortikoid reseptör antagonistidir ve önceleri sadece diüretik olarak kullanılmaktayken günümüzde anjiyogenezi inhibe ettiği, vasküler fibrozis ve hasarı azalttığı gösterilmiştir (124). SPL'un oral yoldan kullanımının tavşan korneal revaskülarizasyon modelinde anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (104). Tavşanların yemlerine karıştırılan SPL, 100 mg/kg/gün dozunda uygulanmıştır. Bu çalışmada ilaç orogastrik gavaj yardımıyla verilerek hayvanların beslenme durumlarından kaynaklanan –yememe, az veya çok yeme gibi- standardizasyon hatalarının en aza indirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, burada kullanılan doz çok daha düşüktü (20 mg/kg/gün) (125). Sıçanlarda SPL 200 mg/kg/gün dozda da uygulanabilmektedir (126). Hücre kültürlerinde SPL metaboliti olan kanrenolik asitin de anjiyogenezi inhibe ettiği görülmüştür. Bu durum, SPL'nin insanlarda anjiyogeneze bağımlı hastalıklarda inhibitör olarak kullanıldığı durumlarda aktivitesinin metabolize olmakla azalmayacağını düşündürmektedir (104).

Testis, epididim, prostat ve seminal veziküllerdeki pek çok hücre tipinde VEGF ve bu dokulardaki kan damarlarında da VEGFR-2 ekspresyonunun yoğun olduğu gösterilmiştir (127). VEGF, damar büyümesi ve geçirgenliğinin ana düzenleyicilerinden biridir ve mitojenik etkileri VEGFR-2 tarafından düzenlenmektedir. Lissbrant ve arkadaşları, erkek genital sisteminde –özellikle testiste ve epididimde olmak üzere- endotelyal hücre proliferasyonunun olduğunu ve bu çoğalmanın karaciğer, beyin ve kas gibi dokulardakinden çok daha fazla olduğunu belirterek yüksek endotelyal hücre çoğalmasını klasik anjiyogenezden çok, endotelyal hücrelerin aşırı döngüsüne bağlamışlardır (128). Çalışmanın önemli bir sonucu da testisteki endotelyal hücre çoğalmasının Leydig hücre azalmasına bağılı olarak düştüğü, ancak testosteron takviyesiyle düşmenin daha az olduğudur.

Ge ve arkadaşları, Sprague Dawley sıçanlarda Leydig hücrelerinde mineralokortikoid reseptörlerinin varlığını ve mineralokortikoidlerin testosteron üretimini etkileyip

etkilemediğini araştırmışlardır (129). Leydig hücre kültürü ortamına 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda aldosteron ilave edilmiş ve bu süre sonunda testosteron üretiminin konsantrasyona bağımlı olarak bazal değerlerin üzerine çıktığı görülmüştür. Aldosteronun bu etkisi mineralokortikoid reseptör antagonistleriyle engellenmiştir. Yazarlar, sıçan Leydig hücrelerinde mineralokortikoid reseptör ekspresyonu olduğunu ve aldosteronun mineralokortikoid reseptörleri üzerinden testosteron üretimini uyardığı sonucuna varmışlardır. Michel ve arkadaşları, aldosteronun iskemi oluşturulan farelerde iskemiye bağlı olarak oluşan yeni damarlanmayı artırdığını göstermişlerdir (125). Aldosteron, bu etkisini anjiyotensin 2'ye bağımlı bir yol üzerinden gerçekleştirmektedir. İskemi oluşturulan farelere aldosteron, aldosteron ve SPL, aldosteron ve valsartan -Anjiyotensin<sub>1</sub> reseptör blokörü- vermişler; aldosteronun VEGF protein seviyelerini artırdığını, SPL ve anjiyotensin<sub>1</sub> reseptör blokajının aldosteronun proanjiyogenik etkisini önlediğini göstermişlerdir. İlginç olarak, Miternique-Grosse ve arkadaşları, insan umbilikal ven endotel hücreleri ve sıçanlara implante edilen fibrin jel odalarında spironolaktunun anjiyogenezi inhibe ettiğini belirlemişlerdir. SPL'un inhibitör etkisi, VEGF veya FGFb ile önlenememiş, aldosteron tarafından değiştirilememiştir. Yazarlar, SPL'un *in vivo* ve *in vitro* olarak anjiyogenezi inhibe ettiğini ancak bu etkisinin antimineralokortikoid aktivitesinden bağımsız olduğu hükmüne varmışlardır (19).

Bu çalışmada, sol testiste MDY, DSV grubunda kontrol grubu ve V+S grubundan fazlaydı (sırasıyla,  $p < 0.001$  ve  $p < 0.05$ ). Sağ testiste MDY, DSV ( $p < 0.001$ ) ve *sham* grubunda ( $p < 0.05$ ) kontrol grubuna göre fazlaydı (Bkz. Şekil 4.6). *Sham* grubunda sağ testisteki MDY'nin artış nedeni açık değildir. Uygulanan cerrahinin sol tarafta olmasından dolayı bunun cerrahiye bağlı gelişmiş olduğunu düşünmüyoruz. Bu gruptaki bir sıçanda sağ testiste ileri derecede artmış MDY mevcuttu. Bundan dolayı, *sham* grubunda sağ testiste MDY açısından genel ortalama artmış olabilir. Bu sıçanda spermatogenezin gruptaki diğer hayvanlardan farklı olmaması ve bu gruptaki hayvanlarda ilaç veya başka bir madde kullanılmamış olması artmış MDY'nun başka nedenlere bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Gruplar arasında bazal ve son TT değerleri açısından da fark olmaması SPL'un antianjiyogenik etkisinin antiandrojenik etkisine bağlı olmadığını düşündürmektedir. Bu bulgu, Ge ve arkadaşlarının sonucuyla kısmen çelişmektedir. Testosteronun testiste aldosteronun mineralokortikoid etkisiyle üretildiği kabul edilirse, SPL'un antianjiyogenetik

etkisinin, antimineralokortikoid etkiden bağımsız olduğu söylenebilir. Bu, Miternique-Grosse ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyuşmaktadır. Buradaki çalışmada SPL gerçekten de anjiyogenezi inhibe etmiş, buna rağmen Ge ve arkadaşları tarafından savunulanan aksine TT seviyelerini etkilememiştir. V+S grubunda sol testiste spermatogenezin DSV grubuna göre anlamlı derecede bozulmuş olmasına rağmen, sağ testiste spermatogenez açısından anlamlı fark olmaması da bizi SPL'un antiandrojenik etkisinden uzaklaştırmaktadır. Çünkü, antianjiyogenik etkisi antiandrojenik etkisine bağlı olsaydı her iki testiste de spermatogenezde bozulma beklenirdi. MDY'nun sağ testiste de V+S grubunda kontrol grubundan farksız olması bu bulguyu desteklemektedir. Çünkü SPL, her iki testiste de anjiyogenezi inhibe etmiş, buna karşılık sağ tarafta spermatogenez etkilenmemiştir. TT değerleri açısından da gruplar arasında fark olmaması, spermatogenezdeki bozulmanın SPL'un antiandrojenik etkisinden çok anjiyogenez inhibisyonuna bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Bununla beraber SPL, V+S grubunda anjiyogenezi inhibe etmesine rağmen bu gruptaki hayvanlarda bazal ve son serum  $Na^+$  değerlerini etkilemedi. Bazal  $K^+$  değerlerindeki farklılığı açıklamak zordur. Çünkü gruplarda hangi sıçanın olacağı rasgele olarak belirlendiğinden ve teorik olarak bu sıçanların başlangıç evresinde birbirinden farklı olmadığı düşünüldüğünden bazal değerlerin ölçüldüğü aşamada böylesi bir farklılık beklenmez. Bu durumun en olası nedeni, bazal değerleri ölçmek için alınan kan örneklerinde hemoliz olmasıdır. Bu da hücre içinde yoğun olarak bulunan  $K^+$ 'un seruma sızarak değerlerin yanlış ölçülmesine yol açmış olabilir. Ayrıca, bu durum SPL'un anjiyogenezi inhibe ettiği dozda antimineralokortikoid etki göstermemesine bağlı olabilir. Günlük 100 mg/kg dozda uygulanan SPL'un antimineralokortikoid etkiden bağımsız olarak anjiyogenezi inhibe ettiği bildirilmiştir (104). Spironolaktonun varikoseldeki antianjiyogenik dozunun belirtilmemiş olmasından ötürü bu çalışmada en düşük ve etkin doz olarak 20 mg/kg/gün dozu tercih edildi.

Bu çalışmada anjiyogenez inhibitörü olarak SPL kullanılması çalışmayı zayıflatıyor gibi görünmektedir. SPL'un testosteron üzerine olan olumsuz etkileri bilinmektedir (130). Ancak siproteron asetat gibi diğer testosteron antagonistlerinin anjiyogenezi inhibe etmemesi SPL'un inhibitör etkisinin antiandrojenik etkisine bağlı olmadığını düşündürmektedir (104, 108). Buna ek olarak, gruplarda antiandrojenik ve

antimineralokortikoid etkisinin net olarak izlenmemiş olmasından dolayı SPL'un testosteron, libido ve erektil fonksiyona olumsuz etkileri antianjiyogenik etkisinden bağımsız olabilir. V+S grubunda spermatogenezin kontrol ve DSV gruplarına göre daha kötü olmasından dolayı, anjiyogenezin varikoselde, en azından erken dönemlerde, koruyucu etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz.

Bunun yanında ödem açısından her iki testis için de gruplar arasında fark olmamasından dolayı, SPL'un diüretik ve belki de antimineralokortikoid etkilerinin bu dozlarda oluşmadığı ya da en azından belirgin olmadığı düşünülmüştür. *Sham* ve DSV gruplarında konjesyon kontrol grubuna göre fazla olduğu halde, V+S grubunda bu durumun gözlenmemiş olması SPL'un anjiyogenezi inhibe etmesine bağlı olabilir.

Özen ve arkadaşları, varikoselin nörotransmitter salıverilmesini etkileyerek aynı taraftaki vaz deferens motilitesini etkilediğini göstermişlerdir (21). Buradaki çalışmada 5-HT cevaplarında  $10^{-5}$  M konsantrasyonda yalnızca kontrol ve V+S grupları arasında istatistiksel olarak fark vardı ( $p < 0.05$ ). Diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte DSV grubunda 5-HT yanıtlarının daha fazla olduğu dikkat çekiciydi (Bkz. Şekil 4.13). Varikosel uygulaması, vaz deferenste 5-HT'e düşük konsantrasyonlarda duyarlılık artışına neden oldu. Oysa yüksek konsantrasyonlarda bu etki kayboldu. SPL'un vaz deferens dokusunda 5-HT cevaplarını değiştiriyor olması anjiyogenez inhibisyonuna bağlı olarak spermatogenezde bozulma meydana gelmesine benzerdir. SPL'un vaz deferens dokusunda 5-HT kontraksiyonlarını aynı tarafta değiştirdiği gözlenmektedir. Kontralateral değişiklik olup olmadığını açıklayabilmek için sağ vaz deferenslerin de değerlendirildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

5-HT<sub>2</sub> reseptör antagonisti KET eklendiğinde bu cevapların beklendiği gibi daha geç oluştuğu görülmüştür ve bu cevabın SPL grubunda daha belirgin olduğu saptanmıştır. Bu, SPL'un 5-HT kasılmalarında KET etkisini potansiyalize edici etkisi olmasından dolayı olabilir.

5-HT, erkek genital sisteminde bir çok fizyolojik olayda görevlidir. Bunlardan en önemlilerinden biri de üreme ve fertilite üzerine olan etkileridir. Gonzales ve arkadaşları, varikoselli olgularda kan serotonin düzeylerinin yükseldiğini ve seminal 5-HT düzeylerinin

azaldığını göstermişler ve bunun düşük sperm sayısı, motilitesi ve fruktoz seviyeleriyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir (131). Sonuç itibariyle, serotonin düzeylerinin varikoselli olgularda infertilite belirteçlerinden olduğunu savunmuşlardır.

Yıldız ve arkadaşları, yüksek derecede (2 ve 3) varikoseli olan olgulardan elde edilen variköz venlerde vazokonstriktör reaktivitenin arttığını ve endotelial fonksiyonun azaldığını izole organ banyosu çalışmalarında göstermişlerdir (14). FE sensitivitesinin yüksek dereceli varikosellerde daha fazla olduğunu belirlemişlerdir. Buradaki çalışmada, FE yanıtları açısından PZ sonrasında,  $10^{-5}$  M konsantrasyonda V+S ile diğer gruplar açısından fark saptanmıştır. Bu, SPL tedavisinin diğer gruplara göre PZ inhibisyonu altında FE kasılabilirliğini artırdığını düşündürmektedir. Bunun neye bağlı olduğu net olmasa da SPL, vaz deferens dokusunda sempatik yanıtı değiştirmiş olabilir. Tilki ve arkadaşları, spermatik ven yapısının kontraktıl bir yapısı olduğunu ve pampiniform pleksusa besin taşımasında etkili olduğunu göstermişlerdir (132). Vaz deferens kontraktıl yapısı olan bir organdır ve sempatik stimülasyon sonrasında kasılarak spermin ejakulatuvar kanala doğru atılmasını sağlar. Bu yapı itibariyle spermatik venle benzerlik göstermektedir. Spermatik venin bu yapısının varikoselde bozulmuş olduğunun gösterilmesi, SPL'un bu mekanizmaya etki ettiğini düşündürmektedir.

Asetilkoline yanıt hiçbir grupta anlamlı değildi. Bu yüzden varikoselin kolinerjik yanıtları etkilemediğini düşünüyoruz. Bu bulgu diğer çalışmalarda da doğrulanmıştır (14).



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Varikosel her iki testiste de MDY ve anjiyogenezi artırmakta ve sperm parametrelerini bozmaktadır. SPL, varikoselde oluşan anjiyogenezi inhibe etmesine rağmen, sperm parametrelerinin daha fazla bozulmasına neden olmaktadır. Bu durum, varikoselde oluşan anjiyogenezin testis dokusunda koruyucu bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. SPL'un anjiyogenezi inhibe edici özelliği antimineralekortikoid veya antiandrojenik etkisine bağlı değilmiş gibi görünmektedir. Bununla beraber anjiyogenez ve varikosel arasındaki ilişkinin net olarak tanımlanabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Varikosel uygulaması, sıçan vaz deferens dokusunda 5-HT'e duyarlılığı artırma eğilimi göstermektedir. Bu dokuda konsantrasyona bağımlı kasılma yanıtları oluşturan 5-HT, varikosel uygulamasında daha potent yanıtlara neden olmuştur. Belki de varikoselin tetiklediği bir süreçte 5-HT reseptör ekspresyonunda, miktarında, afinitesinde, vb artış olmaktadır. İlginç olan bu sürecin SPL ön tedavisi ile önlenmesidir. Demek ki, varikoselin 5-HT reseptörleri üzerine yaptığı bir etki SPL tarafından inhibe edilmektedir. Bilgilerimize göre bu bulgu literatüre yeni katkı sağlayacaktır.

Bulgularımıza göre, anjiyogenez varikoselde koruyucu etki yapmaktadır. Anjiyogenezin inhibisyonu hem histopatolojik olarak testiste hem de işlevsel düzeyde vaz deferens dokusu üzerinde süreci ters yönde etkilemektedir. Anjiyogenezi artıran ajanların varikoselde kullanıma girmesi testis ve vaz deferens gibi dokularda morfolojik ve işlevsel düzeylerde oluşabilecek olumsuz etkileri önleyebilir. Yine de, anjiyogenez ve varikosel arasındaki ilişkiyi net olarak ortaya koyabilmek için daha kapsamlı ve uzun süreli çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

- (1) The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. *Fertil Steril* 57:1289-1293, 1992.
- (2) Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP. Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. *J Urol* 152:788-790, 1994.
- (3) Green KF, Turner TT, Howards SS. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J Urol* 131:1208-1211, 1984.
- (4) Gorelick JI, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril* 59:613-616, 1993.
- (5) Meacham RB, Townsend RR, Rademacher D, Drose JA. The incidence of varicoceles in the general population when evaluated by physical examination, gray scale sonography and color Doppler sonography. *J Urol* 151:1535-1538, 1994.
- (6) Braedel HU, Steffens J, Ziegler M, Polsky MS, Platt ML. A possible ontogenic etiology for idiopathic left varicocele. *J Urol* 151:62-66, 1994.
- (7) Saypol DC, Howards SS, Turner TT, Miller ED, Jr. Influence of surgically induced varicocele on testicular blood flow, temperature, and histology in adult rats and dogs. *J Clin Invest* 68:39-45, 1981.
- (8) 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* 7:271-276, 1986.
- (9) York JP, Klump R, Smith JJ, Drago JR. The role of the adrenal in the rat varicocele model. *In Vivo* 4:145-147, 1990.
- (10) Hudson RW. The endocrinology of varicoceles. *Fertil Steril* 49:199-208, 1988.
- (11) Gilbert BR, Witkin SS, Goldstein M. Correlation of sperm-bound immunoglobulins with impaired semen analysis in infertile men with varicoceles. *Fertil Steril* 52:469-473, 1989.
- (12) Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 161:1831-1834, 1999.
- (13) Benoff S, Hurley IR, Barcia M, Mandel FS, Cooper GW, Hershlag A. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. *Fertil Steril* 67:336-347, 1997.
- (14) Yildiz O, Gul H, Ozgok Y, Onguru O, Kilciler M, Aydin A, Isimer A, Harmankaya AC. Increased vasoconstrictor reactivity and decreased endothelial function in high grade varicocele; functional and morphological study. *Urol Res* 31:323-328, 2003.
- (15) Mangi MH, Newland AC. Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. *Br J Haematol* 111:43-51, 2000.
- (16) Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 69:508-517, 1993.
- (17) Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest* 103:157-158, 1999.
- (18) Kilinc F, Kayaselcuk F, Aygun C, Guvel S, Egilmez T, Ozkardes H. Experimental varicocele induces hypoxia inducible factor-1alpha, vascular

- endothelial growth factor expression and angiogenesis in the rat testis. *J Urol* 172:1188-1191, 2004.
- (19) Miterique-Grosse A, Griffon C, Siegel L, Neuville A, Weltin D, Stephan D. Antiangiogenic effects of spironolactone and other potassium-sparing diuretics in human umbilical vein endothelial cells and in fibrin gel chambers implanted in rats. *J Hypertens* 24:2207-2213, 2006.
  - (20) Westfall TD, Westfall DP. Pharmacological techniques for the in vitro study of the vas deferens. *J Pharmacol Toxicol Methods* 45:109-122, 2001.
  - (21) Ozen IO, Moralioglu S, Vural IM, Ozturk GS, Ozkan MH, Demirtola A, Ercan ZS, Barun S, Sarioglu Y. Effects of varicocele on electrical field stimulation-induced biphasic twitch responses in the ipsilateral and contralateral rat vasa deferentia. *Eur Surg Res* 39:269-274, 2007.
  - (22) Noske HD, Weidner W. Varicocele--a historical perspective. *World J Urol* 17:151-157, 1999.
  - (23) Ivanissevich O, Gregorini H. Una nueva operacion para curar el varicocele. *Sem Med* 25:575, 1918.
  - (24) Kendirci M, Kadioglu A, Boylu U, Miroglu C. Urogenital surgery of the 15th century in Anatolia. *J Urol* 173:1879-1882, 2005.
  - (25) Dahl E.V, Herrick JF. A vascular mechanism for maintaining testicular temperature by countercurrent exchange. *Surg Gynecol Obstet* 108:697-705, 1959.
  - (26) Gemalmaz H. Testislerin Embriyolojisi ve Histolojisi. *Klinik Androloji*. (Özdiler E, Aydos K. ed.). 1'nci baskı. Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi. 1-18, 2000.
  - (27) Batislam E, Başar MM. Erkek Üreme Sisteminin Anatomisi. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. (Kadıoğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M. ed.). 1'nci baskı. İstanbul, Türk Androloji Derneği. 25-34, 2004.
  - (28) Aytekin Y, Solakoğlu S. Erkek Üreme Sistemi Histolojisi. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. (Kadıoğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M. ed.). 1'nci baskı. İstanbul, Türk Androloji Derneği. 35-60, 2004.
  - (29) Türkölmez K. Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı. *Klinik Androloji*. (Özdiler E, Aydos K. ed.). 1'nci baskı. Ankara, Ankara Üniversitesi Basımevi. 21-36, 2000..
  - (30) Özbey İ, Aksoy Y. Erkek Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal Aks. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi*. (Kadıoğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, ed.). 1'nci baskı. İstanbul, Türk Androloji Derneği. 61-74, 2004.
  - (31) Kursh ED. What is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril* 48:510-511, 1987.
  - (32) Hendry WF, Sommerville IF, Hall RR, Pugh RC. Investigation and treatment of the subfertile male. *Br J Urol* 45:684-692, 1973.
  - (33) 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* 86:490-493, 2000.
  - (34) Raman JD, Walmsley K, Goldstein M. Inheritance of varicoceles. *Urology* 65:1186-1189, 2005.
  - (35) Wishahi MM. Detailed anatomy of the internal spermatic vein and the ovarian vein. Human cadaver study and operative spermatic venography: clinical aspects. *J Urol* 145:780-784, 1991.
  - (36) Kohler FP. On the etiology of varicocele. *J Urol* 97:741-742, 1967.

- (37) Shafik A, Moftah A, Olfat S, Mohi-el-Din M, el-Sayed A. Testicular veins: anatomy and role in varicoceles and other pathologic conditions. *Urology* 35:175-182, 1990.
- (38) De Schepper A. Nutcracker phenomenon of the vena renalis and venous pathologic of the left kidney. *J Belge Radiol* 55:507-511, 1972.
- (39) El-Sadr AR, Mina E. Anatomical and surgical aspects in the operative management of varicocele. *Urol Cutaneous Rev* 54:257-262, 1950.
- (40) Li H, Dubocq F, Jiang Y, Tiguert R, Gheiler EL, Dhabuwala CB. Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology* 53:1258-1262, 1999.
- (41) Grasso LF, Pepe P, Panella P, Pepe F. Velocimetric evaluation of spermatic vessels with echo color doppler in patients with idiopathic varicocele. *Minerva Urol Nefrol* 49:179-182, 1997.
- (42) Sweeney TE, Rozum JS, Gore RW. Alteration of testicular microvascular pressures during venous pressure elevation. *Am J Physiol* 269:37-45, 1995.
- (43) Shafik A. Venous tension patterns in cord veins. II. After varicocele correction. *J Urol* 129:749-751, 1983.
- (44) Koksali IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl* 5:95-99, 2003.
- (45) Zorngiotti AW, Macleod J. Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril* 24:854-863, 1973.
- (46) Goldstein M, Eid JF. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. *J Urol* 142:743-745, 1989.
- (47) Lund L, Nielsen KT. Varicocele testis and testicular temperature. *Br J Urol* 78:113-115, 1996.
- (48) Wright EJ, Young GP, Goldstein M. Reduction in testicular temperature after varicocelectomy in infertile men. *Urology* 50:257-259, 1997.
- (49) Mieusset R, Bujan L. Testicular heating and its possible contribution to male infertility: a review. *Int J Androl* 18:169-184, 1995.
- (50) Fujisawa M, Yoshida S, Matsumoto O, Kojima K, Kamidono S. Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 50:795-800, 1988.
- (51) Simsek F, Turkeri L, Cevik I, Bircan K, Akdas A. Role of apoptosis in testicular tissue damage caused by varicocele. *Arch Esp Urol* 51:947-950, 1998.
- (52) Salama N, Bergh A, Damber JE. The changes in testicular vascular permeability during progression of the experimental varicocele. *Eur Urol* 43:84-91, 2003.
- (53) Ozbek E, Yurekli M, Soyulu A, Davarci M, Balbay MD. The role of adrenomedullin in varicocele and impotence. *BJU Int* 86:694-698, 2000.
- (54) Cohen MS, Plaine L, Brown JS. The role of internal spermatic vein plasma catecholamine determinations in subfertile men with varicoceles. *Fertil Steril* 26:1243-1249, 1975.
- (55) Ito H, Fuse H, Minagawa H, Kawamura K, Murakami M, Shimazaki J. Internal spermatic vein prostaglandins in varicocele patients. *Fertil Steril* 37:218-222, 1982.
- (56) Lindholmer C, Thulin L, Eliasson R. Concentrations of cortisol and renin in the internal spermatic vein of men with varicocele. *Andrologie* 5:21-22, 1973.
- (57) Rajfer J, Turner TT, Rivera F, Howards SS, Sikka SC. Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. *Biol Reprod* 36:933-937, 1987.

- (58) Kazama T. Effect of experimental left varicocele on rat Leydig cell function. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* 86:308-315, 1995.
- (59) Hudson RW. Free sex steroid and sex hormone-binding globulin levels in oligozoospermic men with varicoceles. *Fertil Steril* 66:299-304, 1996.
- (60) Cayan S, Kadioglu A, Orhan I, Kandirali E, Tefekli A, Tellaloglu S. The effect of microsurgical varicocelectomy on serum follicle stimulating hormone, testosterone and free testosterone levels in infertile men with varicocele. *BJU Int* 84:1046-1049, 1999.
- (61) Ando S, Giacchetto C, Beraldi E, Panno ML, Carpino A, Sposato G, Lombardi A. Testosterone and dihydrotestosterone seminal plasma levels in varicocele patients. *Andrologia* 15:374-379, 1983.
- (62) Younes AK. Low plasma testosterone in varicocele patients with impotence and male infertility. *Arch Androl* 45:187-195, 2000.
- (63) Hudson RW, Hayes KA, Crawford VA, McKay DE. Seminal plasma testosterone and dihydrotestosterone levels in men with varicoceles. *Int J Androl* 6:135-142, 1983.
- (64) Turner TT, Lopez TJ. Testicular blood flow in peripubertal and older rats with unilateral experimental varicocele and investigation into the mechanism of the bilateral response to the unilateral lesion. *J Urol* 144:1018-1021, 1990.
- (65) Ghosh PK, York JP. Changes in testicular testosterone and acid and alkaline phosphatase activity in testis and accessory sex organs after induction of varicocele in Noble rats. *J Surg Res* 56:271-276, 1994.
- (66) 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* 61:779-782, 1994.
- (67) Muammer Kendirci, Cengiz Miroğlu. Varikosel patofizyolojisi. Erkek reproduktif sistem hastalıkları ve tedavisi. (Kadioglu A, Cayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendirci M, ed.). 1'nci baskı. İstanbul, Türk Androloji Derneği. 425-444, 2004.
- (68) Vigil P, Wohler C, Bustos-Obregon E, Comhaire F, Morales P. Assessment of sperm function in fertile and infertile men. *Andrologia* 26:55-60, 1994.
- (69) Rogers BJ, Mygatt GG, Soderdahl DW, Hale RW. Monitoring of suspected infertile men with varicocele by the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 44:800-805, 1985.
- (70) Jarow JP, Sanzone JJ. Risk factors for male partner antisperm antibodies. *J Urol* 148:1805-1807, 1992.
- (71) Turner TT, Jones CE, Roddy MS. Experimental varicocele does not affect the blood-testis barrier, epididymal electrolyte concentrations, or testicular blood gas concentrations. *Biol Reprod* 36:926-932, 1987.
- (72) Knudson G, Ross L, Stuhldreher D, Houlihan D, Bruns E, Prins G. Prevalence of sperm bound antibodies in infertile men with varicocele: the effect of varicocele ligation on antibody levels and semen response. *J Urol* 151:1260-1262, 1994.
- (73) Gottlieb AR. Apoptosis. *Williams Hematology*. (I Lichtman MA, Beutler E, Kipps T, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal T, ed.), 7th ed., Newyork, 125-130, 2005.
- (74) Baccetti B, Collodel G, Piomboni P. Apoptosis in human ejaculated sperm cells (notulae seminologicae 9). *J Submicrosc Cytol Pathol* 28:587-596, 1996.

- (75) Marmar JL. Varicocele and male infertility: part II. *Hum Reprod Update* 7:461-472, 2001.
- (76) Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 140:1709-1717, 1999.
- (77) Miller D, Brough S, Al-Harbi O. Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Hum Reprod* 7:637-645, 1992.
- (78) Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 7:643-650, 1993.
- (79) Jones MM, Xu C, Ladd PA. Selenite suppression of cadmium-induced testicular apoptosis. *Toxicology* 116:169-75, 1997.
- (80) Benoff S, Gilbert BR. Varicocele and male infertility: part I. Preface. *Hum Reprod Update* 7:47-54, 2001.
- (81) Cameron DF, Snyder FE. The blood-testis barrier in men with varicocele: a lanthanum tracer study. *Fertil Steril* 34:255-258, 1980.
- (82) Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril* 21:606-609, 1970.
- (83) Sigman M, Jarow JP. Ipsilateral testicular hypotrophy is associated with decreased sperm counts in infertile men with varicoceles. *J Urol* 158:605-607, 1997.
- (84) Hargreave TB, Liakatas J. Physical examination for varicocele. *Br J Urol* 67:328, 1991.
- (85) Comparison among different methods for the diagnosis of varicocele. World Health Organization. *Fertil Steril* 43:575-582, 1985.
- (86) Trum JW, Gubler FM, Laan R, van d, V. The value of palpation, varicoscreen contact thermography and colour Doppler ultrasound in the diagnosis of varicocele. *Hum Reprod* 11:1232-1235, 1996.
- (87) Eskew LA, Watson NE, Wolfman N, Bechtold R, Scharling E, Jarow JP. Ultrasonographic diagnosis of varicoceles. *Fertil Steril* 60:693-697, 1993.
- (88) Rifkin MD, Foy PM, Kurtz AB, Pasto ME, Goldberg BB. The role of diagnostic ultrasonography in varicocele evaluation. *J Ultrasound Med* 2:271-275, 1983.
- (89) McClure RD, Hricak H. Scrotal ultrasound in the infertile man: detection of subclinical unilateral and bilateral varicoceles. *J Urol* 135:711-715, 1986.
- (90) Kondoh N, Meguro N, Matsumiya K, Namiki M, Kiyohara H, Okuyama A. Significance of subclinical varicocele detected by scrotal sonography in male infertility: a preliminary report. *J Urol* 150:1158-1160, 1993.
- (91) Hirsh AV, Cameron KM, Tyler JP, Simpson J, Pryor JP. The Doppler assessment of varicoceles and internal spermatic vein reflux in infertile men. *Br J Urol* 52:50-56, 1980.
- (92) Fretz PC, Sandlow JI. Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Urol Clin North Am* 29:921-937, 2002.
- (93) Cayan S, Lee D, Black LD, Reijo Pera RA, Turek PJ. Response to varicocelectomy in oligospermic men with and without defined genetic infertility. *Urology* 2001 57:530-535, 2001.
- (94) Yamamoto M, Hibi H, Hirata Y, Miyake K, Ishigaki T. Effect of varicocelectomy on sperm parameters and pregnancy rate in patients with subclinical varicocele: a randomized prospective controlled study. *J Urol* 155:1636-1638, 1996.

- (95) Lemack GE, Uzzo RG, Schlegel PN, Goldstein M. Microsurgical repair of the adolescent varicocele. *J Urol* 160:179-181, 1998.
- (96) Kass EJ. Adolescent varicocele. *Pediatr Clin North Am* 48:1559-1569, 2001.
- (97) Cayan S, Akbay E, Bozlu M, Doruk E, Erdem E, Acar D, Ulusoy E. The effect of varicocele repair on testicular volume in children and adolescents with varicocele. *J Urol* 168:731-734, 2002.
- (98) Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 231:474-488, 2004.
- (99) Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 69:508-517, 1993.
- (100) Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* 97:1119-1128, 2004.
- (101) Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:1668-1678, 2003.
- (102) Haas TL, Milkiewicz M, Davis SJ, Zhou AL, Egginton S, Brown MD, Madri JA, Hudlicka O. Matrix metalloproteinase activity is required for activity-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:1540-1547, 2000.
- (103) Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3219-3224, 2007.
- (104) Klauber N, Browne F, nand-Apte B, D'Amato RJ. New activity of spironolactone. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation* 94:2566-2571, 1996.
- (105) Cumming DC, Yang JC, Rebar RW, Yen SS. Treatment of hirsutism with spironolactone. *JAMA* 247:1295-1298, 1982.
- (106) Sciarra F, Toscano V, Concolino G, Di SF. Antiandrogens: clinical applications. *J Steroid Biochem Mol Biol* 37:349-362, 1990.
- (107) Levitt JI. Spironolactone therapy and amenorrhea. *JAMA* 211:2014-2015, 1970.
- (108) Jurzyk RS, Spielvogel RL, Rose LI. Antiandrogens in the treatment of acne and hirsutism. *Am Fam Physician* 45:1803-1806, 1992.
- (109) Tokumura T, Muraoka A, Masutomi T, Machida Y. Stability of spironolactone in rat plasma: Strict temperature control of blood and plasma samples is required in rat pharmacokinetic studies. *Biol Pharm Bull* 28:1126-1128, 2005.
- (110) Turner TT. The study of varicocele through the use of animal models. *Hum Reprod Update* 7:78-84, 2001.
- (111) Graphpad Software Inc., GraphPad Prism, Version 4.0, San Diego, CA, 2003..
- (112) Wishahi MM. Anatomy of the venous drainage of the human testis: testicular vein cast, microdissection and radiographic demonstration. A new anatomical concept. *Eur Urol* 20:154-160, 1991.
- (113) Turner TT, Howards SS. The venous anatomy of experimental left varicocele: comparison with naturally occurring left varicocele in the human. *Fertil Steril* 62:869-875, 1994.
- (114) Turner TT. Varicocele: still an enigma. *J Urol* 129:695-699, 1983.
- (115) Snyder FE, Cameron DF. Surgical induction of varicocele in the rabbit. *J Urol* 130:1005-1009, 1983.

- (116) Nagler HM, Lizza EF, House SD, Tomashefsky P, Lipowsky HH. Testicular hemodynamic changes after the surgical creation of a varicocele in the rat. Intravital microscopic observations. *J Androl* 8:292-298, 1987.
- (117) Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359:843-845, 1992.
- (118) Chakraborty J, Hikim AP, Jhunjhunwala JS. Stagnation of blood in the microcirculatory vessels in the testes of men with varicocele. *J Androl* 1985 6:117-126, 1985.
- (119) Zini A, O'Bryan MK, Magid MS, Schlegel PN. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation, and programmed cell death. *Biol Reprod* 55:935-941, 1996.
- (120) Amano K, Matsubara H, Iba O, Okigaki M, Fujiyama S, Imada T, Kojima H, Nozawa Y, Kawashima S, Yokoyama M, Iwasaka T. Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression. *Hypertension* 41:156-162, 2003.
- (121) Shiraishi K, Naito K. Nitric oxide produced in the testis is involved in dilatation of the internal spermatic vein that compromises spermatogenesis in infertile men with varicocele. *BJU Int* 99:1086-1090, 2007.
- (122) Tronc F, Wassef M, Exposito B, Henrion D, Glagov S, Tedgui A. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1256-1262, 1996.
- (123) Isoyama T, Sofikitis N. Factors Inducing Vascularization Improve the Spermatogenic and Steroidogenic Function of the Varicocelized Testis. *Yonago Acta medica* 42:41-49, 1999.
- (124) Doggrell SA, Brown L. The spironolactone renaissance. *Expert Opin Investig Drugs* 10:943-954, 2001.
- (125) Michel F, Ambroisine ML, Duriez M, Delcayre C, Levy BI, Silvestre JS. Aldosterone enhances ischemia-induced neovascularization through angiotensin II-dependent pathway. *Circulation* 109:1933-1937, 2004.
- (126) Pechanova O, Matuskova J, Capikova D, Jendekova L, Paulis L, Simko F. Effect of spironolactone and captopril on nitric oxide and S-nitrosothiol formation in kidney of L-NAME-treated rats. *Kidney Int* 70:170-176, 2006.
- (127) Ergun S, Luttmmer W, Fiedler W, Holstein AF. Functional expression and localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human epididymis. *Biol Reprod* 58:160-168, 1998.
- (128) Lissbrant IF, Lissbrant E, Persson A, Damber JE, Bergh A. Endothelial cell proliferation in male reproductive organs of adult rat is high and regulated by testicular factors. *Biol Reprod* 68:1107-1111, 2003.
- (129) Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Latif SA, Morris DJ, Hardy MP. Stimulation of testosterone production in rat Leydig cells by aldosterone is mineralocorticoid receptor mediated. *Mol Cell Endocrinol* 243:35-42, 2005.
- (130) Steelman SL, Brooks JR, Morgan ER, Patanelli DJ. Anti-androgenic activity of spironolactone. *Steroids* 14:449-450, 1969.
- (131) Gonzales GF, Garcia-Hjarles MA. Blood/seminal serotonin levels in infertile men with varicocele. *Arch Androl* 24:193-199, 1990.
- (132) Tilki D, Kilic E, Tauber R, Pfeiffer D, Stief CG, Tauber R, Ergun S. The complex structure of the smooth muscle layer of spermatic veins and its potential role in the development of varicocele testis. *Eur Urol* 51:1402-1409, 2007.