

**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA VAZEKTOMİ SONRASI
APOPİTOTİK DEĞİŞİKLİKLER VE OZON TEDAVİSİNİN
ETKİLERİ**

SERHAN ALPCAN

UZMANLIK TEZİ

**KIRIKKALE
2009**

**T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

SERHAN ALPCAN

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Halil BAŞAR**

**KIRIKKALE
2009**

**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

Üroloji Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 23/11/2009

Prof.Dr. Halil Başar
Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Üroloji AD
Jüri Başkanı

Prof. Dr. M.Murad Başar
Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Üroloji AD
Üye

Prof. Dr. Erdal Yılmaz
Kırıkkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Üroloji. AD
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Önsöz	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vii
Çizelgeler	viii
ÖZET	1
SUMMARY	2
1.GİRİŞ	3
1.1 Anatomi	4
1.1.1 Testis	4
1.1.2 Vaz Deferens	5
1.1.3 Testis İntertisyumu ve Leydig Hücreleri	6
1.1.4 Seminifer Tübüller, Peritübüler Yapılar ve Sertoli Hücreleri	7
1.1.4.1 Seminifer Tübüller	7
1.1.4.2 Peritubüler Yapılar	7
1.1.4.3 Sertoli Hücreleri	8
1.2 Spermatogenez	9
1.2.1 Spermatogenezin Hormonal Kontrolü	11
1.3 Erkek Üreme Sistemi Embriyolojisi	12
1.4 Erkek Üreme Sistemi Fizyolojisi	14
1.5 Vaz Obstrüksiyonu	15
1.5.1 Vazektomi Tekniği	16
1.6 Apoptozis	18
1.6.1 Apoptozis Tanımı	18
1.6.2 Apoptozisin Morfolojisi	19
1.6.3 Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar	20
1.6.4 Apoptozin Mekanizması	22
1.6.5 Apoptozisin Genlerle Kontrolü	25
1.6.6 Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	26
1.6.6.1 Morfolojik görüntüleme yöntemleri	27

1.6.6.2 Histokimyasal yöntemler	28
1.6.6.3. Biyokimyasal Yöntemler	29
1.6.6.4. İmmünojik Yöntemler	30
1.6.6.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	30
1.6.7 Spermatogenezde Apoptozisin Rolü	30
1.6.8 Vazektominin Spermatogenez Üzerine Etkileri	31
1.7 Oksidatif Stres ve Ozonoterapi	32
1.7.1 Oksidatif Stres	32
1.7.2 Ozon Gazı ve Uygulama Yöntemleri	35
1.7.2.1 Sistemik uygulama yöntemleri	36
1.7.2.2 Topikal uygulama yöntemleri	36
1.7.3 Ozonoterapi ve Antioksidan Savunma Sistemi	37
1.7.4 Ozonoterapinin Endikasyonları	37
1.7.5 Ozon Tedavisinde Aracı Olduğu Düşünülen Medyatörler	38
1.7.6 Ozonoterapinin Kontraendikasyonları	40
1.7.7 Nitrik Oksit Sintetaz	40
2.GEREÇ VE YÖNTEM	43
2.1 Gereç	43
2.2 Cerrahi İşlem	44
2.3. Biyokimyasal ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme	47
2.3.1 Biyokimyasal Değerlendirme	47
2.3.2 İmmünohistokimyasal Değerlendirme	47
2.3.2.1 i-NOS ve e-NOS İmmünohistokimyasal Boyanma Yöntemleri	47
2.3.2.2 TUNEL Yöntemi	49
2.4 Hücre Sayımı ve İstatistiksel Analiz	50
3.BULGULAR	51
3.1 e-NOS İmmünohistokimya Boyanmaları	51
3.2 İ-NOS İmmünohistokimya Boyanmaları	54
3.3 TUNEL Yöntemi ile Apoptotik Hücre Boyanmaları	58
3.4 Biyokimyasal Değerlendirme	61
4.TARTIŞMA VE SONUÇ	65
KAYNAKLAR	69

ÖNSÖZ

Üroloji eğitimim boyunca yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Halil Başar'a, yetişmemizde büyük emekleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. Ertan Batislam'a , Prof. Dr.Murad Başar'a ve Prof. Dr. ErdalYılmaz'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin hazırlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr. Üçler Kısa, Doç.Dr. Oğuz Kul, Yrd. Doç.Dr. Tolga Reşat Aydos ve birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Asistanlığım boyunca desteğini esirgemeyen eşime ve bugünlere gelmemi sağlayan sevgili aileme teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Apaf-1	Apoptotik proteaz aktive edivi faktör 1
ABP	Androjen bağlayan protein
AEC	Aminoetilkarbizol
AIF	Apoptozis İndukleyici faktör
AMH	Anti-Müllerian hormon
ATP	Adenozin tri fosfat
Ca	kalsiyum
cAMP	siklik adenozin tri fosfat
Cl	Klor
cm.	santimetre
CSF	koloni uyarıcı faktörler
DNA	deoksi ribo nükleik asit
EGF	epidermal growth faktör
e-NOS	endotelyal nitrik oksit sentetaz
E2	östradiol
Dk	dakika
FADD	Fas Associating protein with a Death Domain protein
FasL	fas ligandı
FSH	folikül simüle edici hormon
g	gram
HSV	Herpes simpleks virüs
HPV	Human papilloma virüs
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ICSI	İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu
IL-2	İnterlökin 2
INH-B	İnbibin B
i-NOS	İndüclenebilir nitrik oksit sentetaz
LH	Luteotropik hormon

LH-RH	Luteotropik hormon releasing hormon
lt/dk	litre/dakika
MESA	Mikrocerrahi ile epididimlerden sperm aspirasyonu
Mg	miligram
mg/kg	miligram/kilogram
ml	mililitre
mm	milimetre
Na	Sodyum
NADPH	Nicotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat-oksidad
NGF	Nöron Büyüme Faktörü
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentetaz
PBS	Fosfatlı Tuz Tamponu
RIP	Reseptör İnteraktive edici Protein
RNA	Ribonükleik Asit
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
SPSS	Self-Propelled Semi-Submersible
SRY	Sex Determining Region Y
TDF	Testis Belirleyici Faktör
K	Potasyum
T	Testosteron
TdT	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TESE	Testiküler Sperm Ekstraksiyonu
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TRADD	TNFR-1 ilişkili Ölüm Domaini
TUNEL Yöntemi labeling technique	Terminal deoksinükleotidil transferaz-mediated nick and
°C	Santigrad Derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Apoptozun Mekanizması

Kumar V. Abbas A, Fausto N. Cellular Adaptations, Cell İnjury and Cell Death. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N., eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Philadelphia, 2005;7th ed:26-32.

Şekil 2: Vazektomi uygulanımı

Şekil 3: Kontrol grubu (Grup1)

Şekil 4: Bilateral vazektomi-6 hafta (Grup 7)

Şekil 5: Bilateral vazektomi-6 hafta+Ozonoterapi (Grup 9)

Şekil 6: Ozonoterapi grubu (Grup 10)

Şekil 7: Kontrol Grubu(Grup1)

Şekil 8: Sol vazektomi-4 hafta (Grup4)

Şekil 9: Bilateralvazektomi-6hafta (Grup7)

Şekil 10: Ozonoterapi Grubu (Grup 10)

Şekil 11: e-NOS ve i-NOS ile boyanmış ortalama hücre sayılarının gruplar arası dağılımı

Şekil 12: Kontrol Grubu(Grup 1)

Şekil 13: Sol Vazektomi-4 Hafta (4.Grup)

Şekil 14: Bilateral Vazektomi- 4Hafta (6.Grup)

Şekil15: BilateralVazektomi-6Hafta(7.Grup)

Şekil 16: Ozonoterapi Grubu (10.Grup)

Şekil 17: Sol Testis apoptotik indeksinin gruplar arası dağılımı

Şekil 18: Serum ortalama inbin-B değerinin gruplar arası dağılımı

Şekil 19: Ortalama serum LH düzeyleri

Şekil 20: Ortalama serum T düzeyleri

Şekil 21: Ortalama serum FSH düzeyleri

Şekil 22: Ortalama serum E2 düzeyleri

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1: Apoptozis ve Nekroza yol açan nedenler

Çizelge 2: Apoptozis ve Nekrozun Morfolojik Özellikleri

Çizelge 3: Apoptozise ve Nekrozun Biyokimyasal Özellikleri

Çizelge 4: Apoptozisi baskılayan ve indükleyen genler

Çizelge5: Rat Ağırlıkları

Çizelge 6: Tüm gruplar arasında sağ ve sol testisin e-NOS hücre sayımlarının analizi

Çizelge 7: Tüm gruplar arasında sağ ve sol testisin i-NOS hücre sayımlarının analizi

Çizelge8: Sol testis apoptotik indeksi (Ort±STD)

Çizelge 9: Semen Hormon parametreleri

Çizelge 10: Serum Hormon Parametreleri

ÖZET

Alpcan, S, (Sıçan Testis Dokusunda Vazektomi Sonrası Apoptotik Değişiklikler ve Ozon Tedavisinin Etkileri), Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2009

Vazektomi, dünyada yaygın olarak kullanılan bir korunma yöntemidir. Bu çalışmanın amacı deneysel vazektomi modeli oluşturulan ratların germ hücrelerinde apoptozisi değerlendirilmek ve ozon tedavisinin apoptozis üzerine etkisini incelemektir.

Bu çalışmada 60 adet erkek wistar ratı kullanıldı. Altışar rattan oluşan 10 grup oluşturuldu. Ratlarda unilateral ve bilateral vazektomi modelleri oluşturularak, 4. ve 6. haftalarda bilateral orşiektomi uygulandı. Germ hücrelerinde ortaya çıkan apoptotik değişiklikler ve spermatogenez üzerine olan etkileri immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle karşılaştırıldı.

Ozon reaktif oksijen türevleri oluşturarak antioksidan savunma sistemini etkileyen tedavi şeklidir. Ozonoterapinin apoptozis üzerine etkisini incelemek amacıyla vazektomi oluşturulmuş modellere 6 hafta süreyle intraperitoneal ozon gazı uygulandı ve vazektomi uygulanmayan gruplar ile karşılaştırıldı.

Vazektomi sonrası süreye bağımlı olarak e-NOS, i-NOS immünohistokimyasal boyanmalarını ve TUNEL sonrası apoptotik indeksi artmış olarak bulduk. Bu değerler vazektomi uygulanmadan ozonterapi uygulanan grupta da benzer bulundu. Ancak vazektomi sonrası ozonterapi uygulanan gruplarda apoptotik değişikliklerin belirgin derecede azaldığı görüldü.

Tüm gruplarda serum FSH, LH, testosteron ve östradiol düzeyleri arasında fark saptanmadı. Serum inhibin-B düzeyleri çift taraflı vazektomi uygulanan modellerde diğer gruplara kıyasla daha düşük değere sahipti.

Bulgularımız ışığında ozonterapi oksidatif stres varlığında apoptozisi azaltıcı, oksidatif stres yokluğunda apoptozisi artırıcı etki gösterir.

Anahtar sözcükler Apoptozis, inhibin-B, NOS, ozonterapi, vazektomi,

SUMMARY

Alpcan S, (Apoptotic Changes in the Rat Testis After Vasectomy and Effects of Ozonotherapy), University of Kırıkkale, Department of Urology Specialization Thesis, Kırıkkale, 2009

Vasectomy is the contraceptive method widely used around the world. In this study the aim is to inquire into apoptosis on germ cells and explain effect of ozonotherapy on apoptosis in experimental vasectomy model.

Sixty male wistar rat were used in the investigation. They were divided into 10 groups of 6 each. Unilateral and bilateral vasectomy models were performed, they were bilaterally orchiectomized at intervals of 4 and 6 weeks after the vasectomy . Apoptotic changes on germ cells and effects on spermatogenesis were compared between groups.

Ozone is treatment model which have an anti-oxidative effects by forming free radicals. Intraperitoneal ozon injection was done for six weeks running to the vasectomy models to investigate effects of ozonotherapy on apoptosis and compared with non-vasectomized groups.

We found increase on e-NOS and i-NOS expressions and apoptotic index after vasectomy in dependence to the period. These values were similar in ozonotherapy group without vasectomized. However apoptotic changes had been decreased in the group of ozonotherapy after vasectomized.

Serum FSH,LH, testosterone and estradiol levels were similar in all groups. Serum inhibin-B levels had a low levels in bilateral vasectomized groups than the others.

In light of the foregoing, ozonotherapy decreases apoptosis, if organism has an oxidative stress, if organism is not to be subjected to oxidative stress, apoptosis increases

Key Words Apoptosis, inhibin-B, NOS, ozonotherapy, vasectomy

1.GİRİŞ

Vazektomi, erkeklerde bütün dünyada giderek yaygınlaşarak uygulanan en etkili, güvenilir ve kalıcı kontrasepsiyon yöntemidir (1). Erkek kontrasepsiyonunun diğer metodları güvenli görülmemekle birlikte hormonal yaklaşım da olduğu gibi araştırma halindedir.

Ancak yanlış görüş olarak vazektomi geri dönüşümsüz kontrasepsiyon yöntemi olarak bilinmektedir. Vazektominin indüklediği testiküler dokudaki apoptotik değişikliklerin mekanizması ve bunun spermatogenez üzerine etkileri net değildir (2).

Biz bu çalışmada, vazektomi sonrası kişilerin vazovazostomi isteğini göz önünde bulundurarak, vazektomi sonrası testiküler dokudaki immünohistokimyasal değişiklikleri ve bunun hormon parametreleri üzerine etkilerini değerlendirdik. Aynı zamanda, ozonoterapinin vazektomi sonrası meydana gelen apoptotik değişiklikler üzerine etkilerini araştırdık.

Uygulanacak olan çalışmanın insanlar üzerinde uygulanması etik olmadığı için ratlar üzerinde 4 ve 6 haftalık deneysel vazektomi grupları oluşturduk. Bu gruplardan bazılarında ozon tedavisi uyguladık.

Ozonterapi organizmanın antioksidan ve antiinflamatuvar savunma sistemlerini destekleyen, dokulara oksijenin daha kolay bırakılmasını sağlayan destek tedavisidir. Ozonterapi organizmada, hücre içi enzimatik antioksidan savunma sistemini destekler. Organizma tarafından güçlü bir oksidatif tehdit olarak algılanır ve bunun sonucu olarak antioksidan enzimler uyarılmış olur.

Vücutta iç dengeyi sağlamada rolü olan apoptozisin vazektomi patofizyolojisinde yeri olduğu düşünülmüştür (2,3,4). Bu yüzden testislerin germ hücrelerinde ki apoptozisi düzeylerini TUNEL metodu ile değerlendirildi. Germ hücrelerindeki i-NOS ve e-NOS ekspresyonları gruplar arasında değerlendirildi. Apoptozisin spermatogenez üzerine olan etkileri, seminal plazmada testosteron ve östradiol düzeyleri ile, serumda FSH, LH, testosteron, östradiol ve inhibin B düzeyleriyle incelendi.

Bu çalışma, bildiğimiz kadarıyla ozonoterapinin apoptozis ve serum, seminal plazma hormon parametreleri üzerine etkilerini inceleyen ilk ayrıntılı çalışmadır.

Böylece;

Unilateral ve bilateral vazektomi sonrası germ hücrelerindeki apoptozis nasıl değişkenlik gösterir?

Ozonterapi apoptozisi nasıl etkiler?

Vazektomi yapılmış ratlarda, ozon tedavisinin, germ hücrelerinde e-NOS, i-NOS ekspresyonları üzerine etkisi nasıldır?

sorularının yanıtlarını bulmaya çalıştık.

1.1 ANATOMİ

1.1.1 Testis

Erişkinde testis yaklaşık olarak 4x3x2.5 cm. boyutlarında olup, 15-25 ml hacminindedir (5). Testis parankimi en dışta tunika vajinalisin visseral yaprağı, tunika albuginea ve en içte tunika vasküloza olmak üzere üç tabakadan oluşur. Tunika albuginea, testisin arkasında içeri doğru kıvrılarak mediastinumu oluşturur. Testisin ön ve dış yüzleri en dışta tunika vajinalis'in visseral yaprağı ile örtülmüştür. Bunun da dışında tunika vajinalisin paryetal yaprağı bulunur.

Testis parankimi, mediastinumdan kapsüle doğru uzanan septalarla 200-250 adet lobüle ayrılmıştır. Her bir septumda gelişmekte olan germ hücrelerinin olduğu ayrı bir seminifer tübül bulunur. 600-1200 adet olan tübüllerin toplam uzunluğunun 250 metre olduğu tahmin edilmektedir (6). Tübül duvarında gelişen germ hücreleri olgunlaşıp, spermatozoa haline geldiklerinde, seminifer tübüllerin lümenine dökülürler. Spermatozoa lümen içerisinde ilerleyerek, yoluna devam eder. Seminifer tübüller mediastinumda birleşerek rete testisi oluştururlar ve 15-20 adet efferent duktus halinde testisi terk ederek epididime ulaşırlar.

Seminifer tübüllerin en dışında konnektif ve elastik dokudan oluşan bir bazal membran bulunur. Bunun üzerine Sertoli hücreleri ve spermatojenik hücreler otururlar. Seminifer tübüller arasında ise interstisyum bulunur. İntertisyum total

testis volümünün %20-30'unu oluşturur. Testis dokusunun interstisyumu Leydig hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar ve lenf damarlarından meydana gelir.

Testisin innervasyonu renal plexus ve intermezenterik otonom sinir sisteminden olur. Somatik innervasyonu yoktur. Sinirleri arterlerini takip ederler.

Testis dokusunun 100 gramından dakikada 9 ml kan geçer. Sağ testisin kanlanması soldan daha fazladır. Testis ve epididimin beslenmesi internal spermatic arter, deferensiyal arter ve eksternal spermatic arter yoluyla olur. İnternal spermatic arter abdominal aorta'dan çıkar. Spermatic kordon içerisinde olguların %50'sinde bir, %30'unda iki ve %20'sinde ise üç adet arter bulunur (7).

Testis içerisinde venler karşılık gelen arterlerine eşlik etmezler. Parankimi drene eden internal spermatic venler sağda vena kava'ya, sol tarafta ise renal vene açılırlar (8).

1.1.2 Vaz Deferens

Wolf kanalından gelişir. 30-35 cm boyunda 2-3 mm çapında bir kanaldır. Epididimin kuyruğundan başlayarak, ejakulatör kanal ile sonlanır. 5 bölümü bulunur: a) Tunika vajinalis içindeki epididimal kısım b) Skrotal kısım c) İnguinal kısım d) Retroperitoneal kısım e) Ampulla.

En dışta adventisya tabakası bulunur. Hemen altında lümen düz kas hücreleri ile çevrelenmiştir. İçte ve dışta longitudinal, ortada ise sirküler kas tabakası bulunur. En içte lümeni çevreleyen epitel hücreleri yer alır. Arteri internal ilak arter yada umbilikal arterden bir dal halinde ayrılan deferensiyal arterdir. Hem sempatik hem de parasempatik sinir innervasyonu bulunur. Sempatik sinirleri hipogastrik sinirlerden presakral sinir yoluyla gelir.

Çok katlı yalancı epiteli proksimalde düzgün longitudinal kıvrıntılar yapar. İlerledikçe duvarı döşeyen kas tabakasının kalınlığı da azalır. Epiteli oluşturan 2 tip hücre vardır. Bazal hücreler ve kolumnar hücreler. Kolumnar hücreleri lümeneye kadar uzanırlar. Proksimal vaz epitelinin en sık rastlanılan hücreleri esas hücrelerdir.

Vaz deferensin spontan motilitesi sayesinde sürekli sperm taşınır. Hipogastrik sinirin uyarılmasıyla da kuvvetli peristaltik hareketlerde bulunarak içeriğini uretraya boşaltır. Ancak absorpsiyon ve sekresyon görevi daha önemlidir.

Özellikle ampulla bölümünde spermiyofajlar bulunur. Fazla spermatozoanın ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlarlar. Sekresyon ve absorpsiyon fonksiyonları ile vaz deferens lümeninde, spermlerin canlılıklarını ve matürte gelişimlerini sürdürebilirler. Fonksiyon yapabilmesi için androjen gereklidir (8,9,10).

1.1.3 Testis İnterstisyumu ve Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri interstisyumda seminifer tübüller arasında bulunur. Burada kan damarları, lenf damarları, mafrofajlar ve çeşitli hücreler bulunur (13,14).

Leydig hücreleri testis volümünün yaklaşık %5-12'sini oluşturur (11). Sağlıklı genç bir erkekte ortalama 700 milyon Leydig hücresi bulunur. Leydig hücrelerinin öncül hücrelerden gelişmesinde LH ve testis içindeki parakrin faktörler etkili olurlar (12).

Leydig hücre fonksiyonu hipofizinin iki hormonu ile ayarlanır: LH, testosteron üretimini uyarırken, prolaktin LH reseptör ekspresyonunu başlatır. Leydig hücreleri ikincil seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu testosteronu üreterek spermatogenezi devam ettirir.

Kolesterolün iki kaynağı mevcuttur. Ya dolaşımdan gelir ya da Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında kolesterol esterlerinden sentezlenir. Steroid üreten hücrelerde bulunan peroksizomlar kolesterolün biyosentezinde kullanılır (15). Oluşan testosteron hücre içerisinden hücre dışına çıkarak, kanda testosteron bağlayıcı proteine bağlanır. Testosteronun hücre dışında tutulması albumin, androjen bağlayan protein (ABP) ve testosteron-estradiol bağlayan proteinler tarafından sağlanır. Testosteron salınımı için primer uyarıcı LH'dır. LH'nın hücre içine girişi reseptör yardımıyla olur. Hücre içindeki LH ya kolesterolün mitokondri içine taşınmasında ya da kolesterolün P-450 aromataz enzimine bağlanmasında

görev alır. LH dışında FSH, prolaktin, LH-RH, inhibin, aktivin, epidermal growth faktör (EGF), prostaglandinler ve adrenerjikler de steroidogenezin gerçekleşmesinde görev yaparlar (8,9,16,17,18).

1.1.4 Seminifer Tübüller, Peritübüler Yapılar ve Sertoli Hücreleri

1.1.4.1 Seminifer Tübüller

Testisin fibröz septumları dokuyu 250 lobüle ayırmıştır. Her bir lobül 1-4 adet seminifer tübül içermektedir. Testis içerisinde toplam 600-1200 kadar seminifer tübül bulunmaktadır. Her bir tübül yaklaşık 80 cm uzunluğundadır. Rete testis seminifer tübüllerin açıldığı kanallar ağıdır (19-25). Seminifer tübül, merkezdeki bir lümen çevresinde bulunan ve sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreleri içeren özelleşmiş seminifer epitelden oluşmaktadır. Seminifer epitel bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden bir duvarla çevrelenmiştir. Seminifer tübül aralarında lamina propria denilen gevşek bağ dokusu ve bunların içerisinde damarlar bulunmaktadır. Bunlarında çevresinde Leydig hücreleri bulunur.

Destekleyici hücreler sertoli hücreleri ve bazal membranın destek hücrelerinden oluşur. Spermatogenez, spermatozoanın seminifer tübülde üretilerek lümeneye dökülmesi işlemidir. Yaklaşık olarak 74 gün sürer. Spermatogenez pubertede hipofizer gonadotropinlerin etkisi ile başlar. Germ hücreleri spermatogoniumlar, spermatozidler ve spermatozidlerden oluşmaktadır. Spermatozoa bunlar içerisinde en olgun hücre çeşidi olup, lümeneye dökülerek ileriye taşınırlar (8,9,26,27,28,29,30).

1.1.4.2 Peritübüler Yapılar

Bazal membranın dışında kollajen lif tabakası, bunun dışında miyoid hücreler, en dışta ise fibroblastların oluşturduğu adventisyal tabaka bulunur. Peritübüler miyoid hücrelerin kasılma ve sekresyon yapma özellikleri vardır. Miyoid hücreler P-Mod-S, fibronektin ve kollajen tip I'i sekrete ederler. P-Mod-S parakrin faktör olup, FSH tarafından uyarılır ve sertoli hücrelerinin fonksiyonunda görev alır. Miyoid

hücrelerin kasılmasıyla seminifer tübüllerde kasılır ve tübül lümenindeki spermler, taşıyıcı kanal sistemine yönelmiş olurlar.

1.1.4.3 Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelde bulunan en yoğun hücre tipidir. Puberteden sonra ise seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur.

Seminifer tübüllerin bazal membranı üzerinde yer alır, tübül lümenine kadar uzanan prizmatik hücrelerdir. Düzensiz kenarlı, heterokromatinden fakir, soluk nükleusu ve koyu boyanan nükleolusu vardır. Sitoplazmasındaki mitokondri sayısı çok fazladır.

Sertoli hücreleri sitoplazmik uzantıları sayesinde komşu sertoli hücreleriyle sıkı bağlantı oluşturur. Sertoli hücrelerinin seminifer tübül lümeni ile mikroçevre oluşturmak amacı ile kendi aralarında oluşturdukları bu bariyere kan-testis bariyeri adı verilir. Böylece germ hücrelerinin dış ortamla ilişkisi kesilir. Germ hücre fonksiyonları sertoli hücreleri sayesinde gerçekleşir. Sertoli hücrelerinin kendi aralarında yaptıkları bu sıkı bağlantılar aracılığıyla seminifer epitel bazal ve adluminal kompartman olarak ikiye ayrılır. Spermatogoniumlar ve genç spermatositler bazal kompartımda; olgun spermatositler, spermatidler ve spermatozoa ise adluminal kompartıman içinde yer alır. Spermatositler mayoz ile bölünürlerken, mayozun ileri evrelerinde bazal kompartımandan luminal kompartıman içine geçerler (8,9,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40).

Kan-testis bariyeri pubertede spermatogenez başladığı zaman oluşur. İmmün yeteneğin gelişmesinden çok sonra farklılaşan spermatogenetik hücreler yabancı olarak tanınır ve immün yanıt germ hücrelerinin hasar görmesine neden olan antikoları oluşturabilir. Bariyer, antikoların gelişmekte olan spermatogenik hücrelere ulaşmasını engeller ve spermatogenetik hücreleri oto-immün tepkilere karşı korur. Sertoli hücreleri kan-testis bariyeri sayesinde luminal kompartımda bulunan hücreler için dış ortamdan izole, özel bir mikroçevre yaratmış olur. Sertoli hücreleri dış etkenlere karşı germ hücrelerine kıyasla çok daha dirençlidirler (8,9,34,36,37,41,42,43,44).

Sertoli hücrelerinin spermatogenetik hücreleri destekleme, koruma ve besleme görevi dışında fagositoz, sıvı sekresyonu ve çeşitli moleküllerin salgılanması fonksiyonları vardır. Sertoli hücreleri testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayan protein(ABP) salgılar. ABP, Sertoli hücreleri içinde androjenleri bağlayarak, lümen içine ve buradan da epididime taşır. FSH salınmasını önleyen inhibin adlı peptidi ve FSH salınmasına katkı sağlayan aktivini salgılar. Diğer sertoli hücre ürünleri arasında ekstrasellüler matriksi oluşturan laminin, kollagen tip IV ve tip I, seruloplazmin, transferrin, büyüme faktörleri, dihidrotestosteron, testosteron, androstenediol ve östradiol sayılabilir. Sertoli hücrelerinin çalışmasında FSH ve testosteron önemli yer teşkil eder. P-Mod-S, komşu germ hücreleri ve östrojenin de sertoli hücre fonksiyonları üzerinde değişik etkileri bulunabilir(8,9,10).

1.2 Spermatogenez

Soluk tip A spermatogoniumlar seminifer tubüllerin bazal kompartımanında, bazal membran üzerine oturmuş durumda bulunurlar. Soluk tip A spermatogonyumların üzerinde sertoli hücrelerinin aralarında oluşturdukları sitoplazmik uzantılar bulunur. Tip A spermatogoniumlar, 4 kez mitoz bölünme geçirerek 16 adet daha ileri farklılaşmış Tip B spermatogonyumları oluştururlar. 24 günlük bir aradan sonra, bariyerden geçen spermatogonyumlar büyüyerek, daha büyük hücreler olan birincil spermatositler halini alır. Oluşan birincil spermatositler, birinci mayozun profazına girerler. Spermatogonyumlar mitoz ile bölünürlerken 2 adet nukleus oluştururlar, sitoplazmaları birbirinden kopmaz ve bu sitoplazmik köprüler aracılığıyla bağlantılı kalırlar. Bu köprü bağlantıları mayozda da devam eder ve bütün germ hücre basamaklarında görülür.

En az farklılaşmış germ hücreleri, ilk basamak hücre olan koyu tip A spermatogonyumlardır. Bunlar sürekli bölünerek kendilerini yenilerler ve yeni spermatogonyumlar oluştururlar. Bu şekilde spermatogonyum deposu sağlamış olurlar. Bazı spermatogoniumlar ise spermatositlere dönüşmek üzere önce tip A spermatogonyumları ardından da tip B spermatogonyumları oluştururlar(26, 27,28,44,45,46, 47).

Tip B spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek preleptoten primer spermatozoidleri oluştururlar ve mayoz bölünme ile çoğalmaya başlarlar. Mayoz bölünme spermatozoidlerin interfaz olmadan ardışık iki bölünme sonrası kromozom sayısını yarıya indirmesi ve spermatid kümelerini oluşturması olayıdır. Spermatozoidler oluştuktan hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profazına girerler.

Primer spermatozoidlerin 46 kromozomu vardır. Mayoz ilerledikçe sekonder kromozom sayısı da haploid hale gelir ve bu evredeki hücreye sekonder spermatozoid adı verilir. Sekonder spermatozoidler interfazda kısa süre kalırlar. Bu yüzden testis kesitlerinde görülmeleri zordur. Birinci mayoz bölünmeden sonra , ikinci mayoz bölünmeyi de tamamladıktan sonra hem kromozom sayısı hem de DNA içeriği haploid olan yuvarlak spermatidleri meydana getirmiş olurlar. Böylece her bir primer spermatozoidten 4 adet spermatid meydana gelmiş olur. Spermatozoidlerin oluşması aşamasında germ hücrelerinin yaklaşık %40'ı dejenerer olur (8,9,26,28,46,47,48,49).

Spermiyogenez spermatidin spermatozoaya dönüştüğü mayoz sonrasında uğradığı metamorfozdur. Bu sırada spermatidin sitoplazmasında ve nükleusunda önemli değişiklikler gerçekleşir. Sitoplazma içerisinde bulunan organeller yer değiştirir, sitoplazması azalır, spermatidin akrozomu ve kuyruğu oluşur. Spermatogenez hücreleri belirli spermatogenez hücreleriyle bağlantılıdır, sertoli hücreleriyle ise aralarında stoplazmik köprülerle bağlanmışlardır. Spermiyogenez spermatogenezin son aşamasıdır.

İnsanda seminifer tübüllerin her hangi bir kesitinde germ hücreleri hep belirli hücreler ile bir arada görülür. İnsanda bu döngü altı evreden oluşmaktadır. Ve her döngü 16 gün sürer. Spermatogonyumdan olgun sperm hücresi oluşana dek 4 döngü sonunda 64 gün geçirmesi gereklidir. Spermatogoniumdan spermatozoanın meydana gelmesi için geçen 64 günlük bu süreye ise spermatogenezik siklus adı verilir. Seminifer tübül duvarı üzerinde, Sertoli hücreleri arasında sıkışmış bazal membrandan lümeneye doğru dizilim gösteren çok sayıda germ hücresi bulunur. İnsanda en az 13 tip germ hücresi tanımlanmıştır: Koyu tip A spermatogonyumlar,

soluk tip A spermatogoniumlar, tip B spermatogoniumlar, preleptoten primer spermatositler, leptoten primer spermatositler, zigoten primer spermatositler, pakiten primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatid türleri ile spermatozoalardır. Farklı hücreler sürekli olarak aynı anda oluşurlar ya da peşi sıra birbirlerini takip ederler. İşte bu nedenle her gün milyonlarca spermatozoa yapılarak ejakulatta çıkabilmektedir. Sıçanda ise bir döngü 12-14 gün sürer ve 14 basamaktan oluşur (24,26,27,45,46,47,49).

1.2.1 Spermatogenezin Hormonal Kontrolü

Pubertede spermatogenezin başlatılmasında FSH ve daha az oranda testosteron salgısını uyaran LH görev alır. Testiste saptanan testosteron dolaşımdaki testosteronun yaklaşık 100 katı fazladır. Testosteron etkisini Sertoli hücrelerini uyarak gösterir. Daha önce başlamış olan spermatogenezin devam ettirilmesinde, testosteron etkilidir.

FSH Sertoli hücrelerinin ve belki de Leydig hücrelerinin gelişmesinden sorumludur. Yaygın görüş komplet spermatogenezin kalitatif olarak devam ettirilmesinde tek başına testosteronun, ama kantitatif sürdürülmesinde FSH'nın gerekli olduğudur. FSH spermatogenez süresince etkisini gösterir. Adenil siklaz yapımı ile cAMP artışı sağlanır. Aynı zamanda ABP'nin sentez ve salgılanmasından sorumludur. Bu protein testosterona bağlanarak bu hormonu seminifer tübül lümenine tasır. Böylece spermatogenez uyarılmış olur. Bu uyarı olmazsa spermatidlerin sperme dönüşmesi gerçekleşemez.

Hipotalamusun çıkarılması testislerde atrofi yapar. Bunlarda Leydig hücre hiperplazisi, peritübüler hyalinizasyon ve germ hücrelerinde azalmaya neden olur. LH Leydig hücrelerini uyarak testosteron salınmasını sağlar. Bu da spermatogenetik hücrelerin gelişiminde rol oynar. Testosteron sentezinin artması durumunda da LH salınımı baskılanır.

FSH yetersizliğine bağlı spermatogenezin kalitatif olarak sürdürülmesi tek başına testosteron ile mümkün iken, normalde olduğu gibi çok sayıda matür spermatidin yapılabildiği kantitatif düzeyde spermatogenezin sürdürülebilmesi için testosteron ile birlikte FSH'nın da verilmesi gerekir. Tek başına testosteronun etkili olmayışının nedeni testisler içerisinde yeteri kadar yüksek testosteron konsantrasyonunun sağlanmasındaki güçlüktür (8,9,10,26,28,45,50,51,52).

1.3 Erkek Üreme Sistemi Embriyolojisi

Üreme sisteminde farklılaşmamış dönem olarak adlandırdığımız dönemde her iki cinste de genital sistem birbirine benzerdir. Nitekim 7. hafta sonrasında erkek ve dişi morfolojik özellikleri farklılaşmaya başlar. Yani embriyonik gonadın farklılaşması normal embriyonun fenotipik gelişimini direkt olarak etkilemektedir. Üreme sisteminin gelişiminde, gonadlar üç farklı kaynaktan gelişirler.

- a) Karın arka duvarını döşeyen mezoderm epiteli
- b) Mezoderm epitelinin altındaki embriyonik bağ dokusu
- c) Primordiyal germ hücreleri

Mezonefrik ve paramezonefrik kanallar tüm embriyolarda gonadal dönemin erken dönemi olan ambiseksüel dönemde meydana gelir. Erkek ve dişi gonadlarının, genital kanallarının ve dış genitalerin gelişimi oldukça komplike bir olaydır ve genetik ekspresyon, gelişim zamanlanması ve cinsiyet hormonlarının arasında gelişen kompleksin bir sonucudur. Primordiyal germ hücreleri 4. hafta başında vitellüs kesesi içerisinde yer alır. Embriyo katlanır ve vitellüs kesesinin arka kısmı embriyonun iç kısmına ilerler. Bu sırada germ hücreleri gonad kıvrımına göç ederler. Şekillenmesi ilk olarak 5. haftada mezonefrik tüberkülün medial kısmında yer alan kalınlaşmış çöломik epitel bölgesinin ortaya çıkışı ile saptanır. Altıncı haftada da birincil cinsiyet kordonlarına yerleşirler. Çöломik epitel kabartısının yüzeyinde kalın bir hücre tabakası oluşur. Çöломik kavite içinde

gonadal tüberkül adı verilen uzantıyı meydana getirirler. Bu sırada mezonefrik tüberkül lateral ve medial olmak üzere iki kısma ayrılır. Lateral parça mezonefrik ve paramezonefrik kanalları içerirken, medial parça gonadal katlantı adını alır. Çoğalmakta olan çöломik epitel gonadal kordonları meydana getirir. Bu kordonlardan primordiyumun periferinde kalanlar korteksi oluştururlar. Anjiojenik mezenşim içeren mezonefrozun mezenşiminde orta kesiminden medulla gelişir. Paramezonefrik kanallar başlangıçta her iki cins embriyoda da gelişir.

Y kromozomu varlığında gonad testise dönüşmeye başlar Y kromozomundaki SRY geni testis belirleyici faktörün(TDF) sentezi için gereklidir. Bu faktörün etkisi ile birincil cinsiyet kordonları seminifer tübüle farklılaşır. Germinal kordonlar testis kordonlarını oluşturur. Bu kordon etrafındaki germ hücreleri ise spermatogonyumları oluşturur. Primordial germ hücreleri oldukça erken dönemde epiblastdan gelişir. Bir çok vücut hücresi ile karşılaştırıldığında, 12-20mm çapa kadar ulaşan büyüklükte oldukça iri hücrelerdir. Spermatogonyumlar puberteye kadar dinlenme evresindedirler. Seminifer tübüller arasındaki mezenşimden leydig hücreleri farklılaşır. Germ kordonlarının soma hücreleri ise sertoli hücrelerine farklılaşır. Testisin kordonları birbirleriyle anastomoz yaparak rete testisi oluştururlar. Seminifer tübüllerin lümeni pubertede spermatogenezin başlamasıyla oluşur. Erkekte paramezonefrik kanal Anti-Müllerian hormon(AMH) baskısı altında büyük oranda atrofiye uğrar. AMH testisin Sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Testosteron ise Leydig hücrelerince 8. haftada salgılanmaya başlar. Testosteron ise mezonefroz kanalını epididime dönüştürerek erkek cinsiyet organlarının gelişimini uyarır. Mezonefroz kanallarından duktus epididimis ve vaz deferens gelişir. Mezonefrozun dejenere olması ile testisin skrotuma inişinde yol gösterici olan gubernakulum oluşur. 28 haftada gubernakulumun kasılmasıyla testis ve epididimis skrotuma iner.

Spermatogenez puberte ile başlar. 8 haftalık bir embriyoda her bir seminifer tübülde ortalama 1.1 gonosit bulunurken, bu sayı gittikçe artar ve 22. haftada 3.5'e erişir. Doğumdan sonra 7 yaşına kadar testislerde büyük bir morfolojik değişiklik olmaz. 7-9 yaşından sonra ise gonositlerin mitotik aktiviteleri ve bununla uyumlu

olarak seminifer tubül lümeninin periferinde toplanan spermatogonium sayısı artar (8,9,10,53,54,55,56,57,58,59,60).

1.4 Erkek Üreme Sistemi Fizyolojisi

Spermatogenezis erkekte üreme fonksiyonunun ana konusudur. Spermatogenezis için gerekli olan testosteronun yapımı Leydig hücrelerinde gerçekleşir. Pampiniform pleksusun testiküler arter etrafını sarması sayesinde ısı ve testosteron alışverişi sağlanır. Testislerin skrotum içerisinde yerleşmiş olması sayesinde vücut ısısından 1 derece kadar daha soğuk ısıda kalması sağlanır. Bu sayede sperm yapımı ve yaşamı sağlanır (27,50,52,61).

Folikül Stimulan Hormonun ön hipofizden salınarak, adenilat siklaz aracılığı ile cAmp artışına neden olur ve sertoli hücrelerinin androjen bağlayıcı protein salgılamasını uyarır. Oluşan ABP testosterona bağlanarak seminifer tübül içerisine taşınırlar, ve spermatogenez uyarılmış olur. Adenohipofizden salınan Luteinizan Hormon ise Leydig hücrelerinin spermatogenetik hücrelerin gelişimi için gerekli olan testosteronun salgılanmasını uyarır. Östrojen ise sertoli hücrelerinde testosterondan yapılmaktadır.

İnhibin B gonadotropin sekresyonunu inhibe eden gonadal kökenli, glikoprotein yapısında bir hormondur. Günümüzde erkek kan dolaşımında var olan tek inhibinin sertoli hücrelerinde üretilen ve germ hücrelerinin kontrolünde salınan inhibin-b olduğu bilinmektedir (63,64). Bununla birlikte, inhibin-b infertil hastalarda spermatogenezisin önemli bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (65,66). Yetişkin erkeklerde inhibin-b sentezi FSH düzeyi ve spermatogenezin durumuna bağlıdır. Ayrıca, serum inhibin-b seviyesi testis hacmi ve sperm sayısı ile de oldukça güçlü ilişki göstermektedir (67,68). Spermatogenezin belirleyicisi olarak inhibin-b ve FSH'ın birlikte kullanımı tek başlarına kullanımlarından daha anlamlı sonuçlar verdiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (68,69). Son yıllarda erkek reproduktif sistemi üzerine etkili hormonların (testosteron, östradiol) sadece

plazma değil seminal plazma konsantrasyonlarının da önemli olduğuna dair yayınlar vardır (70,71).

Spermin beslenmesini ve hareketini artırmak amacıyla aksesuar bezlerden salgılanan fruktoz, tamponlu tuzlar ve fosfolipidler salınır. İnsanda günlük sperm üretimi testis başına 94.6 milyon olarak hesaplanmıştır. Ph'sı 7.4-8.4 civarındadır. Semen %90'ı sudur. Semen başlıca enerji kaynağı olarak fruktozu kullanır. Ayrıca kalsiyum, çinko, magnezyum, vitamin C, i-NOSitol, bakır ve kükürt gibi eser elementlerde semende bulunmaktadır. Hyaluronidaz enzimi sayesinde vajinanın müköz salgısını eriterek spermatozoa hareketini artırır (26,31,39,49,50,51,62).

1.5 Vaz Obstrüksiyonu

Vaz deferens obstrüksiyonu, iyatrojenik, post travmatik, inflamasyona veya vazektomiye sekonder olarak ortaya çıkabilmektedir (72). Kontrasepsiyon amaçlı vazektomi sonrası vas deferens obstrüksiyonu en sık görülen akkiz obstrüksiyondur. Herni onarımı sırasında meydana gelen yaralanmalara bağlı veya kistik fibrozis mutasyonları ile birlikte görülen konjenital vaz deferens agenezi hastalarında da vazal obstrüksiyon olabilir(73,74).

Nüfus artışı da infertilite kadar toplumdaki önemli bir sorundur. Ülkemizde çiftlerin yaklaşık %40'ı aile planlaması için kontraseptif yöntemlere başvurmaktadır. Kontrasepsiyon yöntemi kullanan çiftlerin yaklaşık üçte biri, erkeğin katılımını gerektiren yöntem kullanmaktadırlar. Geri çekme, kondom, hormonal erkek kontrasepsiyonunu ve vazektomi başlıca yöntemlerdir (75).

Vazektomi, erkeklerde bütün dünyada giderek yaygınlaşmakta olan en etkili, güvenilir ve kalıcı kontrasepsiyon yöntemidir. Erkek kontrasepsiyonunun diğer metodları ya güvenli değildir yada hormonal yaklaşımda olduğu gibi araştırma aşamasındadır. Çin'de yaklaşık 8 milyon, A.B.D.'de ise yılda 500 bin erkeğe vazektomi yapılırken ülkemizde bu rakam oldukça düşüktür. Ancak dünya genelindeki vazektomilerin sayısı, kadınlarda uygulanan tüp ligasyonundan oldukça azdır. Vazektomini tüp ligasyonuna kıyasla daha kolay, daha ucuz ve

komplasyonları daha az olan bir yöntem olmasına rağmen erkeklerin vazektomiye daha az tercih etmelerinin önemli nedeni bu yöntemin geri dönüşümsüz olduğu düşüncesidir (76,77).

Vazektomi kalıcı cerrahi sterilizasyonun en basit ve en etkili metodudur (78). Vazektomi uygulanacak erkekler kalıcı kontrasepsiyona ilgi duymalıdır. Bu yöntem uygulanmadan önce çift mutlaka bilgilendirme yapılmalıdır. Vazektominin geri dönüşümü ihtimali tartışılmalı olduğu için hasta başarısızlık ihtimali hakkında bilgilendirilmelidir (79).

Vazektomi yöntemine ilişkin çeşitli teknikler mevcuttur. Bistürisiz vazektomi tekniği en yaygın ve en az invaziv yöntem olarak görünmektedir (80,81).

1.5.1 Vazektomi Tekniği

Vazektomi, lokal anestezi ile rahatlıkla uygulanabilecek bir girişimdir. Cerrahi ön hazırlık yapıldıktan sonra kişi sırtüstü pozisyonda masaya yatırılır ve uygun genital alan temizliğini takiben skrotum içerisindeki vaz deferens tesbit edilerek, iğne perivazal kılıf içinden eksternal inguinal ringe doğru ilerletildikten sonra vaz etrafına iğne oynatılmaksızın 3–5 ml lidokain enjekte edilir. Konvansiyonel vazektomi tekniğinde skrotal cilde anestezi yapılan yerlerden yaklaşık 1 cm lik insizyonla girilerek vaz deferens ortaya çıkarılır. Etrafındaki deferansiyal arter, ven ve sinirden serbestleştirildikten sonra vaz kesilerek küçük bir segmentide eksize edilir. Vaz deferensin proksimal ve distal uçları koterize edilip bağlandıktan sonra kanama kontrolü yapılır. İşlem her iki tarafa da uygulanır. İnsizyon yeri suture edilerek kapatılır.

İşlem sonrası kişinin 2-3 gün süreyle istirahat etmesi, bir hafta sonra kontrole gelmesi önerilir. Antibiyotik önerilmez. Üç ay boyunca başka bir yöntemle korunması önerilir. Üç ay sonra yapılan kontrol spermiyogramında sperm saptanmaz ise işlem başarılı kabul edilir.

Konvansiyonel vazektomi yönteminde mortalite 1/300.000, yan etki insidansı ise %2'dir Vazektomiden sonra en çok rastlanılan komplasyonlar, enfeksiyon, hematoma ve sperm granulomudur. Vaz deferensin testiküler ucundan sperm kaçağı olduğu durumlarda sperm granulomu oluşabilir. Sperm vücutta antijenik olarak

tanındığından yoğun bir inflamatuvar reaksiyon oluşumuna neden olmasına rağmen sperm granülomları sıklıkla asemptomatik seyreder (82-87).

Vazektomi uzun dönemde kronik testiküler veya epididimal ağrı, vajinitis nodoza, testiküler fonsiyon bozukluğu, epididimal obstrüksiyon ve prostat kanseri insidansında artışa neden olabilir. Vazektomi yapılan vakalarda kan-testis bariyerinin bozulması nedeniyle % 60-80 sıklıkla antisperm antikorlarında artış saptanabilir.

Vazektomi uygulanan erkeklerin %2-9'u sonradan vazektomi onarımı için başvurmuştur. İlk planlanan işlem vazovazostomi ve uç-uca anastomoz olmalıdır. Ameliyat başarısı genellikle %90'ın üzerindedir. Vazektomi yapılanlarda obstrükte kısımdan geriye doğru olan kronik hidrostatik basınç artışı daha proksimaldeki kısımların dilatasyonuna neden olur. Bu kısımlardan olabilecek sperm kaçığı enflamasyona ve spermin immun sistemin tarafından antijenik olarak tanınması nedeniyle lokalize granülom oluşmasına sonrasında ise fibrozis ve obstrüksiyon gelişmesine neden olabilir.

Vazektomi sonrası vazovazostominin başarısı vazektomiden sonra geçen zamana, vazektomi tipine, geri dönüşüm için seçilecek cerrahi işleme bağlı olarak geniş bir aralıkta cerrahi başarı oranları bildirilmiştir.

Vazektomiden geri dönüşüm işlemine kadar geçen uzun süre tedavi başarısını olumsuz etkilemektedir. Belker ve arkadaşları 1469 adet mikrocerrahi vazektomi geri dönüşümü uygulanan erkeğin sonuçlarını bildirdiler ve vaz devamlılığı ve gebelik oranlarını sırasıyla şu şekilde açıkladılar. Vazektomi sonrası 3 yıla kadar olan interval için % 97 ve % 76, 3-8 yıllık interval için % 88 ve % 53, 9-14 yıllık interval için % 79 ve % 44, 15 yıl ve üzeri interval için % 71 ve % 30. Post-vazektomi infertilitenin en uygun maliyetli efektif tedavi yaklaşımı, mikrocerrahi geri dönüşümdür. Bu yöntem sonrası gebelik oranları en yüksektir. Multiple gebelik ve over hiperstimülasyonu riskleri ile ilişkili olan kadın partnerin hormonal tedavisi olmaksızın, başarılı bir vazektomi geri dönüşümünden sonra çiftler bir aileye sahip olabilir. MESA/TESE ve ICSI başarısız cerrahi için akılda tutulmalıdır (88).

1.6 Apoptozis

1.6.1 Apoptozisin Tanımı

Organizmadaki hücrelerin programlı ölümü veya hücre intiharı anlamına gelmektedir. Organizmadaki hücreler bir yandan sentez edilirken bir yandan da hücre ölümü gerçekleşir. Bu olaylar bir denge halinde sürer gider. Apoptozis hücrenin yaşam siklusu boyunca yapım yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar (89,90).

Apoptozis birçok gen tarafından koordineli bir şekilde düzenlenen seri olayların sonucu olarak istenmeyen hücrelerin eliminasyona uğramasıdır (92,93) Yunancada apo-toe-sis kelimesinden köken alır ve sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelir (94).

Apoptozis terimi ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde kromatin parçalarını yoğun olarak gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak isimlendirmiştir (95).

Hücre tipine göre yaşam süreleri değişkenlik göstermektedir. Örneğin nöronlar ömür boyu yaşarlarken, bağırsak hücreleri 3–5 gün yaşarlar. Epidermal hücreler ise yaklaşık bir aylık süre sonunda yaşamlarını yitirirler. Tüm bu ölümler fizyolojik koşullarda ortaya çıktığı için fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (96).

Hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar nekroz ve apoptozistir. Klasik hücre ölümü nekroz olarak adlandırılır. Hücre ölümünün bir diğer şekli olan apoptoziste ise sıklıkla hücreler tek tek etkilenir. Apoptozis fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkabilir.

Fizyolojik apoptozis görülen olaylar (125-128);

Embriyogenez boyunca meydana gelir. Örneğin fetüs implantasyonu ve organogenezis aşamalarında yoğun olarak saptanır.

Menstrüasyon sırasında endometrial hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması, laktasyondan sonraki dönemde meme bezlerinin rejenerasyonu

Barsak kriptlerinde olduğu gibi sürekli çoğalan hücrelerin sayılarını azaltmak amacı ile

İmmün hücrelerin seçimi sırasında görülebilir.

1.6.2 Apoptozis Morfolojisi

Hücre büzülmesi: Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, organellerini kaybederek boyutları küçülmeye başlar, sitoplazmaları yoğunlaşır. Organeller göreceli olarak normal olmalarına rağmen daha sıkı bir hal alırlar. Bu büzüşmenin nedeni plazma membranında bulunan Na, K, Cl taşıyıcı sistemin fonksiyonunu yitirmesi nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin ortadan kalkmasıdır (103).

Kromatin kondansasyonu: Apoptozisin en karakteristik özelliğidir. Kromatin nükleer membranın altında iyi sınırlı, yoğun kitleler olarak kümelenir. Nükleus daha fazla parçaya ayrılabilir (99).

Apoptotik cisimlerin oluşumu: Nükleer parça içerebilen membranla çevrili sitoplazma ve organel parçacıklarına dönüşür. Apoptotik hücre plazma membranında meydana gelen tomurcuklanmalar sayesinde apoptotik hücreler tanınır.

Apoptotik cisimler ve hücrelerin fagositozu: Membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanarak fagositoz uyarılmış olur (101). Yakındaki komşu hücreler, parankimal hücreler ve makrofajlar, apoptotik cisimleri fagosite eder. Apoptotik cisimcikler lizozomlar içinde parçalanır, komşu hücreler ise proliferasyon olarak apoptotik hücrenin boşluğunu doldurur (104).

Hematoksilen-eozin ile boyanmış dokularda, apoptoz tek hücreyi veya hücre kümelerini tutar. Apoptotik hücreler oval veya yuvarlak, yoğun eozinofilik sitoplazmalı, dens nükleer kromatin parçaları ile birlikte görülür. Hücre küçülmesi ve apoptotik cisimlerin oluşması hızlıdır ve parçalar hızla fagosite edilir, parçalanır veya lümene dökülür. Histolojik kesitlerde görünür olmadan önce dokuda anlamlı apoptozis meydana gelebilir. Apoptozis, nekrozdan farklı olarak inflamasyon oluşturmaz ve bu da histolojik olarak saptanmasını güçleştirir (129,130).

Cohen'in 1993 yılında timus hücreleri üzerinde yaptığı çalışma neticesinde apoptozisin genler tarafından regüle edilen hücre ölümü olduğu saptanmıştır (97,98). Apoptotik hücrelerin ortaya çıktığı kesitler ışık mikroskopunda

incelendiğinde, bu hücrelerin etrafında parlaklık göze çarpmaktadır (101). İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder pattern' olarak tarif edilen merdiven şeklinde bir görünüm ortaya çıkar (100). Hücre arka arkaya meydana gelebilecek yedi kırılmayı onarabilirken, apoptoziste meydana gelebilen 300000 kırılma onarılmaz (101, 102).

Apoptotik cisimciklerde sitokin salgılanması meydana gelmez ve inflamasyon gözlenmez. Apoptozis 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Apoptozis esnasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme belirtilen morfolojik değişikliklerdendir (105).

Nekrozda ise hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranında yırtılma meydana gelir. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis yoluyla mı yoksa nekroz ile mi öleceğine karar verir. Burada mitokondrinin rolü önemlidir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamaz ve nekroz ile ölür (106).

1.6.3 Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar

Nekroz patolojik şartlar altında oluşur fakat apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde rol oynar. Nekrozda hücre şişerken apoptotik hücre bunun aksine küçülür. Nekrozda kromatin patterni normale yakındır. Apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının etrafında yoğunlaşır. Nekrotik hücrenin plazma membranı sağlam değildir. Apoptotik hücre membranı bütünlüğünü korur. Nekrotik hücre sonradan lizise uğrar. Apoptik hücre küçük cisimciklere parçalanarak fagosite edilir. Nekrozda inflamasyon mevcuttur. Apoptoziste inflamasyon oluşmaz (108-111).

Çizelge 1 Apoptozis ve Nekroza yol açan nedenler

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol açan nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stres

Çizelge 2 Apoptozis ve Nekrozun Morfolojik Özellikleri

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZİS
Morfolojik özellikler	Hücre membran bütünlüğünün kaybı Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntakt hücre membranı Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücrenin intakt mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması

Çizelge 3 Apoptozise ve Nekrozun Biyokimyasal Özellikleri

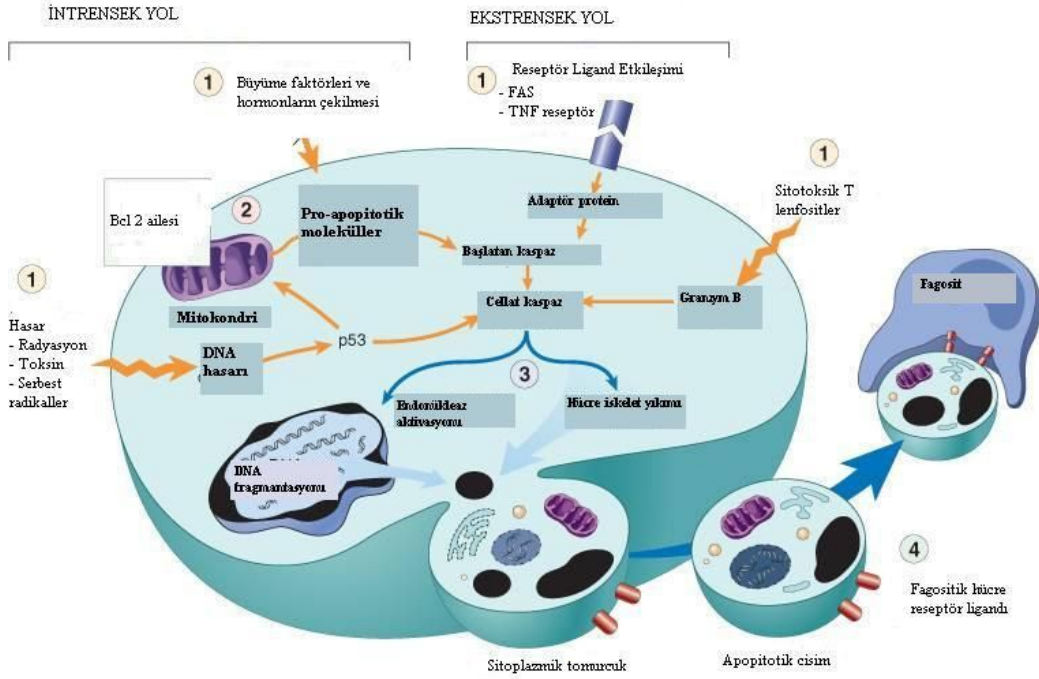
ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Biyokimyasal özellikler	Bozulmuş iyon hemostazı ATP gerekmez (pasif süreç) +4 C°'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezisinde 'smear' görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 C°'de gerçekleşmez DNA internuklezomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır agaroz jel elektroforezisinde merdiven görüntüsü Prelitik DNA fragmentasyonu (erken evrede gerçekleşir)

1.6.4 Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis süreci, DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir (107). Apoptozis sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteindir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozisde gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (131,132).

Tümör nekroz faktörü (TNF), nöron büyüme faktörü (NGF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler hücre dışı uyarı yoluyla hücreyi apoptozise götürebilir (107). Bu uyarılar hücre içinde Ca artışına neden olarak cAMP gibi hücre içi ikincil habercileri aktive edebilmektedir. Örneğin sitoplazmik Ca⁺⁺ miktarındaki artış, c-fas, -myc, sıcak şok proteini gibi mRNA basamaklarını harekete geçirir. Ayrıca apoptoziste etkili

endonükleaz, transglutaminaz gibi enzimlerde aktive eder. Bunlarda kromatinde parçalanmaya, hücre iskeletinde ve sitoplazmik proteinlerde değişikliklere neden olur. Sitoplazmik kalsiyum, kalmoludine bağlanırsa apoptozis inhibe edilebilir.



Şekil 1: Apoptozun Mekanizması
Kumar V. Abbas A, Fausto N. Cellular Adaptations, Cell Injury and Cell Death. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N., eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. Elsevier Philadelphia, 2005;7th ed:26-32.

Apoptozisin indüklenmesinde üç sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir.

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis
2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile apoptozis
3. Endoplazmik Retikulum aracılığı ile oluşan apoptozis

Bazı durumlarda apoptozis hücrel stresini takiben oluşan hücre içi sinyaller sonucunda başlatılır. Hücrel stres radyasyon, kimyasallar yada viral enfeksiyona maruziyetle oluşabilir. Büyüme faktörlerinin eksikliğinde veya oksidatif stres sonucu olarak da hücrel stres oluşabilir. Genel olarak hücre içi sinyaller apoptozisi mitokondri aracılığı ile gerçekleştirir (112).

1. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis

Hücre ölümünün düzenlenmesinde mitokondri önemli görevler üstlenir. Bcl-2 ve Bcl-XL gibi Bcl-2 protein ailesinin anti-apoptotik elemanları, mitokondri

membranının dış yüzeyinde yer alır ve hücre yaşamını devam ettirmeye çalışırlar. Bad ve Bax gibi Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyelerinin çoğu Bcl-2 ve Bcl-XL ile veya mitokondri membranı ile ilişki kurarak mitokondri üzerinden etkilerini gösterirler.

AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Mitokondri sitokrom-c salınımı ile pro-kaspaz-9 ile beraber Apaf-4 ve ATP kompleks oluşturularak kaspaz-9'u aktive ederler. Oluşan bu kompleks apoptozom olarak isimlendirilir. Bu aktivasyon sonucunda kaspaz kaskadı başlar. Bu proteolitik aktivite sonucunda sitoplazmadaki proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve apoptozom oluşturularak hücrenin fagositozu sağlanmış olur (113-121).

2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile apoptozis

Apoptozisin salgıdan bağımsız bu mekanizması, hücre zarı üzerinde bulunan ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ile ilişkilidir. Apoptotik işaretin uyarıcısı olan Fas, birçok hücre tipinde bulunur. Fas ligandı (FasL) da TNF ailesinin bir üyesidir. Özellikle sitotoksik T hücreleri ve Naturel Killer hücreleri üzerinde bulunur. FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Bu mekanizma, bir immun tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs ile enfekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. TNF'in TNFR-1'e bağlanmasıyla da benzer olaylar şekillenir. Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantısı, bir ölüm alanını içerir. Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD (Fas Associating protein with a Death Domain protein) ve RIP (Receptör Interacting Protein) ile etkileşimdedir. Ölüm alanlarını içeren bu TRADD ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozisi doğrudan uyarırlar. Aktive olan kaspaz-8 daha sonra diğer kaspazları aktive ederek apoptotik döngü başlatılmış olur (122,123).

3. Endoplazmik Retikulum aracılığı ile oluşan apoptozis

Endoplazmik retikulum membranında yer alan Kaspaz-12, Ca⁺⁺ seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile aktifleşir. Aktive

olan kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (124).

1.6.5 Apoptozun Genlerle Kontrolü

Hücre içi uyaranlar büyüme faktörleri, onkogenler ve tümör süpresör genlerdir. Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (101). İnsanda apoptozisin düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Toksik olaylar neticesinde gelişen hücre hasarı p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanır. Ardından da G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptozise yönlendirir. p53'ün bir diğer görevinin Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlemek olduğu düşünülmektedir. p53'ün apoptozisi indüklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Papillom virüsü, adenovirüs tip 12 gibi virüsler ya p53'ü inaktive ederek ya da Bax'a bağlanarak apoptozisi bloke ederek karsinogenezise yol açarlar.

Apoptozisin regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi vardır. Bu genlerden bazıları antiapoptotik, bazıları ise proapoptotik genlerdir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Bcl-2, Bax ile heterodimer oluşturduğunda Bcl-2 etkisini antagonize ederler. Proapoptotik ve antiapoptotik genlerin oranları hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceğine karar verir. Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar (101).

Çizelge 4: Apoptozisi baskılayan ve indükleyen genler

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
<p>Bcl-2</p> <ul style="list-style-type: none"> • BHRL-1 • bcl-xl • bcl-w • bfl-1 • brag-1 • mcl-1 • A1 <ul style="list-style-type: none"> • Nr-13 • ras onkogeni • Ced-9 • p35 • A20 	<p>•Bcl-2</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bad • Bax • Bak • Bcl-xS • Bid • Bik • Hrk1 <ul style="list-style-type: none"> • c-myc • p53, p21 • fas (CD95/APO1) • (İCE) • LOH (MTS1/CDK41)

Bcl-2, 24–26 kDa’luk protein kodlar. Oluşan protein, mitokondrinin dış membranı üzerinde yerleşmiştir. Bu proteinler iyon alış-verişini düzenler ve membranın parçalanmasına karşı koruyucu etki yaparlar. Antiapoptotik genler içinde yer alan Bcl-xL’in mitokondriyal hasarı engellediği ileri sürülmektedir. Bu sayede apoptozis inhibisyonu gerçekleşmektedir. Bcl-2 ailesinin bir diğer ilginç özelliği de reaktif oksijen düzeylerinin apoptozis üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol etmesidir. Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının geçiş poruna bağlanırlar. Membranda oluşan değişiklikler sonucunda sitokrom c ve AIF (Apoptozis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler.

1.6.6 Apoptozis Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

1972 yılında, apoptozis saptandığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Günümüzde morfolojik değerlendirmelerin yanısıra apoptozise özgü

aktivasyonlar moleküler düzeyde belirlenebilmektedir. 1990'lı yıllarda DNA kırıklarının saptanması ve apoptotik hücrelerde aktif kaspazların belirlenmesi ile tanınan apoptozis daha sonraki yıllarda fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle saptanmaya başlandı. 2000'li yıllarda ise keratin 18'in kırıldıktan sonraki formunu saptayan antikorların kullanılması ile daha da özgünleşti.

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmünolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

1.6.6.1 Morfolojik görüntüleme yöntemleri

I. Işık mikroskobu

a. Hematoksilen boyama: Hematoksilen boyama kromatini boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptozise özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi, sitoplazmik küçülme, kromatinin kondensasyonu, nukleusun küçülmesi ve parçalara bölünmesi

b. Giemsa boyama: hematoksilenle boyamaya benzer şekilde nukleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırlarının daha iyi seçilmesi dışında belirgin bir üstünlüğü yoktur.

II. Floresan mikroskobu

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden kromatini görünür hale getirir. Bu boyama yöntemindeki prensip, hücre plazma membranının intakt olup olmadığıdır. Membranı intakt olan hücreler propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlar. Bu hücreler bir floresan mikroskobu ile tanınabilir. Ölü hücrelerin apoptozisle mi yoksa nekrozisle mi öldüklerinin ayırımı nukleus morfolojisine bakılarak yapılır.

III. Elektron mikroskobu

Apoptozisi değerlendirmede en değerli yöntemdir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlendiği bir yöntemdir. Mitokondrinin durumu, plazma membranı ve nukleus membranının bütünlüğü daha net değerlendirilir. Elektron mikroskobu çalışmalarında apoptotik hücrede sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu seçilmesine olanak verir.

IV. Faz kontrast mikroskobu

Bu tür mikroskop kültür ortamında, hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır.

1.6.6.2 Histokimyasal yöntemler

I. Anneksin V Yöntemi

Apoptotik hücrede membran dışına transloke olmuş fosfatidilserinin florasan madde ile işaretlenmiş olan Annexin V kullanarak görüntülenmesi sayesinde apoptotik hücrelerin saptanmasına esasına dayanır.

II. TUNEL Yöntemi(TdT-mediated nick and labeling technique)

TUNEL, apoptotik sinyal kaskadında DNA kırıklarının saptanmasında sıklıkla kullanılan değerli bir yöntemdir. İlk kez 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Apoptoziste sonlandırıcı proteinler aktive olduktan sonra sitoplazma ve çekirdekte hedef proteinleri yıkarlar. Bu proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca-Mg bağımlı endonükleaz DNA kırıkları oluşturur Apopitotik hücrelerde DNA'lar paralandıklarından kromatin bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA kırıkları oluşur. Hücrede terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin-dUTP'yi parçalanmış DNA kırıklarının serbest 3-OH uçlarına transfer eder. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları avidin eklendiğinde görünür hale gelirler. TUNEL yöntemi bu DNA kırıklarının saptanmasını sağlar (133-137).

III. M30 Yöntemi

Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden epitelyal kaynaklı dokularda ortaya çıkacak apoptotik hücrelerde sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılır. Ortaya çıkan antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması ile apoptozis saptanmış olur.

IV. Kaspaz-3 Yöntemi

Kaspaz-3 eksprese edebilen dokularda çalışılabilen bu yöntemde apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 'ün oluşması esasına dayanır.

1.6.6.3. Biyokimyasal Yöntemler

I. Agaroz Jel Elektroforezi

Apoptoziste DNA kırıklarının oluşumu sonucunda merdiven görüntüsü oluşur. Apoptozisi nekrozdan ayıran bu DNA kırıkları bu yöntemle saptanabilir.

II. Western Blotting

Bu metod yardımıyla apoptozise özgü proteinlerin ekspresyonları veya kırılmaları saptanabilir. Hücre sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonlara ayrılarak hücre membranını geçip geçmediği anlaşılır. Sitoplazmada saptanan sitokrom c sayesinde apoptozise giden hücreler saptanmış olur.

III. Flow Sitometri

Apoptoziste eksprese olan yüzey proteininin floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak saptanması olayıdır. Kısa sürede kolaylıkla uygulanabilir olması ve kantitatif sonuç verebilmesinden dolayı avantajlı bir apoptozis saptama yöntemidir. İki farklı şekilde uygulanabilir. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak, hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarı kıyaslanır. Azalan DNA miktarı apoptozis göstergesidir. Bir diğer yöntem Annexin V ile floresan mikroskopuyla kısa sürede yapılabilir.

1.6.6.4. İmmünolojik Yöntemler

I. ELISA

ELISA ile hücre populasyonlarında veya plazmada DNA fragmentasyonu ve M30 düzeylerinin ölçümü yapılabilir.

II. Flourimetrik Yöntem

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz moleküllerinin tutulması sağlanır. Sonra ortama kaspazların parçaladığı ve floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olan floresan şiddeti, fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanmış olur.

1.6.6.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

I. DNA Microarrays

Gen ekspresyon derecelerinin tespiti sayesinde apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumlarının belirlenmesi hedeflenir.

1.6.7 Spermatogenezde Apoptozisin Rolü

Apoptozis fizyolojik koşulların korunmasında, doku canlılığının devamını sürdürmede, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında etkili olan programlı hücre içi ölümü olarak tanımlanabilir. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücrelerin farklılaşarak olgun sperm oluşmasıdır. Testiküler dokuda germ hücrelerinin farklılaşması ve gelişmesi esnasında görülen germ hücre ölümü, spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir. Testis hasarına neden olan durumlarda belirgin bir şekilde artış gösterir. Germ hücrelerinin apoptozisinin kontrolünde sertoli hücreleri sorumludur. Apoptozis sıklıkla Sertoli hücrelerinde, spermatositlerde, erken ve geç spermatidlerde olur. Leydig hücreleri, spermatogonia, peritübüler konnektif doku

hücreleri ve endotelial hücreler ise daha az sıklıkla apoptozise giderler. Erken evrede başlayan germ hücre apoptozisi nedeniyle bu hücrelerin %75'i eliminasyona uğrarlar. Bu süreçte germ hücreleri ile sertoli hücreleri arasındaki oran korunmuş olur (138-147).

Spermatogenez sırasında ortaya çıkan apoptozis hormonal etki altındadır. Androjen eksikliğinde, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda, deneysel varikosektomi ve vazektomi uygulanmış ratlarda, testiküler dokudaki programlı hücre ölümlerinde artış gösterilmiştir. Matürasyon arresti ve hipospermatogenezis nedenleri de apoptozise yol açabilir. Hipofizektomi uygulanan ratlarda germinal hücrelerde ortaya çıkan apoptozisin hcg tedavisi ile engellenebildiği gösterilmiştir. Apoptozisin sonucu olarak ratlarda azospermi ve oligospermi görülebilir. Isı, radyasyon, hipotermi gibi eksternal faktörlerde seminifer tübül epitelini etkileyerek programlanmış hücre ölümlerini artırabilir. Sonuç olarak, testiküler fizyolojiyi bozan tüm durumlarda patolojik düzeylerde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite gözlenebilir (148-157).

1.6.8 Vazektominin Spermatogenez Üzerine Etkileri

Vazektominin spermatogenezde testis üzerine etkileri açıklığa kavuşturulamamıştır. Seminifer tubullerde basınç artışı ve otoimmün reaksiyonlar, oksitadif stres, testiküler ısı artışı spermatogenezini etkileyen faktörlerden başlıcalarıdır (142,143,146,150).

Vazektomi geçiren olguların %70'e yakını spermatozoaya karşı otoimmünite gelişimi gösterirler. Bu durum vazektomi geçirenlerin serum ve semenlerinde antisperm antikorları saptanması ile desteklenmiştir.(154,158)

Dym ve arkadaşları vazektomi sonrası spermatogenezin azaldığını öne sürmüşlerdir. Testiküler disfonksiyon, sertoli hücrelerindeki vakuolizasyon veya endokrin bozulmanın sonucu olarak ortaya çıkabilir. Mo ve ark. vazektomi sonrası FSH düzeylerindeki artışı tespit etmişlerdir (42).

Gine domuzlarında yapılan çalışmada vazektomi sonrası seminifer tübüllerde ortaya çıkan inflamatuvar reaksiyonlar, interstisyel fibrozisi tetiklemiş olabilir. Bunun sonucu olarak da ortaya çıkan seminifer duvar yapısındaki kalınlaşmalar spermatogenezisi azaltmış olabilir.

Spermatogenez elektrolit ve transmembran gradientlerindeki bozulmalardan da etkilenebilir. Wang ve ark.vazektomi sonrası Na, K⁺ ve ATPase aktivitelerinde azalma, bunun sonucu olarak ta cAMP ve ATP üretiminde azalmayı histolojik olarak saptamışlardır. (87)

Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanların üretimi denge halinde sürmektedir. Vazektomili bireylerde oksidatif stresin sperm ürünleri üzerine etkisi son zamanlarda ortaya çıkarılmıştır. Vazektomi sonrası bu dengenin bozulması ile oksidatif stres baskın hale gelebilir. Reaktif oksijen radikalleri ve reaktif nitrojen türevleride (başlıca nitrik oksit ve onun peroksi-nitrit gibi toksik metabolitlerinde olmak üzere artış olabilir ve buda hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu yoluyla membran geçirgenliğinde artışa veya membran bütünlüğünde bozulmaya neden olur. Spermatogenezisin bozulmasına bir diğer neden de apoptozisteki artış olabilir. Testiste apoptozis Fas/FasL yolu ve p53 düzenlenmesi ile başlatılabilir. Vazektomili ratlarda p53-Bax aktivitesi ve Bax/Bcl-2 oranında artış artış vazektomiden 8 hafta sonra belirgin hale gelmiştir.

Vazektomi sonrasında histopatolojik değişikliklerden seminifer tubulde değişiklikler, multinukleouslu dev hücreler, germ hücrelerinin eksfoliyasyonu, intraepitelyal vakuollerin görülmesi, sıklıkla rete testis lümeninde bazen de seminifer tubul lümeninde ve epididimde makrofajların spermatidleri sindirimi ve epididimde spermatik granuloimler görülebilmektedir. Vazektomi geri dönüşüm başarısı vazektomiden sonra geçen zamana, vazektomide ligasyon uygulanan duktus deferensin uzunluğuna, vazektomi tipine, geri dönüşüm için seçilecek cerrahi işleme bağlı olarak değişebilmektedir (158-163).

1.7 Oksidatif Stres ve Ozonterapi

1.7.1 Oksidatif Stres

Canlı yapılarda yoğun olarak bulunan oksijen organizmada gerçekleşen reaksiyonlarda rol alan elementlerin başında gelmesi nedeniyle serbest radikal olmaya adaydır. Serbest oksijen radikalleri enerji üretim süreçlerinin yan ürünü olup yüksek düzeylerde zararlı olabilmektedirler. Hücrelerimizde bulunan antioksidan savunma sistemleri sayesinde serbest radikallerin DNA, proteinler ve lipidlere karşı olabilecek zararlı etkilerinden korunmuş oluruz. Serbest radikal oluşumunun, antioksidan üretimini aşması halinde bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Bu durum hücrelerde olumsuz etkiye yol açar

Eğer serbest radikaller antioksidanlar tarafından nötralize edilmezlerse, hücre membranındaki lipid ve proteinleri yıkarak nukleustaki DNA'da kırılmalarına yol açabilirler.

Hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri oksijenden oluşan biyolojik radikallerdendir. Oksijen, süperoksit grubuna yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenir. Süperoksit radikali, süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H₂O₂) ve oksijene çevrilir. Peroksinitrit ve nitrojen oksit gibi reaktif nitrojen türleri de DNA kırıklarına neden olabilmektedirler. Bu radikaller bazı hücrelerde apoptozisi indükleyebilirler.

Bazı faktörler testiste oksidatif strese neden olarak leydig hücrelerinin steroidogenik kapasitesini ve spermatogenezini bozarlar, bunun sonucu olarakta infertiliteye neden olabilirler. Bunlar arasında kriptorşidizm, testiküler torsiyon, varikosel, vazektomi, hipertiroidizm, diyabet, enfeksiyon, reproduktif hormon dengesizliği, zenobiyotikler sayılabilir.

Spermatogenezin sürekli tekrarlayan hücre bölünmelerinin sonucu olarak germinal epitelce aşırı miktarda oksijen tüketimi olur. Düşük oksijen miktarlarında testis serbest radikal oluşturan enzimler nedeni ile oksidatif strese karşı hassas hale gelmektedir. Serbest oksijen radikalleri mitokondriden ve ksantin-oksidad ve NADPH-oksidadları içeren çeşitli enzimlerden oluşabilir. Testis böyle durumlarda kendini korumak amacıyla çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyicilere sahiptir. Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen

maddelere antioksidan denir. Testis hem enzimatik hem de non-enzimatik ögelerden oluşan antioksidan sistemlere sahiptir.

Süperoksit dismutaz süperoksit anyonunu hidrojen perokside ve oksijen molekülüne dönüştüren antioksidan bir enzimdir. Sitozolik, mitokondriyal ve ekstraselüler olmak üzere üç tipi vardır. Testis antioksidan enzim sistemi dışında küçük moleküler ağırlıklı çeşitli antioksidan faktörlere de sahiptir. Bu antioksidan maddeler, serbest radikallere elektron vermek yada almak suretiyle radikalleri süpürücü etkinlik gösterirler; bu faktörler; iyonlar ve serbest radikal süpürücülerini kapsamaktadır.

Çinko, süperoksit dismutaz ile birlikte çalışarak sülfidril gruplara karşı koruyucu etki gösterir aynı zamanda lipid peroksidasyonunu engeller.

E Vitamini, sertoli hücrelerinde ve bazı germ hücrelerinde bulunur. polidoymamış yağ asitlerini peroksil radikallerine karşı korumaktadır.

C Vitamini, E vitamini ile birlikte spermatogenezi destekleyici etki gösterir.

Melatonin, radikal süpürücü etkiyle germinal epiteli oksidatif strese karşı korur.

Sitokrom c, hasarlı germ hücrelerinin apoptozise gitmesindeki en etkili antioksidandır. H₂O₂'nin temizlenmesinde de etkin role sahiptir (164-171).

Antioksidan terapi ile oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest radikalleri elimine etmek amaçlanır. Vücuttaki endojen antioksidan savunma sistemleri, serbest radikalleri etkisiz hale getirmede yeterli olmadığı durumlarda, infertilitede tedavi amaçlı kullanılan antioksidan terapi devreye girer.

Son yıllarda tedavi yöntemi olarak antioksidanların kullanımı popülerite kazanmıştır. Bunun nedeni olarakta yaşlanmanın ve kronik hastalıkların patofizyolojisinde etken olarak serbest radikallerin gösterilmesi etken olmuştur. Her ne kadar teorik anlamda antioksidan terapilerin serbest radikalleri ortadan kaldırmada etkin olduğu düşünülse de son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda oksidatif stresi önlemede bu yöntemin çok başarılı olmadığı görüşü hakimdir. En sık kullanılan C ve E vitaminleri serbest radikali temizledikten sonra kendileri radikale dönüşürler ve endojen antioksidan savunma sistemine katkı sağlamazlar.

1.7.2 Ozon Gazı ve Uygulama Yöntemleri

Ozon üç oksijen atomundan oluşan gaz halinde bir moleküldür. Genellikle oksijen veya hava ile karışık halde ve seyreltik halde bulunan renksiz ve keskin kokulu bir gazdır. Ozon kararsız bir moleküldür. Ozonun varlığını ilk kez 1785 yılında Van Marum belirtmiş ancak üç atomlu oksijen gazı olduğunu Christian Friedrich Schönbein 1840 yılında keşfetmiştir. Pestisitlerin giderilmesinde, organik karbonların kontrolünde kullanılır. Daha da önemlisi güçlü okside edici özelliğinden dolayı virüs ve bakterileri öldürür, mikroorganizmalar ve toksinlerini de okside edebilir. (180,183,193,198,202)

Kararsız bir gaz olan ozon oksijen molekülünün atomların ayrıldıktan sonra başka bir oksijen molekülü ile birleşmesi sonucu oluşur. Oksijen molekülü elektrolizle fotokimyasal reaksiyonlarla veya oksijen ortamına elektrik deşarjı ile elde edilebilir.

Normal basınç ve sıcaklıkta gaz halindeki ozon oksijene dönüşme eğilimindedir. Isının artışı bozunma ivmesini artırır. Nem, klor, sodyum hidroksit, azot pentaoksit gibi maddeler dönüşümünde katalizör etki yaparlar

Ozon kimyasal yapısı itibariyle radikal özelliği taşımamakla birlikte, floridan ve hidroksil radikalinden sonraki en güçlü oksidan maddedir. Ozonun kimyasal reaksiyonları moleküler yapısıyla yakından ilişkilidir. Ozonun kararsız olması, kolaylıkla ayrılabilir oksijen atomuna sahip olması güçlü bir oksitleyici yapar. Bir çok organik madde ile reaksiyona girebilir. Bu oksitleyici özelliğini sıvı çözeltilerde de gösterir. Henry kanununa göre çözünür. Çözünmesi ısıya, basınca ve konsantrasyonuna bağlıdır. Biyolojik sıvılarda oksijenden farklı olarak hızlıca biyomoleküller ile reaksiyona girer. Örneğin iki değerlikli demiri üç değerlikli demire, mangan dioksiti mangan permanganata, sülfiti sülfata, nitriti nitrate dönüştürür. Organik maddeleride kısmen oksitleyebilir. Oksitlenen ara ürünler ozonla daha fazla okside olmazlar. Serbest radikal reaksiyonlarının olabilmesi için ozonun bozunması ve organik maddelerle çok hızlı reaksiyon veren bir ara ürün olan hidroksil radikalinin meydana gelmesi gerekir. (180,183,193,198,202)

Ozon canlılar için toksik bir gazdır. Akciğer en hassas organdır. Düşük konsantrasyonda ozon inhalasyonu, boğazda irritasyondan akciğer ödemeine kadar varabilen harabiyete neden olabilir. (194)

Ozon, tıbbi amaçla kullanımında saf olarak uygulanmamalı, oksijen ile karışım halinde uygulanmalıdır. Bu karışımda ozon miktarı %5'i geçmemelidir. Ozonun hava ile teması sonucunda nitrojen dioksit oluşacağından dolayı hava ile teması önlenmelidir.

1.7.2.1 Sistemik uygulama yöntemleri

Major Otohemoterapi: Hastadan alınan 50-100 ml kan organizma dışında ozon/oksijen karışımı ile zenginleştirilir, immünkompetan hücreler aktive olur. Daha sonra ozonize edilmiş kan dakikada 60-90 damla olacak şekilde geri verilir.

Minör Otohemoterapi: 30 ml ozona dirençli tek kullanımlık sıringaya 10 ml ozon/oksijen karışımı doldurulur. 20 µg/ml, hastanın 3-5 ml kanına eklenir, karıştırılır ve çalkalanır. İntramusüler olarak yeniden enjekte edilir.

Rektal insuflasyon: Özellikle çocuklarda kullanılma yöntemi olan rektal insuflasyon ozon gazının rektal tatbikidir. Sistemik etkileri açısından major otohemoterapiye alternatiftir. İntravenöz reinfüzyonun damarların elvermemesi nedeniyle uygulanamadığı yaşlı hastalarda, barsaklarda proktit ve kolit gibi patolojik durumlarda ve immün yanıtı düşük olan pediatrik hastalarda kullanılır.

1.7.2.2 Topikal uygulama yöntemleri

Düşük Basıncılı Ozon Gazı Uygulaması: Sınırlı yaralarda ozon oksijen karışımı altı atmosferik basınçta plastik kap biçimindeki cihazdan yara yerine uygulanır.

Ekstremitte Torbalama: Yara yeri bol suyla temizlendikten sonra plastik torba sorunlu ekstremitayı saracak şekilde yerleştirilir. Band yardımıyla gazın dışarıya kaçıışı önlenir. Plastik torba ozon/oksijen karışımı ile doldurulur.

Ozonize Su Uygulaması: Ozonize su, mililitrede 20 µg ozon absorbe edecek şekilde hazırlanır. Yeni yaralar, enfekte yaralar, mantar enfeksiyonları, zona, herpes zoster, otitis, bukkal kavitedeki iltihaplar gibi vakalarda kullanılabilir.

İntraartiküler ozon enjeksiyonu: İntraartiküler enjeksiyonun basta diz ve omuz eklemleri olmak üzere akut ve kronik ağrılı eklem rahatsızlıklarında yararlı ve etkin olduğu kanıtlanmıştır. Endikasyonları arasında gonartroz, akut omuz eklemleri sayılabilir. Ayrıca intraplevral ve intradiskal uygulamalarda mevcuttur (176-187).

1.7.3 Ozonterapi ve Antioksidan Savunma Sistemi

Ozon tedavisi primer tedavi yöntemi olmanın dışında , hastanın tedavi protokolüne ek olarak uygulanan, organizmanın antioksidan ve antiinflamatuvar savunma sistemlerini destekleyen, dokulara oksijenin daha kolay bırakılmasını sağlayan destek tedavisidir. Ozon tedavisi endojen antioksidan savunma sistemini destekleme amaçlıdır. Ozon tedavisi organizma tarafından oksidatif stres olarak algılanır ve bunun neticesinde antioksidan savunma sistemlerinde çalışan enzimler güçlü bir şekilde uyarılır. Eşlik eden biyolojik medyatörler hidrojen peroksit ve okside lipid ürünleridir.

Ozon plazma ile temasa geçtikten sonra reaktif oksijen türevleri ve lipid oksidasyon ürünleri oluşturarak çeşitli dokularda etki eder. Reaktif oksijen türevleri eritrositler üzerinde dokulara daha kolay oksijen bırakma, lökositler üzerinde immün sistemim uyarılması trombositler üzerinde büyüme faktörlerinin salınması, lipid oksidasyon ürünleri aracılığıyla ise endotel üzerinde NO salınımında artış, kemik iliği üzerinde oksidatif strese dirençli eritrosit yapımı ve artmış kök hücre aktivasyonu, diğer organlar üzerinde ise antioksidan enzim miktarlarında artış göstererek etkisini ortaya çıkarır.

Bu bilgiler ozon tedavisinin etkinliğinde akut oksidatif stresin önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir. Organizmada oksidatif stresten kaynaklanan ve klinik manifestasyonlara neden olan süreçlerin tamamı kroniktir; akut oksidatif stres özellikle enfeksiyöz ajanlarla mücadele, toksik ajanların detoksifikasyonu gibi akut durumlarda büyük yararlar göstermektedir.

Ozon tedavisi ile sağlanan akut oksidan stres ve oluşturulan efektif biyolojik yanıtlar yaşlanma, kronik enfeksiyonlar, diyabet, ateroskleroz, kronik yaralar, dejeneratif süreçler ve kanserdeki kronik oksidatif stresi tedavi edici özelliği sayesinde homeostatik yöne çevirebilir.

1.7.4 Ozonterapi Endikasyonları

1. Diyabetik ayak, açık yaralar ve bası yaraları

2. Yanık
3. İltihabi barsak hastalıkları
4. Hepatit B, Hepatit C, HSV I-II ve HPV'in neden olduğu viral enfeksiyonlar, bakteriyel ve mantar enfeksiyonları
5. Diyabetik nöropatiye bağlı erektil disfonksiyon tedavisinde
6. Romatoid artrit, psöriasis, multiple skleroz, lupus, Behçet hastalığı gibi immun sistemin aşırı aktivasyonu ile ortaya çıkan hastalıklara destek tedavi olarak
7. Endotel hasarına neden olan durumlarda
 - DM'un neden olduğu vaskülitlerde
 - Sigaraya bağlı vaskülitlerde
8. Kronik solunum yolu hastalıklarında
 - Astım
 - Kronik Obstruktif Akciğer Hastalığı
9. Alzheimer, Parkinson gibi hastalıkların tedavisine destek olarak

1.7.5 Ozon Tedavisinde Aracı Olduğu Düşünülen Medyatörler

Ozon gazı organizmada başlıca çoklu doymamış yağ asitleri, antioksidanlar ve sistein gibi bileşikler ile reaksiyona girebilmektedir. Organizmanın temel taşı olan DNA ve RNA da ozon gazından etkilenebilmektedir. Tüm bu bileşikler ozon ile etkileştiklerinde elektron donörü gibi davranırlar ve sonuçta oksitlenirler. Bu tepkimelerin sonucunda süperoksit, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit gibi serbest oksijen radikalleri oluşur. Doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda lipoperoksil radikalleri, hidroperoksitler, malondialdehit, izoprostan, alkenaller ve 4-hidroksi-2,3-trans nonenal gibi lipid oksidasyon ürünlerinin yanında hidrojen peroksit radikali oluşur (188-191).

Fizyolojik şartlarda da oluşabilen bu reaktifler ozon tedavisi uygulaması sırasında da oluşmaktadır. Ozon/oksijen gaz karışımının etkinliği için tepkime sonucunda serbest radikallerin ortaya çıkışı önemli rol oynamaktadır.

Aerobik canlılar serbest radikallerin etkilerini nötralize etmek için bazı antioksidan sistemlere gerek duymaktadırlar. Bunları enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar olarak sınıflayabiliriz. Non enzimatik olanlar; ürik asit, askorbik asit, albumin, vitamin E ve bilirubindir. Enzimatik olanlar ise süperoksit dismutaz,

katalaz ve glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz, glutatyon redüktazdan oluşan glutatyon sistemidir.

Yapılan çalışmalarda ozonun etkinliğini göstermek için sıklıkla hemoterapi tedavisi model alınmıştır. Bu tedavi protokolünde ozon/oksijen karışımı içerisinde yer alan ozon, plazmada çözünerek antioksidanlar ile reaksiyona girer. Bu olaylar esnasında antioksidanlarda azalma olabilir. Bunun yanı sıra serbest radikaller de oluşabilmektedir. Yarı ömrü çok kısa olan bu radikaller ototransfüzyon öncesi yerlerini eritrosit membranının oksidasyonu sonucu oluşan lipit oksidasyon ürünlerine bırakırlar. Eritrosit membranındaki doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesi sonucu oluşan lipit oksidasyon ürünlerin yanı sıra hidrojen peroksitte bu tepkime sonrası ortaya çıkan oksitleyici bir moleküldür (188, 190).

Hidrojen peroksit eritrositlerde 2,3-difosfogliserat düzeyini artırarak hemoglobin-oksijen ayrışma eğrisini sağa kaydırarak oksijenin dokulara daha kolay bırakılmasını sağlar. Plazmada konsantrasyonu artmış olan hidrojen peroksit hücrelerin içine diffüze olur. Lökosit ve endotelial hücrelerde interferonların, interlökinlerin ve transforme edici büyüme faktörlerinin yapımını indükler.

Tepkime sonucu ortaya çıkan oksijen türevleri ozonun ilk etkilerinden, yarı ömrü uzun olan lipit oksidasyon ürünleri ise uzun yarı ömre sahip olmalarından dolayı dolaşım yoluyla dokulara difüze olarak ozonun uzamış etkilerden sorumlu tutulurlar.

Organizmadaki antioksidan savunma sistemleri, ozonun okside edici etkisini önleyici role sahip olmasına rağmen belli dozların üzerindeki ozon, artmış okside edici özelliği nedeniyle toksik etkilere neden olabilir. Eritrositlerin sahip oldukları antioksidan enzimler nedeniyle, kan ozon toksisitesine karşı en dirençli dokudur. Plazmada çözünen ozon, bilirubin, askorbik asit, SH grubu taşıyan glutatyon ve albumin gibi plazmadaki antioksidanlar ile reaksiyona girerek bunların konsantrasyonunu azaltırlar. Lakin bu durum geçicidir zaman içerisinde antioksidan konsantrasyonları eski haline dönecektir. Bocci ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bunu desteklemektedir. Bu çalışmada değişik konsantrasyonlarda ki ozon (20,40,60,80 µg/ml) dozla doğru orantılı olarak glutatyon ve total antioksidan seviyesinde azalma, lipit peroksidasyonu ve okside glutatyon düzeyinde artış sağlamış, tedavinin yirminci dakikasından sonra ise antioksidan

seviyeleri yeniden eski haline inmiştir Bunun sonucu olarak tedavinin etkinliğini plazmadaki antioksidan seviyesi belirler diyebiliriz. Eğer plazmada ki antioksidan seviye düşük, ozonun konsantrasyonu fazla ise eritrosit membranındaki lipidlerin oksidasyonu sonucu eritrositler hemolize uğrayabilir, eğer ozon konsantrasyonu düşük olur ise tedaviye yanıt yetersiz kalabilir. Ozon uygulamaları sonucunda oluşması beklenen ROT ve lipit oksidasyon ürünlerinin terapötik etki gösterebilmesi için belli bir konsantrasyonda olması gerekir. Yapılan çalışmalar sonucunda ozonun tedavi aralığı 10-80 µg/ml olarak belirlenmiştir. Rice-Evans bu aralıkta ki ozon tedavisi ile total antioksidan kapasiteyi %25'den fazla düşürmeden ve azalan antioksidanların seviyesinin yirmi dakika içerisinde eski haline dönüştüğünü gözlemleyerek tedavinin etkinliğini belirtmişlerdir (188-199).

Hem oksijenaz enzimi hem halkasının yıkımından sorumlu bir enzimdir. Bu enzim aynı zamanda antiapoptotik antiproliferatif etkilere sahiptir. Bu enzim oksidatif strese maruziyet durumlarında ve NO seviyeleriyle orantılı olarak uyarılabilmektedir. Ozon tedavisi eritrosit membranında meydana gelen oksidasyon sonucunda bu enzimi indükleyebilir. Bu etki 20-80 µg/ml arasında ortaya çıkmaktadır. Bu durumda ozonoterapinin etkinliğinin ortaya çıkmasından sorumlu bir diğer faktör olarak gösterilmektedir (200, 201).

1.7.6 Ozonterapi Kontraendikasyonları

Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği

Gebelik

ACE inhibitörü kullananlarda

Hipertiroidi

Kanama bozukluğu

Ciddi kardiyovasküler hastalıklar

Ozona reaksiyon gösteren astım hastaları (202).

1.7.7 Nitrik Oksit Sentetaz

NO, konstitutif (e-NOS, nNOS) ve indüklenebilir (i-NOS) nitrik oksit sentetaz tarafından sentezlenebilen serbest radikaldir. NO, vasküler endotelde endotelial nitrik oksit sentetaz (e-NOS) enzimi tarafından L-argininden sentezlenir ve

vasküler düz kas gevşetici etkisi ile endotel bağımlı vazodilatasyonun ana mediyatörüdür. i-NOS ise çok miktarda NO (nanogram) sentezlenmesini sağlayarak sitotoksik, bakterisidal ve tümörisidal etki yapar.

İmmünohistokimyasal çalışmalarca e-NOS ve i-NOS varlığı interstisyel hücrelerde primer spermatozoidlerde ve spermatidlerde gösterilmiştir (203). Özellikle e-NOS peritubuler lamina propria myofibroblastlarınca ve testisteki büyük kan damarlarının endotelial ve düz kas hücrelerinde ekspresyon edilir (204). Zini ve ark. spermatogenezin tüm safhalarında, Leydig ve Sertoli hücrelerinde e-NOS lokalizasyonunu göstermişlerdir (205). e-NOS normal germ hücrelerinde görülmemiş fakat prematür spermatozoidlerde ve spermatidlerde e-NOS ekspresyonu gösterilmiştir (206).

NO intrasellüler messenger olarak görev yaparken, yüksek konsantrasyonlarda sentezlenmesi durumunda hücre için toksik etki yapar ve DNA replikasyonunun inhibe ederek, lipid peroksidasyonuna yol açar. i-NOS oksidatif strese maruziyet durumlarında dokuda aşırı olarak artar. NOS inhibisyonunun testis dokusundaki nekrozu azalttığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. i-NOS'un testisin interstisyel hücrelerinde, e-NOS'un ise hasarlanmış seminifer tübül içindeki germ hücrelerinde olduğu immünohistokimyasal boyalarla gösterilmiştir. Sonuç olarak her iki NOS enzim aktivitesi de testis hasarında gösterilmiştir. Özellikle, testis hasarının geç dönemindeki NOS aktivitesi, gecikmiş hücre ölümü ile ilişkili olarak gözükmektedir. Kim ve arkadaşlarının domuzlarda yaptığı çalışmada testosteron üreten interstisyel hücrelerde, seminifer tübüllerde, primer spermatozoid ve spermatidlerde NOS ekspresyonu görülmüştür. İnterstisyel hücreler nadph diaforaz ile boyanmışlardır. Yine Shiraishi ve Naito'nun infertil varikoselli erkekler üzerinde yaptığı çalışmada testiküler biyopsi sonucunda nadph-d boyaması yapılmış ve i-nos konsantrasyonu anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (207). Celik-ozenci ve arkadaşlarının ratlarda varlikoseli indükleyerek yaptığı çalışmada Leydig hücrelerinde n-NOS'un histokimyasal incelemesinde testosteron aktivitesi ile ilişkili bulunmuş fakat varikosel indüksiyonu ile arasında ilişki kurulamamıştır(208). Ishikawa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farelerde deneysel kriptorşidizm oluşturularak germ hücre apoptozisi değerlendirilmiş, dejenerer germ hücrelerinde boyanma ile e-NOS overekspresyonunun germ hücre

apoptozisi ile ilişkili olduğu görülmüş(209). Taneli ve ark yaptığı çalışmada rat testisinde germ hücre apoptozisi spermatik ven ligasyonu sonrasında değerlendirilmiş e-NOS ve i-NOS ekspresyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Cerrahi sonrası artmış germ hücre apoptozisinin artmış nitrik oksit sentezi ile ilişkili olduğu ve seminifer tübüllerde i-nos boyandığı gözlenmiştir(210). Fujisawa ve ark yaptığı çalışmada da seminifer tübüllerdeki sertoli hücrelerinde ve intersitisyumdaki leydig hücrelerinde e-nos lokalizasyonu tespit edilmiştir. Dejeneratif germ hücrelerinde boyanma görülmüş, normal hücrelerde görülmemiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Gereç

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Ağırlıkları ortalama 352.5 gr olan 60 adet erkek Wistar rat kullanıldı. Gruplar; altışar rattan oluşturuldu. Ratlar sabit sıcaklık ve nem ortamında, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlıkta standart laboratuvar koşullarında rat yemi ile beslendi.

Çizelge5: Rat Ağırlıkları (gr)

	Grp 1	Grp 2	Grp 3	Grp 4	Grp 5	Grp 6	Grp 7	Grp 8	Grp 9	Grp 10
1	351	316	403	306	333	335	358	400	376	353
2	276	372	362	386	370	291	352	397	348	358
3	350	302	445	400	379	318	399	338	354	327
4	313	385	355	385	332	379	428	305	371	377
5	365	330	361	354	351	276	325	317	314	355
6	350	292	398	361	293	383	400	408	304	329

Toplam 10 grup çalışmaya dahil edildi. Ratlar rastgele gruplandırıldı.

Çalışma Şeması:

(Grup I): Vazektomi yapılmayıp, 6. hafta sonunda değerlendirme yapılan kontrol grubu.

(Grup II): Cilt insizyonu sonrası sol testisin serbestleştirilerek vazektomi yapılmadan skrotuma yerleştirildiği ve 4. hafta sonunda değerlendirildiği grup

(Grup III): Cilt insizyonu sonrası sol testisin serbestleştirilerek vazektomi yapılmadan skrotuma yerleştirildiği ve 6. hafta sonunda değerlendirildiği grup

(Grup IV): Tek taraflı vazektomi (sol vazektomi) yapılıp, 4. hafta sonunda değerlendirme yapılan grup.

(Grup V): Tek taraflı (sol vazektomi) vazektomi yapılıp, 6. hafta sonunda değerlendirme yapılan grup.

(Grup VI): Çift taraflı vazektomi yapılıp, 4. hafta sonunda değerlendirme yapılan grup.

(Grup VII): Çift taraflı vazektomi yapılıp, 6. hafta sonunda değerlendirme yapılan grup.

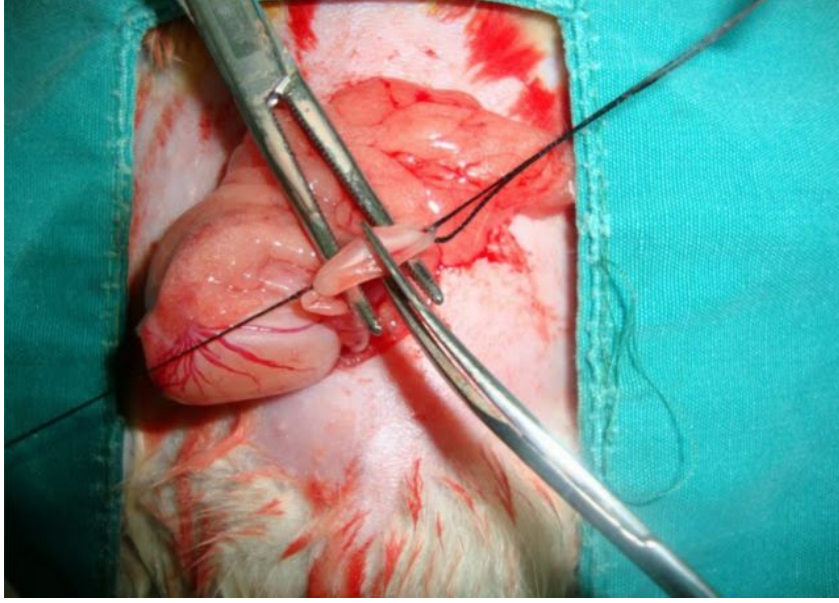
(Grup VIII): Tek taraflı vazektomi (sol vazektomi) yapılıp, ozon tedavisi uygulanarak, 6. hafta sonunda değerlendirme yapılan grup.

(Grup IX): Çift taraflı vazektomi yapılıp, ozon tedavisi uygulanarak, 6. hafta sonunda değerlendirme yapılan grup.

(Grup X): Vazektomi yapılmamış, 6 hafta süreyle ozon tedavisi uygulanmış grup.

2.2 Cerrahi İşlem

Cerrahi girişimler, ketamin/ksilazin (40 mg/kg -10 mg/kg) anestezisi altında antiseptik koşullar sağlanarak gerçekleştirildi. Cerrahi kesi öncesi abdomen cildi traş edildi ve povidon iyotla steril hale getirildi. Abdominal orta hat insizyon sonrası spermatik kord bulunarak, testis karın cildinden dışarıya alındı; vaz deferens bulundu. Etrafındaki deferansiyal arter, ven ve sinirden serbestleştirildikten sonra vaz kesilerek küçük bir segmenti eksize edildi. Vaz deferensin proksimal ve distal uçları 5-0 ipekle bağlandıktan sonra kanama kontrolü yapıldı ve insizyon 4-0 ipekle sütüre edildi. Cerrahi girişim uygulanan hayvanların tümüne üç günde bir kez olmak üzere Baytril-K uygulandı.



Şekil 2 Vazektomi uygulanımı

Grup I deki rat grubunda hiçbir cerrahi işlem yapılmadı. Kontrol grubu olarak belirlendi. 6. hafta sonunda anestezi sonrası bilateral orşiektomi uygulandı.

Grup II ve grup III deki rat gruplarında, 0. günde vazektomi işlemi uygulanmadan, sol testis karın cildinden dışarıya alınarak tekrar skrotuma yerleştirildi. Bu gruplar sırasıyla 4. ve 6. haftalarda bilateral orşiektomi operasyonu uygulanarak kurban edildi.

Grup IV ve V deki ratlara 0. günde tek taraflı (sol) vazektomi işlemi uygulandıktan sonra sırasıyla 4. ve 6. haftalarda bilateral orşiektomi operasyonu uygulandı.

Grup VI ve VII deki ratlara 0. günde bilateral vazektomi uygulandıktan sonra sırasıyla 4. ve 6. haftalarda bilateral orşiektomi operasyonu uygulandı

Grup VIII deki ratlara 0. günde sol vazektomi uygulandı. 6 hafta boyunca, haftada üç kez olmak üzere ozon tedavisi verildi. 6. hafta sonunda bilateral orşiektomi operasyonu uygulandı.

Grup IX daki ratlara 0. günde bilateral vazektomi uygulandı. 6 hafta boyunca, haftada üç kez olmak üzere ozon tedavisi verildi. 6. hafta sonunda bilateral orşiektomi operasyonu uygulandı.

X. gruba ise hiçbir cerrahi müdahalede bulunulmadan haftada üç kez olmak üzere ozon tedavisi uygulandı ve 6. hafta sonunda bilateral orşiektomi yapıldı.

Ozon tedavisi haftada üç kez olmak üzere 0,7 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulandı. Ozon cihazında ozon akım hızı 3 lt/dk olarak ayarlanarak, üretilen %97 oksijen-%3 ozon gaz karışımının ozon konsantrasyonu 70 µg/ml olacak şekilde uygulandı. Tüm ratlardan ketamin-ksilazin anestezi altında seminal veziküller bulunarak hormon parametreleri incelenmek üzere 0,2-0,4 ml seminal plazma ve abdominal aortadan yaklaşık 3 cc serum örneği alındı. Ardından bilateral orşiektomi uygulandı. Her bir testis yağ dokudan ayrılıp dekapsüle edildi.

1. gruptaki bir hayvanda testisler bilateral atrofikti. 3. ve 7. gruptaki bir hayvanda, 5. grupta iki hayvanda yara yerinde enfeksiyon mevcut idi. Bu hayvanlar çalışmadan çıkarılmadı.

Çalışmaya alınmama kriterleri aşağıda belirtilmiştir.

1. Anestezi sırası ve sonrasında arrest gelişip hipoksik kalan ratlar
2. Bakım sırasında hastalık gelişen veya anatomik bozukluğu olan ratlar
3. Bakım sırasında *ex* olan ratlar

Tüm ratlardan alınan serum ve seminal plazma örnekleri 3000 devir/dk olmak üzere beş dakika santrifüj edildi ve -80 derecede saklandı.

2.3 Biyokimyasal ve İmmünohistokimyasal Değerlendirme

2.3.1 Biyokimyasal Değerlendirme

Serumda FSH, LH, total testosteron, östrodiol ve inhibin B düzeyleri ve seminal plazmada total testosteron, östrodiol düzeyleri ELİSA yöntemi (ELISA Kit for Rat Testosterone, Cat No: E0458R, ELISA Kit for Rat Estradiol, E2 Cat.No: E0461R, ELISA Kit for Rat inhibin B (INH-B) Cat. No: E0760R, ELISA Kit for Rat Follicle-stimulating hormone, Cat No: E0830R, ELISA Kit for Rat luteotropic hormone, LH Cat. No: E0441R, Uscn Life Science Inc. Wuhan) ile manuel olarak çalışıldı.

2.3.2 İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmünohistokimyasal inceleme için testis dokusu %4'lük paraformaldehit solüsyonu içeren şişelere konuldu; 24 saat sonra parafinleme için takibe alındı. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. i-NOS, e-NOS immunohistokimyasal yöntemlerle incelenmek üzere 4'er , TUNEL yönteminde incelenmek üzere 2'şer kesit alındı. Kesitler poly lyzin ile muamele edilmiş lam üzerine yerleştirildi. Testiküler dokudaki apoptozis i-NOS , e-NOS ve TUNEL yöntemleri ile değerlendirildi.

2.3.2.1 i-NOS ve e-NOS İmmünohistokimyasal Boyanma Yöntemleri

i-NOS boyama protokolü

Lamlar 12 saat 37°C'lik etüvde bekletildi. Ardından aşağıda belirtildiği gibi deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemi uygulandı.

Oda ısısında üç kez beş dakika süreyle taze ksilene maruz bırakıldı.

Oda ısısında 5 dakika %100 etanole daldırıldı.

Oda ısısında 5 dakika %90 etanole daldırıldı.

Oda ısısında 5 dakika %80 etanole daldırıldı.

Oda ısısında 5 dakika %70 etanole daldırıldı.

Distile su ile yıkama aşamasından sonra kesitlerin kurumamasına dikkat edildi.

Kesitlerin çevresi kurularak hidrofobik bir bariyer oluşturmak amacıyla pap-pen ile çizildi.

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) ile durulandı ve spesimenin etrafı dikkatle kurulandı.

Endojen Peroksidaz inaktivasyonu aşamasına geçildi;

Kesitler, distile su içerisinde hazırlanmış %3'lük H_2O_2 ile oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Bu aşamada da inkübasyon süresine uyuma özen gösterildi.

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) 5 dakika süreyle üç kez yıkandı. Dikkatlice fazla olan sıvı alındı ve spesimen etrafı kurulandı.

Dokular, antijen geri kazanımı amacıyla, 0,01 M Sitrat Tamponunda 20 dakika 700 Watt' da ısıtıldı.

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) 5 dakika süreyle üç kez yıkandı.

100 mikrol i-NOS primer antikolarıyla 60 dakika inkübe edildi (Nitric Oxide Synthase, inducible (i-NOS)Rabbit Polyclonal Antibody.Cat No. RB-9242 - R7, labvision,Thermo Fisher Scientific, USA).

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) 5 dakika süreyle üç kez yıkandı.

PBS.den geçirilen kesitlere 10 dakika süre ile biyotinli sekonder antikor uygulandı.

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) 5 dakika süreyle yıkanıp kurulandı.

10 dakika süre streptavidin-peroksidaz kompleksi) uygulandı.

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) 5 dakika süreyle yıkanıp kurulandı.

PBS den geçirilen kesitler, aminoetilkarbizol (AEC Substrate system TA-060-SA labvision, Thermo Fisher Scientific, USA) ile boyandı ve akar musluk suyunda yıkandı.

Zıt boyama için Mayer'in hematoksilenine 30 saniye konuldu ve suda yıkandı

Spesmene zarar vermeden lam kurulandı.

Lamın üzeri enanten ve lamel ile kapatıldı

İmmünohistokimya uygulanan doku kesitleri, ışık mikroskobunda oryantasyon amaçlı kesitlerle karşılaştırmalı olarak i-NOS pozitif hücreler sayıldı.

Aynı immünohistokimya protokolü e-NOS boyama işlemi esnasında tekrarlandı. Farklı olarak, aynı süreyle, aynı miktarda Nitric Oxide Synthase, endothelial (e-NOS Rabbit Polyclonal Antibody Cat.RB-9279-R7 (7.0ml),labvision,Thermo Fisher Scientific, USA) kullanıldı.

2.3.2.2

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) Yöntemi

Apoptozisin belirlenmesi amacı ile TUNEL tekniğinden yararlanılmış; deneylerde TaKaRa BIO INC. Shiga, JAPAN) in situ apoptosis detection kit tespit kitleri kullanılmıştır.

TUNEL boyama protokolü

Lamlar 12 saat 37°C'lik etüvde bekletildi. Ardından aşağıda belirtildiği gibi deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemi uygulandı.

Oda ısısında 5 dakika süreyle üç kez taze ksilene maruz bırakıldı.

Oda ısısında 5 dakika %100 etanole daldırıldı.

Oda ısısında 5 dakika %90 etanole daldırıldı.

Oda ısısında 5 dakika %80 etanole daldırıldı.

Oda ısısında 5 dakika %70 etanole daldırıldı.

Distile su ile yıkama aşamasından sonra kesitlerin kurumamasına dikkat edildi.

Kesitlerin çevresi kurularak hidrofobik bir bariyer oluşturmak amacıyla pap-pen ile çizildi.

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) ile durulandı ve spesimenin etrafı dikkatle kurulandı.

Enzimatik sindirim için,

20 µg/ml Proteinase K damlatıldı.

Oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.

Endoperoksidaz inaktivasyon aşaması

100 mikrol %3'lük H₂O₂ damlatıldı.

Oda ısısında 5 dakika inkübe edildi

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) 5 dakika süreyle yıkanıp kurulandı.

Oda ısısında 60 dakika inkübe edildi.

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) 5 dakika süreyle yıkanıp kurulandı.

Işık mikroskopunda incelendi.

Antikor reaksiyonu için anti-FITC HRP konjugatı damlatılarak 37°C de 30 dakika inkübe edildi.

Fosfatlı tuz tamponunda (PBS) 5 dakika süreyle yıkayıp kurulandı.

Aminoetilkarbizol (AEC Substrate system TA-060-SA labvision, Thermo Fisher Scientific, USA) ile boyandı ve oda ısısında mikroskop altında arkaplan boyanmasının şekillenmemesi için kontrollü bir şekilde boyanmalar takip edildi ve boyama işlemi distile suyla sonlandırıldı.

Preparat su bazlı yapıştırıcı ile kapatıldı.

2.4 Hücre Sayımı ve İstatistiksel Analiz

Olympus BX50 marka ışık mikroskopunda 40'lık büyütmede incelemeler yapıldı. Nitrik oksit sentetaz boyanmalarının değerlendirilmesi için her bir testiste nekroz içermeyen, homojen boyanma gösteren seminifer tübüllerden 1mm² alanı gösteren 100 adet resim çekildi. Normal dokuya göre daha kırmızı renkte görünen NOS pozitif boyanan germ hücreleri, Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri sayıma dahil edildi. Seçilen 1 mm² lik alan 100 eşit parçaya ayrıldı. Bu alan üzerine her resim için sabit olacak şekilde rastgele 10 alan belirlendi ve içerisindeki hücreler sayılarak ortalaması alındı.

Apoptotik hücreler sayımı gerçekleştirilirken, her bir testis için nekroz içermeyen, homojen boyanma gösteren seminifer tübüllerden 1mm² alanı gösteren 100 adet resim çekildi. Sayım işlemi 40'lık oküler mercekte çekilen resimler üzerinden yapıldı ve seminifer tübüldeki kahverengi-kırmızı boyanmış apoptotik germ hücreleri sayıldı. Her testiste tübül başına düşen apoptotik germ hücreleri apoptotik indeks oluşturacak şekilde sayıldı. Apoptotik indeks toplam pozitif boyanan germ hücre sayılarının 100'e bölümü olarak belirlendi.

İstatistiksel analiz için yazılım (SPSS 16.0, Windows) programı kullanıldı. Verilerin analizinde grup sayıları altışar rattan oluştuğu için non-parametrik Kruskal – Wallis testi uygulandı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak p<0.05 kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1 e-NOS İmmünohistokimya Boyanmaları

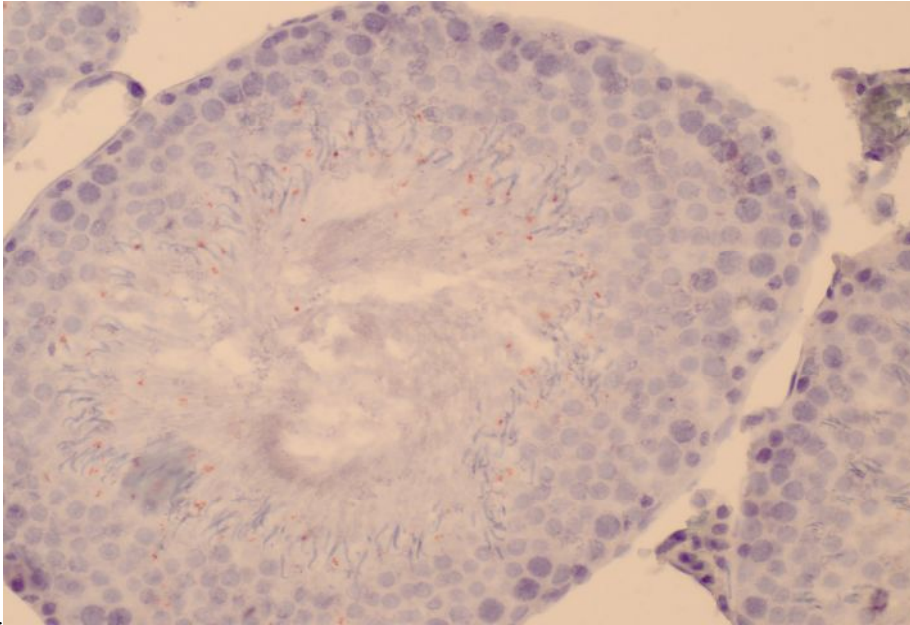
Kontrol grubunda pozitif boyanmış ortalama e-NOS hücre sayısı tüm gruplardaki pozitif boyanmış ortalama e-NOS hücre sayısından daha düşüktü.

Kontrol ve sham grupları arasında sağ testisin pozitif boyanmış ortalama e-NOS hücre sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Ancak 6 haftalık sham grubunda sol testisteki ortalama hücre immünboyanmaları diğerlerinden daha fazla idi.

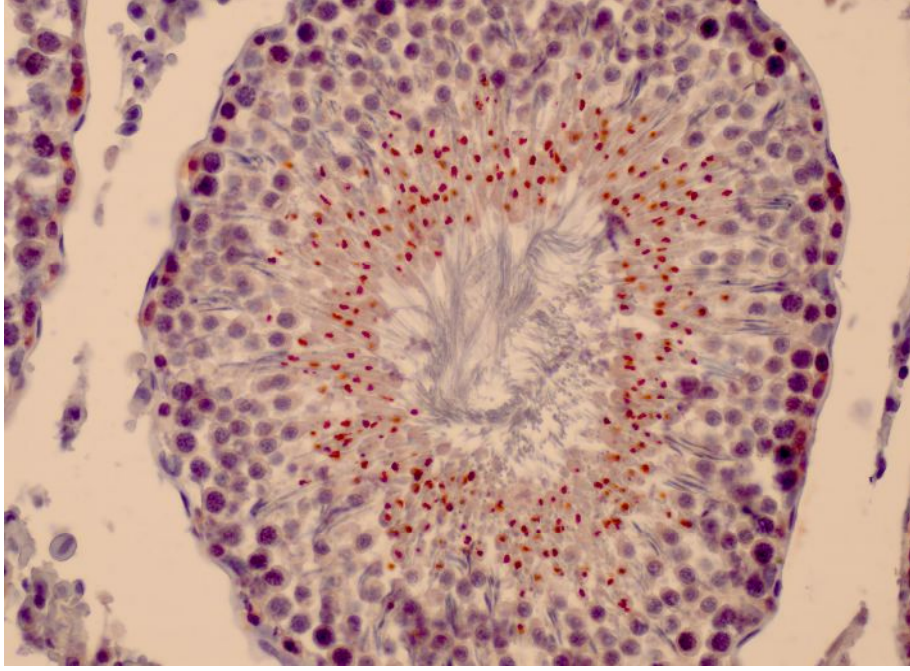
Tüm gruplar ele alındığında en fazla e-NOS immünreaktivite gösteren hücreler erken ve geç spermatidler, en az boyanan hücreler ise spermatogonyumlardı. Sertoli hücre ekspresyonları ise leydig hücrelerinden daha fazla idi.

Sol vazektomi geçiren 4 haftalık grupta, sağ ve sol testis karşılaştırıldığında pozitif boyanmış ortalama e-NOS hücre sayıları arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı ($p=0,061$).

Sol vazektomi geçiren altı haftalık grupta pozitif boyanmış ortalama e-NOS hücre sayıları sol testis için 16.8 ± 7.4 , sağ testis için 8.5 ± 2.8 idi. 5. grupta her iki testis için, e-NOS immünohistokimyasal boyanmaları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($*p=0,028$).



Şekil 3 Kontrol grubu (Grup 1)



Şekil 4 Bilateral vazektomi-6 hafta (Grup 7)

Çizelge 6 Tüm gruplar arasında sağ ve sol testisin e-NOS hücre sayımlarının analizi

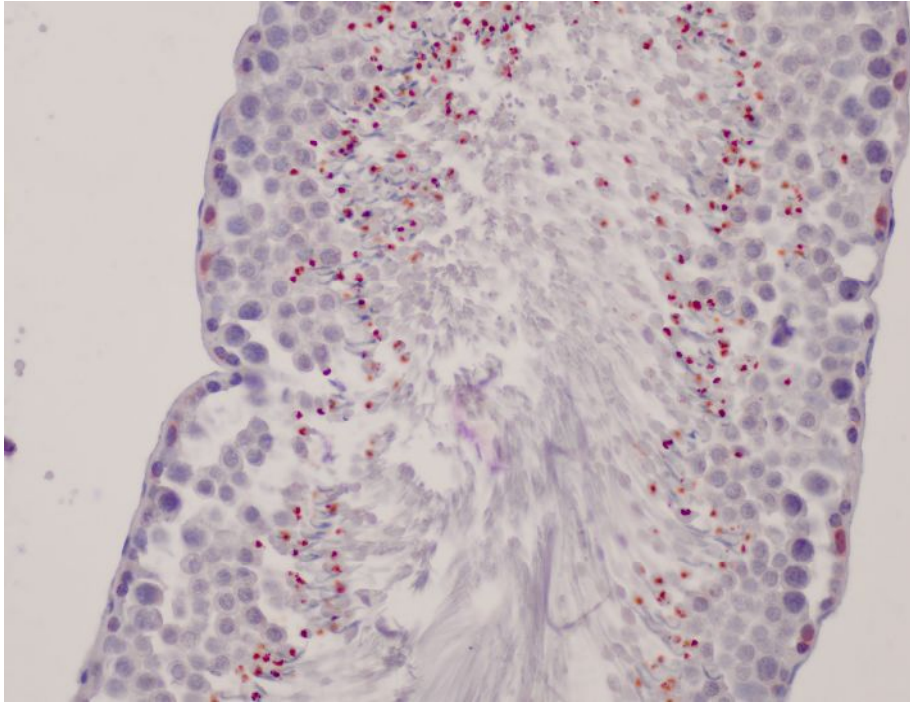
Grup	Sağ Ort±STD (min-mak)	Sol Ort±STD (min-mak)
1	5±2.7(2-8)	4.5±2.9(1-9)
2	7.5±2.2(4-10)	6.8±2.9(4-12)
3	7.2±1.8(5-10)	11.8±2.3(8-14)
4	11.3±2.4(8-15)	17.5±6.2(10-25)
5	8.5±2.8(6-12)	16.8±7.4(9-30)
6	17±3.1(14-21)	21.8±5.2(14-30)
7	25.2±3(21-30)	23.2±2.8(21-28)
8	16.2±0.8(15-17)	9.8±6(3-19)
9	9.2±2.6(6-13)	7.8±3.8(3-12)
10	30.7±5.1(26-38)	29±5.2(24-36)
P değeri	0,000*	0,000*

* p< 0,05 Kruskal-Wallis

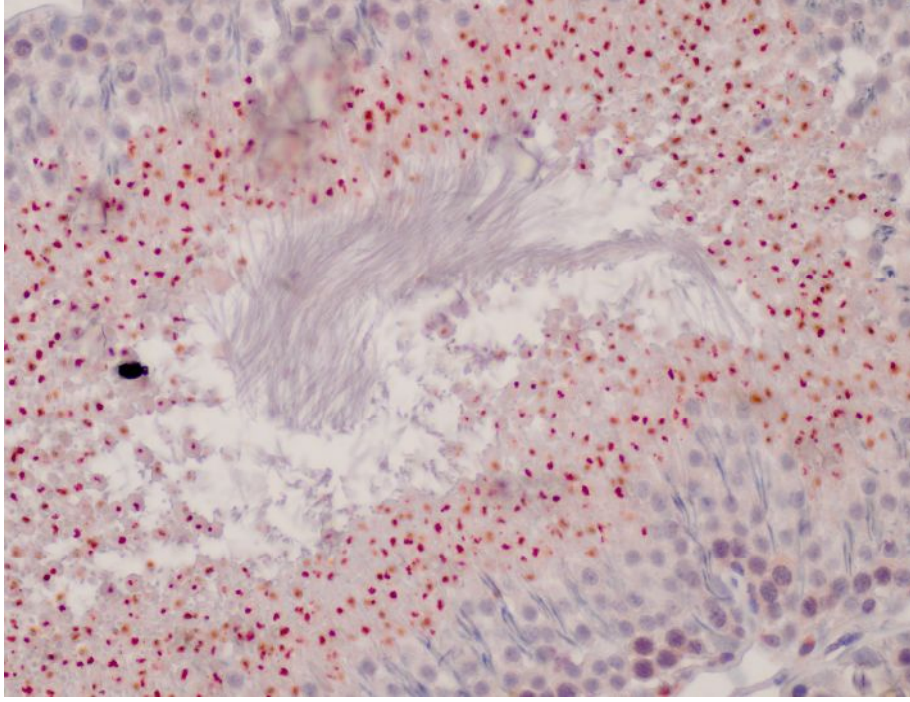
Çizelgede görüldüğü üzere vazektomi operasyonu uygulanan tüm gruplarda pozitif boyanmış ortalama e-NOS hücre sayıları kontrol grubundan ve sham gruplarından daha yüksekti. Ancak, vazektomi uygulanan tüm gruplardaki e-NOS immün boyanması X. gruptan daha düşüktü. Bilateral vazektomi uygulanan gruptaki boyanmalar bilateral vazektomi sonrası ozonterapi uygulanan gruba göre belirgin şekilde yükseklik gösterdi.

Sağ testis incelendiğinde I., II., III., IV., V., ve IX. grupların ortalama değerleri istatistiksel olarak birbirine benzerdi ($p=0.278$). X. grubun ortalama değerinin diğer gruplardan daha yüksek olması istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.000^*$). Bilateral vazektomi uygulanan VII. gruptaki ortalama değer X.gruptan daha düşük, diğer tüm gruplardan yüksekti. VII. grubun ortalama değeri tüm gruplardan istatistiksel olarak farklılık gösterdi. ($p=0.000^*$).

Sol testis incelendiğinde IV.,V.,VI.,VII., X. grupların ortalama değerleri istatistiksel olarak birbirine benzer iken ($p=0.242$), I.,II.,III.,VIII.,IX.grupların ortalama değerleri istatistiksel olarak birbirine benzer idi ($p=0.216$). Önceki cümlede belirtilen ilk beş grubun ortalama değerleri ile ikinci beş grubun ortalama değerleri arasındaki fark anlamlı idi ($p=0.000^*$).



Şekil 5 Bilateral vazektomi-6 hafta+Ozonterapi (Grup 9)



Şekil 6 Ozonterapi grubu (Grup 10)

3.2 i-NOS İmmünohistokimya Boyanmaları

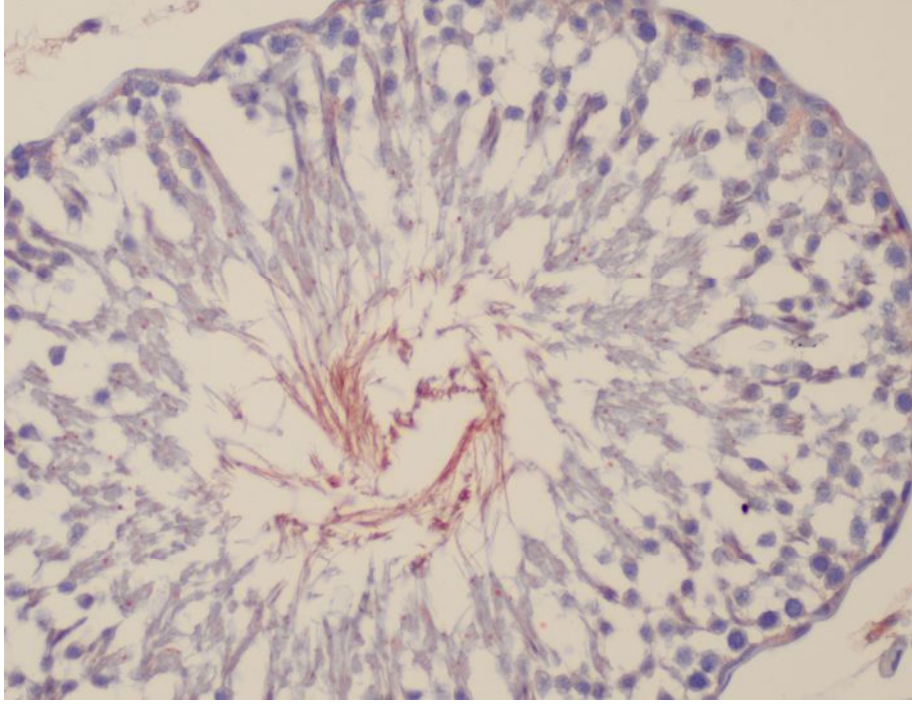
Tüm gruplar ele alındığında en fazla i-NOS immün reaktivite gösteren hücreler erken ve geç spermatidler, sertoli ve leydig hücreleri idi. Sertoli ve leydig hücrelerindeki i-NOS ile immünohistokimyasal boyanmaların e-NOS'daki immünohistokimyasal boyanmalardan daha fazla olduğu görüldü.

Kontrol grubunda pozitif boyanmış ortalama i-NOS hücre sayıları sham gruplarındaki değerlere yakın bulundu.

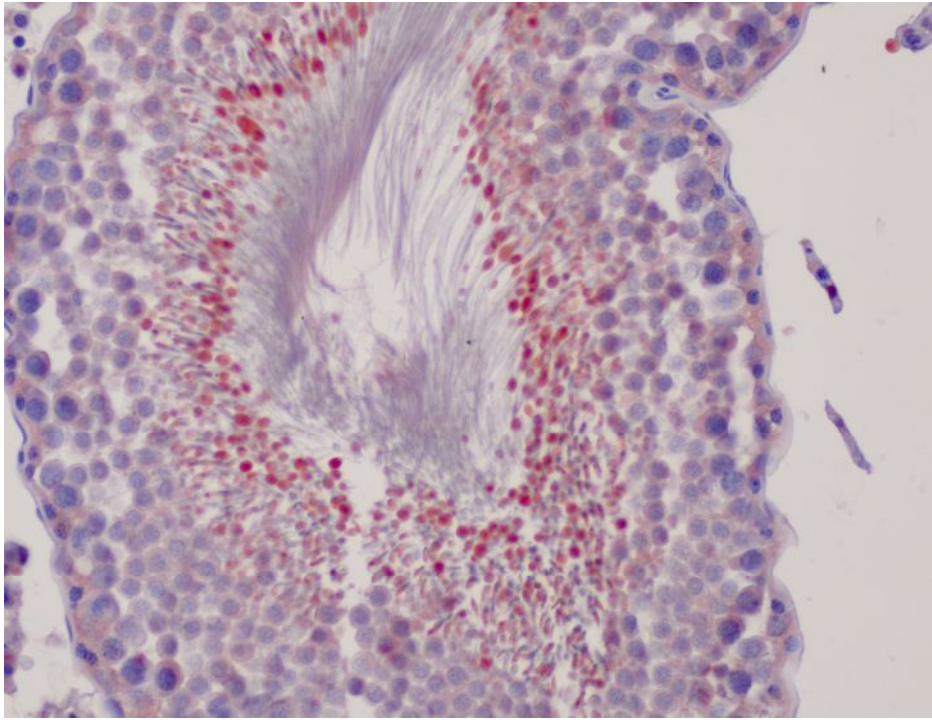
Bu ilk üç grupta sağ ve sol testisler arasındaki immünohistokimyasal boyanan hücre sayıları birbirine yakın bulundu.

Sol vazektomi geçiren 4 haftalık grupta pozitif boyanmış ortalama i-NOS hücre sayıları sol testis 13.5 ± 5.2 için, sağ testis için ise 7.7 ± 3.1 idi. Sağ ve sol testis immün reaktiviteleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($*p < 0,046$).

Sol vazektomi geçiren 6 haftalık grupta her iki testis arasındaki pozitif boyanmış i-NOS hücre sayılarının birbirine yakın olduğu görüldü.



Şekil 7 Kontrol Grubu (Grup 1)



Şekil 8 Sol vazektomi-4 hafta (Grup 4)

Bilateral vazektomi geçiren 4 ve 6 haftalık gruplarda da her iki testis için pozitif boyanan ortalama i-NOS hücre sayılarının birbirine yakın olduğu görüldü. Bu gruplardaki artmış immünreaktivite düzeyleri kontrol grubundaki, sham

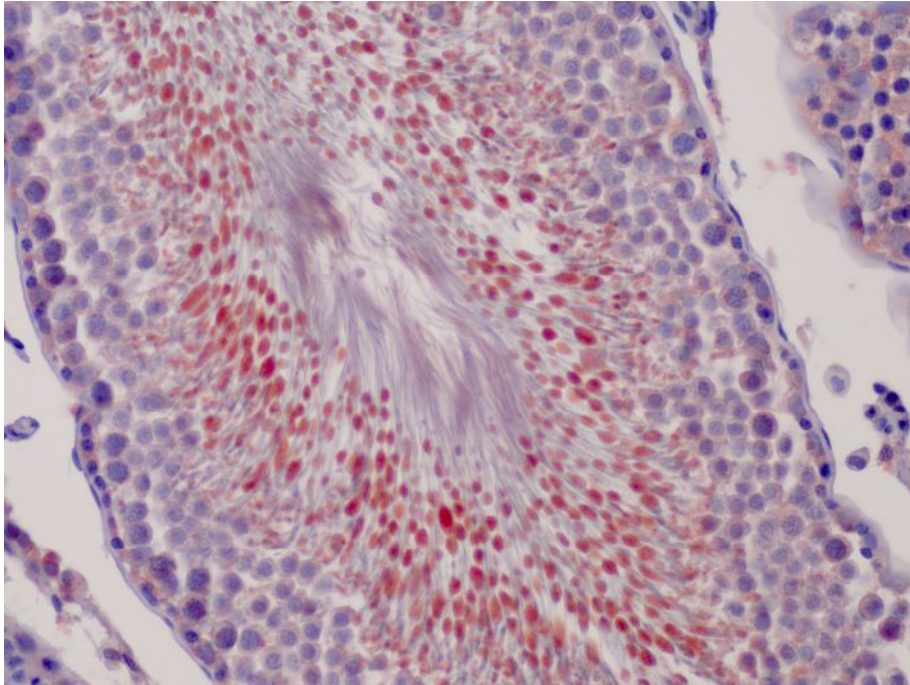
gruplarındaki ve vazektomi sonrası ozonterapi uygulanan gruplardaki immünreaktivite düzeylerine göre belirgin derecede yüksekti.

Sağ testis incelendiğinde VI.,VII. ve X. grupların ortalama değerleri birbirinden farksızdı ($p=0,656$). Geri kalan gruplar ile bu üç grubun ortalama değerleri arasındaki fark anlamlı idi ($p=0.000^*$). I., II., III, IV.,V., VIII. ve IX. grupların ortalama değerleri istatistiksel olarak benzerdi ($p=0.152$).

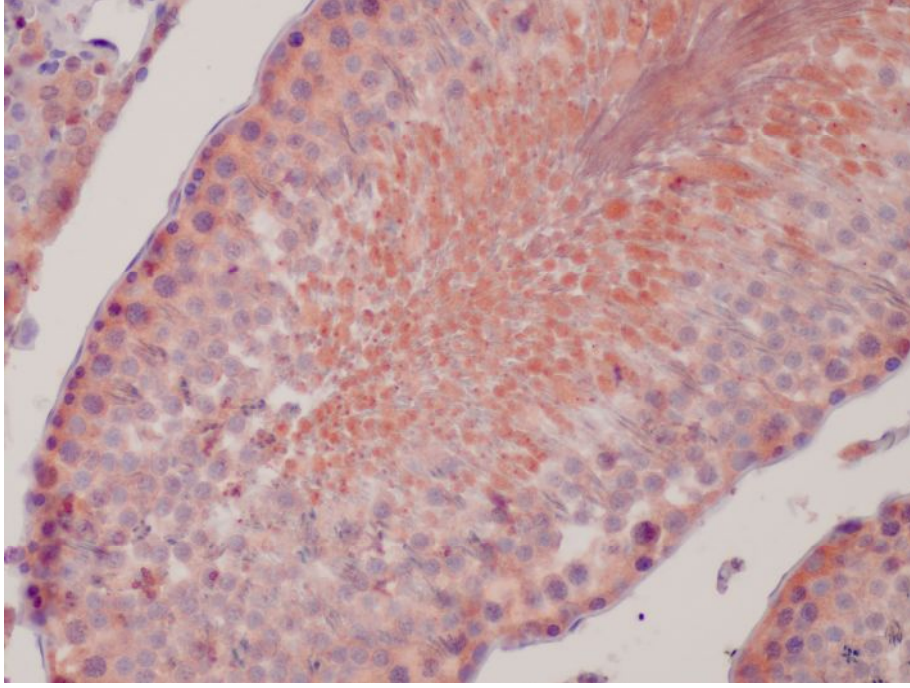
Çizelge 7 Tüm gruplar arasında sağ ve sol testisin i-NOS hücre sayımlarının analizi

Grup	Sağ Ort±STD (min-mak)	Sol Ort±STD (min-mak)
1	5.2±3.8(1-12)	3.2±1.3(1-5)
2	6.8±4.5(1-13)	6.8±3.6(2-12)
3	6.5±1.4(4-8)	7.7±2(4-9)
4	7.7±3.1(4-12)	13.5±5.2(5-19)
5	10.8±1.9(9-14)	13.5±3.7(7-18)
6.	21.3±2.9(18-26)	18.5±5(11-24)
7	17.5±2.7(13-21)	16.8±2.3(13-19)
8	6.3±1.2(5-8)	12.7±3.5(7-16)
9	5.7±1.6(3-8)	5.3±2.7(1-8)
10	20.1±7.1(12-28)	19.7±3.4(17-26)
P değeri	0,000*	0,000*

* $p < 0,05$ Kruskal-Wallis



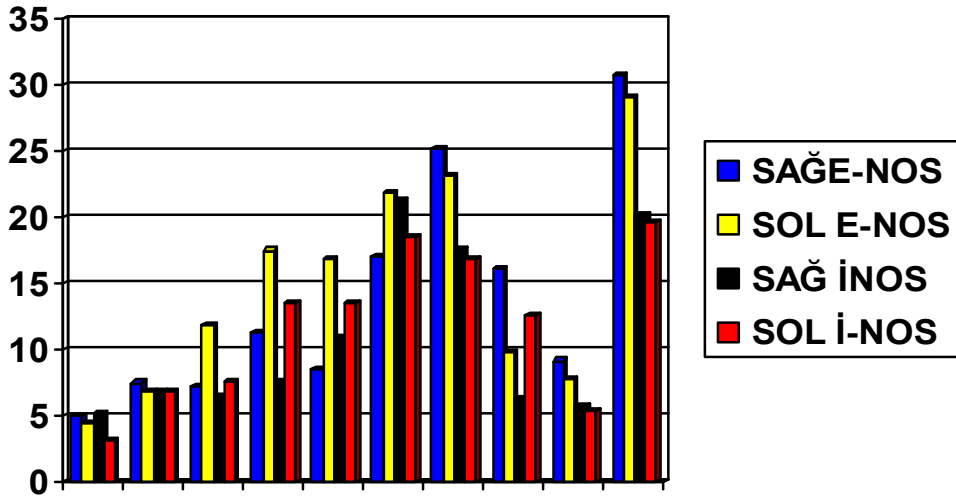
Şekil 9 Bilateralvazektomi-6hafta (Grup7)



Şekil 10 Ozonoterapi Grubu (Grup 10)

Sekizinci ve dokuzuncu gruplarda sağ ve sol testis için pozitif i-NOS hücre boyanmalarının ilk üç gruptaki değerlere yakın olduğu görüldü.

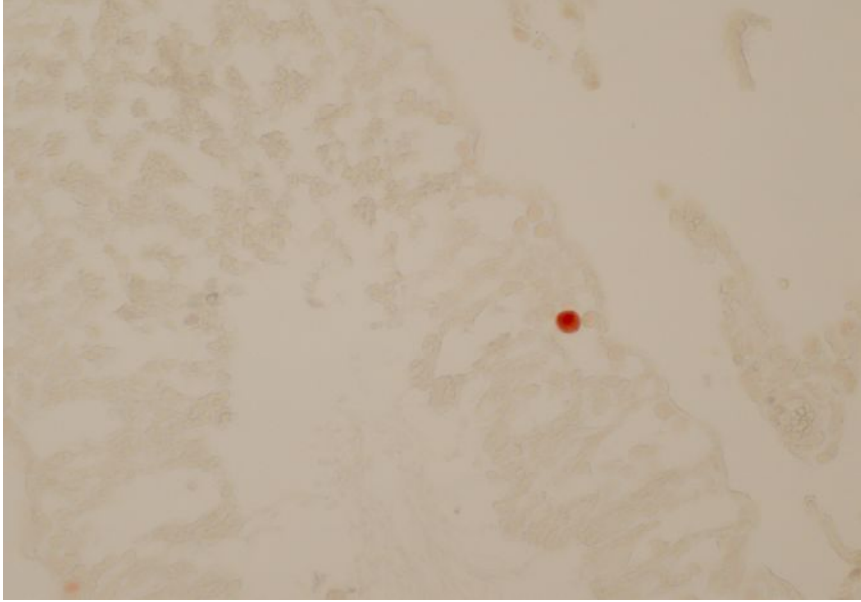
Fakat 10. gruptaki değerler sekizinci ve dokuzuncu gruplara kıyasla belirgin derece yüksek idi.



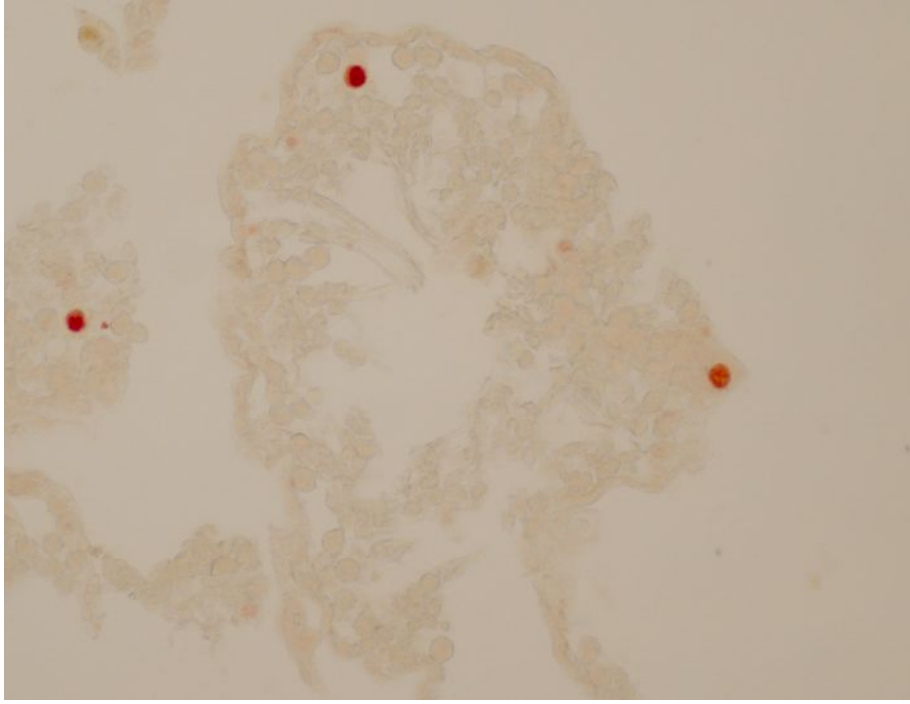
Şekil 11 e-NOS ve i-NOS ile boyanmış ortalama hücre sayılarının gruplar arası dağılımı

3.3 TUNEL Yöntemi ile Apoptotik Hücre Boyanmaları

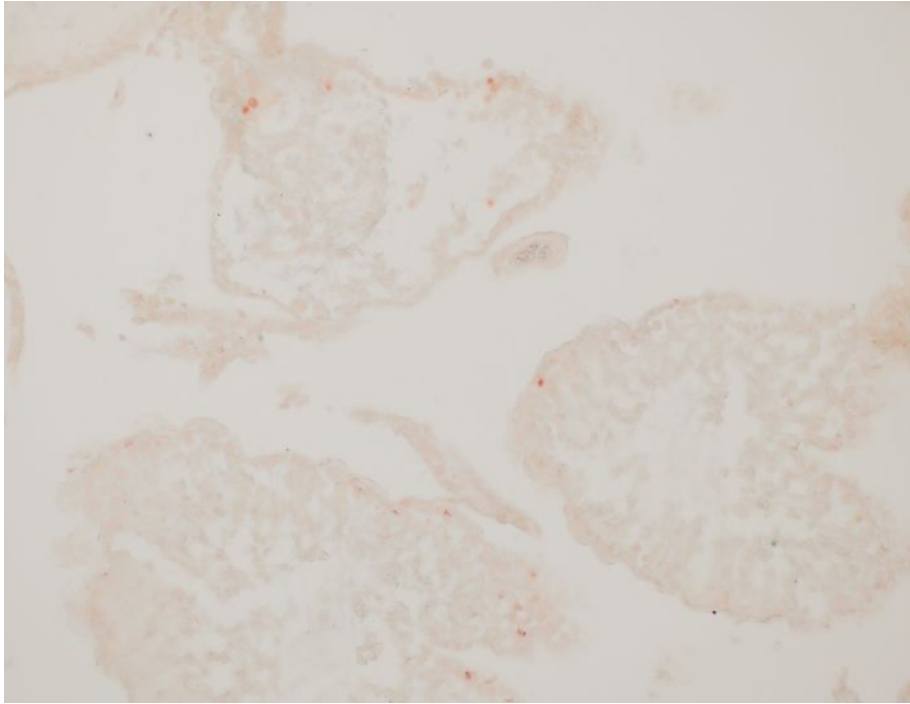
Apoptozis düzeylerini TUNEL yöntemini kullanarak sadece sol testiste inceledik. e-NOS ve i-NOS immün reaktiviteleri ile apoptotik indeks değerlerinin korele olduğunu saptadık. Kontrol grubu, sham grupları ve vazektomi sonrası ozonterapi alan gruplarda apoptotik indeks oranları birbirine yakın olarak saptandı ($p=0,084$). IV.,V.,VI.,VII. ve X. grupların ortalama apoptotik indeks değerleri birbirine yakındı ($p=0,050$) . Kontrol grubu ile IV.,V.,VI.,VII. ve X. gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.000^*$).



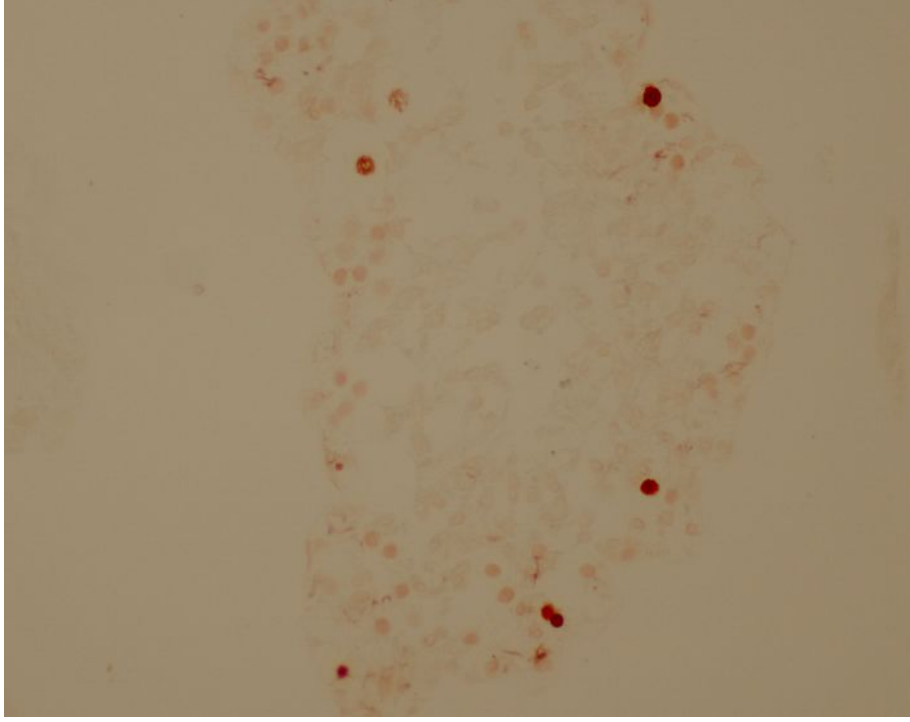
Şekil 12 Kontrol Grubu(Grup 1)



Şekil 13 Sol Vazektomi-4 Hafta (4.Grup)



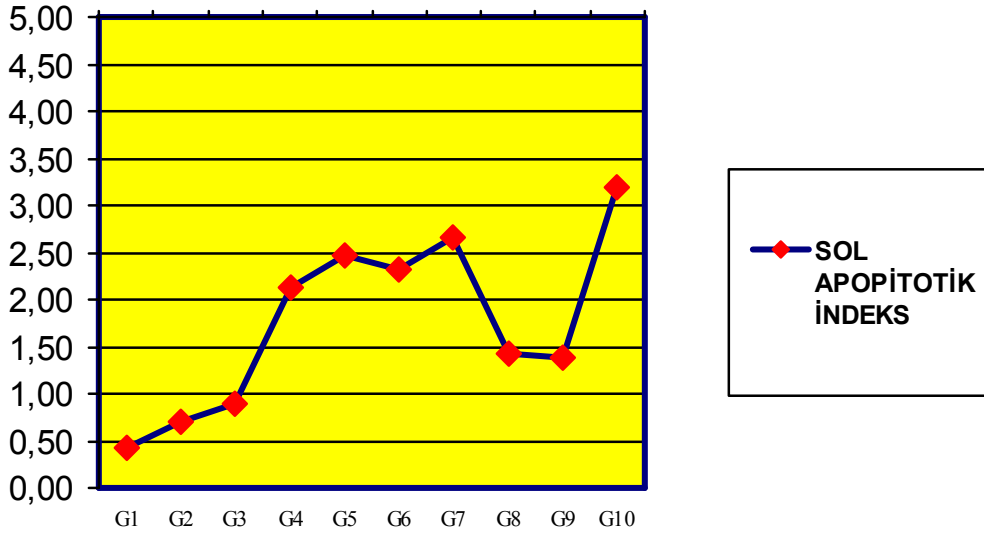
Şekil 14 Bilateral Vazektomi- 4Hafta (6.Grup)



Şekil15 Bilateral Vazektomi-6Hafta(7.Grup)



Şekil 16 Ozonterapi Grubu (10.Grup)



Şekil 17 Sol Testis apoptotik indeksinin gruplar arası dağılımı

Tek taraflı vazektomi yapılan gruplar arasında apoptotik indeks düzeylerinin süreyle ilişkili olmadığı saptandı. 4., 5., 6. ve 7. gruplar arasındaki apoptotik indeks değerleri birine yakın olduğu gözlemlendi.

Ozonterapi uygulanan 10. grupta ortalama apoptotik indeks değeri 3.1 ± 0.7 olarak bulundu. Bu değer tüm gruplardaki apoptotik indeks değerlerinden daha yüksekti. Bu gruptaki apoptozis artışı cerrahi geçiren tüm gruplardan özellikle de vazektomi sonrası ozonterapi almış gruplardan daha fazla idi.

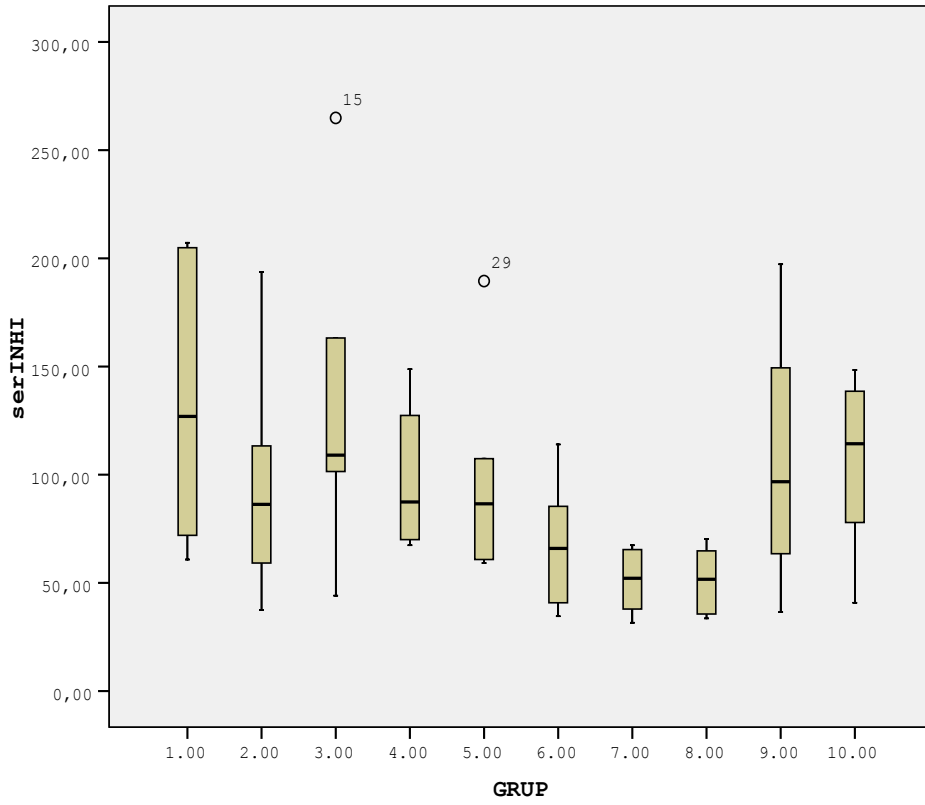
Çizelge 8 Sol Testis Apoptotik İndeksi (Ort \pm STD)

Sol Testis Apoptotik İndeks Ort \pm STD									
p=0.000*									
Gr 1	Gr2	Gr3	Gr 4	Gr 5	Gr 6	Gr 7	Gr8	Gr 9	Gr 10
0.4 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3	0.9 \pm 0.4	2.1 \pm 0.6	2.5 \pm 0.4	2.3 \pm 0.7	2.7 \pm 0.9	1.4 \pm 0.6	1.4 \pm 0.5	3.2 \pm 0.7

*P<0.05 Kruskal Wallis

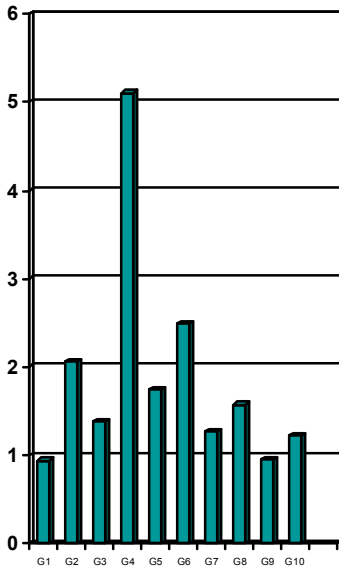
3.4 Biyokimyasal Değerlendirme

Serum testosteron, östradiol, FSH ve LH düzeyleri tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi. Serum inhibin-B düzeyleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu (*p< 0.019).

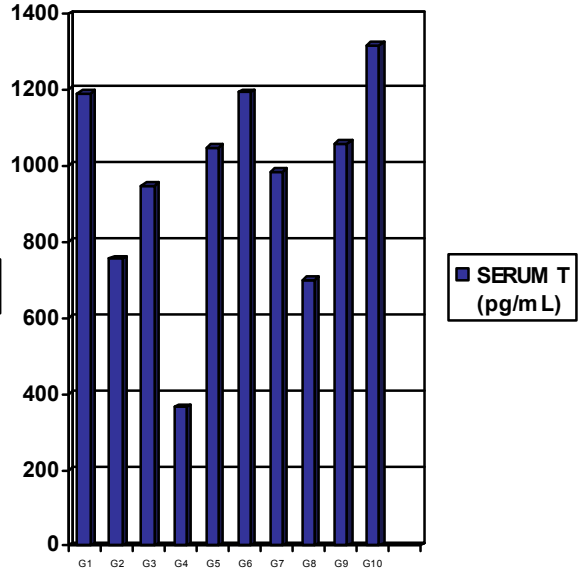


Şekil 18 Serum ortalama inhibin-B değerinin gruplar arası dağılımı

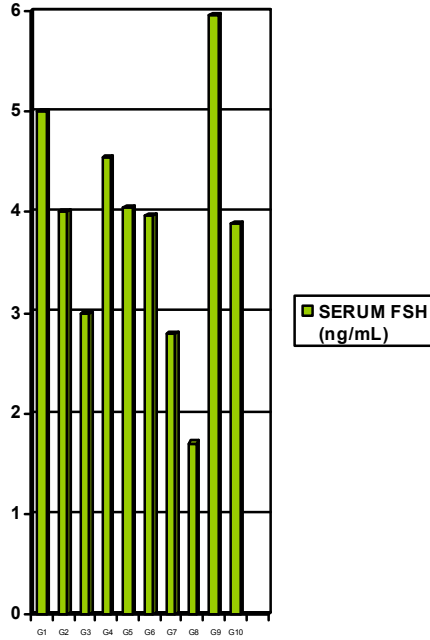
Serum inhibin-B düzeyleri bilateral vazektomi uygulanan 6. ve 7. gruplarda ve 8. grupta diğer gruplara kıyasla daha düşük oranda saptandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı idi (* $p < 0.019$)



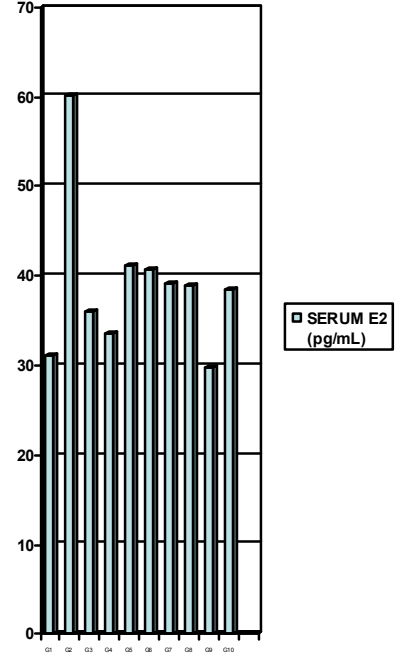
Şekil 19 Ortalama serum LH düzeyleri



Şekil 20 Ortalama Serum T düzeyleri



Şekil 21 Ortalama Serum FSH düzeyleri



Şekil 22 Ortalama Serum E2 düzeyleri

Çizelge 9 Semen Hormon Parametreleri

Grup	Semen E2 Ort±STD (min-maks) p=0,698	Semen T Ort± STD (min-maks) p=0,073
1	2.4±1.2 (0.93-4.05)	131.9±59.8 (69.7-206.9)
2	1.6±1.8 (0.04-4.20)	74.7±58.6 (20-173.3)
3	2.62±2.6 (0.61-7.65)	47.3±28.3 (4.8-87.6)
4	11.2±15.4 (0.38-36.90)	63.8±30.6 (11.9-91.3)
5	2.7±2.8 (0.04-6.32)	100.1±74.3 (12.2-195.3)
6	4±3.3 (0.38-8.65)	163.1±67.8 (106.6-289.9)
7	4.2±3.2 (0.0-9.73)	102.1±32.9 (67.7-164.6)
8	8.3±13.5 (0.30-35.62)	160.3±51.1 (91.3-217)
9	5.8±3.5 (1.72-9.18)	189.8±105.8 (47.4-274.9)
10	6.2±9.2 (0.89-24.60)	128.4±37.2 (93.7-195.3)

* p< 0,05 Kruskal-Wallis

Çizelge 10 Serum Hormon Parametreleri

Grup	Serum E2 Ort± STD (min-mak) P=0,313	Serum T Ort± STD (min-mak) P=0,259	Serum LH Ort± STD (min-mak) P=0,076	Serum FSH Ort± STD (min-mak) P=0,100	Serum INH-B Ort± STD (min-mak) P=0,059
1	31.1±11.6 (13.3-40.2)	1191.2±677.8 (175.3-1984)	0.94±0.37 (0.5-1.5)	5±3.32 (2.3-11.4)	133.1±66.5 (60.8-207.2)
2	60.2±66 (22.1- 193.7)	755±538.6 (307.2-1760)	2.07±1.15 (0.4-3.4)	4±1.57 (2.3-5.8)	96.1±55.5 (37.5-193.7)
3	36±13.1 (25.8-61.4)	947.7±469.2 (427.2-1745)	1.38±0.88 (0.3-2.5)	3±0.98 (1.5-4.6)	132±75.3 (44.1-264.9)
4	33.5±6 (27-42.2)	365.5±339.2 (50.4-1005)	5.11±5.95 (1.4-16.9)	4.54±1.80 (2.1-7.6)	98.1±32.8 (67.4-148.8)
5	41.1±16.8 (28.1-72.8)	1047±1033.3 (344.5-3017)	1.74±0.67 (0.68-2.3)	4.06±1.70 (1.7-5.9)	98.3±49.1 (59.2-189.5)
6	40.7±6.8 (31.3-50.8)	1192.7±1181 (407.9-3565)	2.49±2.48 (0.8-6.8)	3.96±1.76 (1.9-6.6)	67.8±29.9 (34.6-114)
7	39.2±8.5 (27.7-52.5)	984.1±696 (331.7-1929)	1.27±0.68 (0.3-2.3)	2.79±2.27 (0.2-5.5)	51.1±14.5 (31.6-67.4)
8	39±12.7 (30.6-64.1)	699±475.6 (217.2-1282)	1.57±0.64 (0.9-2.4)	1.71±1.44 (0.1-3.3)	51.3±16.6 (33.6-70.3)
9	29.7±4.1 (22.9-34.9)	1059.8±584.6 (521.1-2119)	0.95±1.06 (0.2-3.1)	5.96±2.83 (3.3-9.4)	106.7±60.8 (36.5-197.3)
10	38.5±4.5 (30.8-44.7)	1319.1±1095 (311.2-2922)	1.22±0.65 (0.6-2.3)	3.88±2.16 (2.0-7.3)	105.7±40.3 (40.8-148.4)

* p< 0,05 Kruskal-Wallis

4.TARTIŞMA

Vazektomi güvenilir ve efektif kontrasepsiyon yöntemidir (228). Vazektomi geçiren bireyler ilerleyen dönemlerde fertilité isteğiyle hekime başvurabilmektedirler. Vazektomi sonrası çocuk sahibi olmak isteyen bireylerde mikrocerrahi vazovazostomi uygun bir cerrahi yaklaşımlarına rağmen Belker ve ark. yaptıkları çalışmada vazektomi sonrası 9-14 yıllık intervalde mikrocerrahi vazovazostomi ile vaz devamlılığını %79, gebelik oranlarını %44 olarak saptamışlardır (88). Biz bu çalışmada vazektominin spermatogenez üzerine etkilerini immünhistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle inceledik.

İnsanlarda yapılan bir çalışmada vazektomi sonrası seminifer tubüllerde hidrostatik basınç artışına bağlı seminifer epitelinde dejenerasyon tespit edilmiştir (229). McVicar'ın yaptığı çalışmada ise vazektomize bireylerde birim alan düşen Sertoli hücre sayısında azalma olmadan, spermatid/sertoli hücre oranının azaldığı tespit edilmiştir (230). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda da vazektominin etkileri türler arasında bile bazı farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin köpeklerde ortaya çıkan intraluminal basınç artışı, kobaylarda lökosit infiltrasyonu sonucu gelişen otoimmün orşit, tavşanlarda bazal membran boyunca immün kompleks birikimi sonucu ortaya çıkan seminifer epitel dejenerasyonu(214,215,216), hamsterlerde sperm granülomu ile ilişkili testiküler atrofi vazektomi sonrası spermatogenezini etkileyen değişikliklerdendir (211,212,216,217). Lue ve ark. vazektomi modeli oluşturdukları hamsterlerde spermatozoidlerde apoptozis oranını artmış olarak bulmuşlardır.(231) Kubota ve ark. ratlarda vazektominin neden olduğu spermatogenez hasarı ile germ hücrelerindeki apoptozisi ilişkili bulmuşlardır. Ve apoptozisin artmış olduğu hücre tiplerinde e-NOS ve i-NOS ekspresyonlarının da artmış olduğunu gözlemişlerdir (222). Başaran ve ark. ratlar üzerinde yaptığı bir çalışmada, testis torsiyonu sonrası, e-NOS ve i-NOS aktivitesini arttığını gözlemişlerdir (225).

Bizim yaptığımız çalışmada en fazla e-NOS immünreaktivite gösteren hücreler erken ve geç spermatidler, en az boyanan hücreler ise spermatogonyumlardı. Sertoli hücre ekspresyonları ise Leydig hücrelerinden daha fazla idi. Leydig hücrelerindeki i-NOS immünhistokimyasal boyanmaları, e-NOS

immünohistokimyasal boyanmalarına göre daha yoğundu. Bu çalışmada 4., 5., 6., 7. ve 10. gruplarda i-NOS ve e-NOS ekspresyonları ve apoptotik indeksi artmış olarak tespit ettik. 6.grupta pozitif e-NOS hücre boyanmalarının ort±std değerleri sağ testis için 17±3.1, sol testis için 21.8±5.2 idi. 7. grupta ort± std değerleri sağ testiste 25.2±3, sol testiste 23.2±2 idi. Bu değerler kontrol grubunda daha düşüktü; sağ ve sol testis için sırasıyla 5±2.7, 4.5±2.9 idi.

6. grupta pozitif i-NOS hücre boyanmalarının ort± std değerleri sağ testis için 21.3±2.9, sol testis için 18.5±5 idi. 7. grupta ort±std değerleri sağ testiste 17.5±2.7, sol testiste 16.8±2.3 idi. Bu değerler kontrol grubunda sağ ve sol testis için sırasıyla 5.2±3.8 , 3.2±1.3 idi.

6. grupta apoptotik indeks ort±std değerleri 6. grupta 2.3±0.7, 7 grupta 2.7±0.9; kontrol grubunda ise 0.4±0.3 olarak bulundu. Buda bize vazektomi yapılan tüm gruplarda apoptozis artışının kontrol grubuna göre daha fazla olduğunu göstermektedir.

Bizim yaptığımız çalışmada vazektomi sonrası artmış i-NOS ve e-NOS immünohistokimyasal boyanmaları ile TUNEL yönteminde ortaya çıkan apoptotik hücre artışının korelasyon gösterdiği görülmüştür. Bu yüzden artmış NO düzeyinin apoptozis indükleyicisi olduğunu söyleyebiliriz. NO düzeylerindeki artışa oksidatif strese bağlı serbest radikal oluşumundaki artışın neden olduğunu düşünmekteyiz.

Tyler ve Alexander'ın yaptığı çalışmada vazektominin üreme hormonları üzerine etkisi olmadığı saptanmıştır (215). Miller ve ark. yaptığı çalışmada vazektomi sonrası seminal vezikül androjen seviyeleri arasında fark saptamamıştır (219). Sinha Hikim ve ark'ın yaptığı çalışmada da GnRh antagonistleriyle yapılan yoksunluk ile apoptozis ilişkilendirilmiştir (220). Smith primer obstrüktif azospermili hastalarda MESA başarısını değerlendirmiş ve MESA'nın başarı oranı ile serum FSH, LH, testosteron ve inhibin-B arasında korelasyon saptamamıştır (221).

Bizim yaptığımız çalışmada ise vazektomiden gerek dört hafta sonra, gerekse altı hafta sonra apoptoziste artış olmasına rağmen vazektominin serum FSH, LH, testosteron, östradiol düzeylerine ve seminal plazmada testosteron, östradiol düzeylerine etkisi anlamlı bulunmamıştır. Serum inhibin-B düzeyleri bilateral vazektomi uygulanan 6.grupta ort±std 67.8±29.9, 7. grupta ort±std 51.1±14.5 iken kontrol grubunda ise ort±std 133.1±66.5 olarak bulunmuştur.

Çift taraflı vazektomi uygulanan grupların kontrol grubundan daha düşük inhibin-B seviyelerine sahip olması Sertoli hücrelerindeki apoptozis artışından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Serum gonadotropin düzeylerinin tüm gruplarda benzer olması nedeni ile apoptozis artışının gonadotropin inhibisyonundan kaynaklanmadığını söyleyebiliriz. Ancak bu çalışma ile gonadotropin inhibisyonunun apoptozise neden olup olmayacağı fikrine sahip olamayız.

Yapılan bazı çalışmalarda i-NOS immunoreaktivitesinin artışına bağlı olarak oluşan NO'nin süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek peroksinitrit anyonlarını (OONO) oluşturduğu ve lipit peroksidasyon oluşumunu artırdığı rapor edilmiştir (232,233,234,235). Jang ve ark. yaptığı çalışmada ozon gazına maruz bırakılmış farelerin akciğerinde e-NOS aktivitesini artmış i-NOS aktivitesi ise azalmış olarak bulmuşlardır (226). Chen ve arkadaşlarının renal iskemili ratlara ozonterapi uyguladıkları çalışmada ozonterapi grubunda ve iskemi grubunda renal oksidatif stresi, e-NOS ve i-NOS seviyelerini artmış olarak saptamışlar ancak ozon ve iskemi kombinasyonunda NOS seviyelerinin artış göstermediğini saptamışlardır (227).

Bizde ozonterapi aracılığı ile oluşan serbest radikallerin, ortamda bulunan NO ile arasındaki etkileşimi ve apoptozisi nasıl yönlendireceğini değerlendirmeye çalıştık

Bu çalışma bize vazektomi sonrası, i-NOS ve e-NOS immunoreaktivitesinin artmış olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak vazektomi sonrası serbest oksijen radikallerinin ve oksidatif stresin artışı apoptozis düzeylerindeki artışa neden olabilir.

Bizim yaptığımız çalışmada e-NOS immünohistokimyasal boyanmalarının ort±std değerlerini ozonterapi uygulanan 10. grupta 29 ± 5.2 , kontrol grubunda 4.5 ± 2.9 , vazektomi sonrası ozonterapi uygulanan 9.grupta 7.8 ± 3.8 saptadık. Bu bulgular i-NOS immünohistokimyasal boyanmaları ve apoptotik indeks değerleri için korele bulundu. Bu değerlerden çıkarabileceğimiz sonuç, ozonterapi uygulananın, kontrol grubu ve vazektomi+ozonterapi gruplarından daha fazla apoptozise artışa neden olduğudur. 10 gruptaki apoptozis artışının vazektomi sonrası ozon alan gruptan daha yüksek olması, bize ozon gazının vazektomi sonrası artmış serbest radikallerle tepkimeye girebileceği konusunda ışık tutmaktadır.

Ozonterapi normal bireylerde serbest radikal oluşumunu artırarak NO düzeylerini artırmış olabilir. Ancak, ortamda serbest radikal mevcudiyetinde ozon gazının serbest oksijen molekülü sayesinde ortamdaki radikalleri inhibe edici etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz.

SONUÇ

1-Ratlarda vazektomi sonrası süreyle doğru orantılı olarak testislerde apoptozis artmaktadır. i-NOS, e-NOS immünohistokimyasal boyanmalarında ve apoptotik indeksteki artışlar bunu desteklemektedir.

2-Sağlıklı ratlarda altı haftalık ozonterapi sonrası testislerde apoptotiz artışını TUNEL yöntemi ve i-NOS ve e-NOS ekspresyonundaki artış ile saptadık.

3-Bilateral vazektomi uygulanıp altı hafta süreyle ozonterapi uyguladığımız rat gruplarındaki apoptozis oranı, hemen hemen kontrol grubuna eşdeğer bulundu.

4- Vazektomi sonrası erken dönemde serum FSH, LH, testosteron ve östradiol düzeylerinde değişiklik saptanmadı. Ancak bilateral vazektomi uygulanan ratlarda serum inhibin-B düzeyleri kontrol grubuna ve tek taraflı vazektomi uygulanan gruplara kıyasla daha düşük olduğu görüldü. Buda bize sertoli hücrelerinde üretilen ve germ hücrelerinin kontrolünde salınan inhibin-B'nin, artmış germ hücre apoptozisi sonrası azalmasını açıklayabilir.

5- Sağlıklı ratlarda ozonterapi sonrası apoptozis artışı olması, vazektomi geçirenlerde uygulanan ozonterapi ile apoptozisin azalması bize ozonterapinin oksidatif strese maruz kalmış ratlarda apoptozisi azaltıcı etkisinin olabileceğini gösterdi.

Ozonterapinin apoptozis üzerine etkilerini daha net değerlendirmek için apoptozisi düzenleyen mediatörlerin ortaya çıkarılması gerektiği kanaatindeyiz. Ayrıca ozonterapinin oksidatif stres üzerine etkileri aydınlandıkça oksidatif strese maruz kalmış bireylerde tedavisinin gün geçtikçe artacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- 1 Schwingl PJ, Guess HA. Safety and effectiveness of vasectomy. *Fertil Steril.* 73(5):923-36, 2000.
- 2 Kubota Y, Sasaki S, Kubota H, Tatsura H, Kohri K. A study on the mechanism of the spermatogenic damage after vasectomy in rats. 92(1):13-22, 2001
- 3 Oktem G, Altay B, Turna B, Aktug H, Yavasoglu A, Yilmaz O, Semerci B. Determination of nitric oxide synthase activity and apoptosis of germ cells in different obstruction models. *Acta Histochem.* 111(2):119-26, 2009.
- 4 O'Neill DA, McVicar CM, McClure N, Maxwell P, Cooke I, Pogue KM, Lewis SE. Reduced sperm yield from testicular biopsies of vasectomized men is due to increased apoptosis. *Fertil Steril.* 87(4):834-41. 2007
- 5 Prader A. Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle.* 7(6):240-3, 1966.
- 6 Lennox B, Ahmad KN. The total length of tubules in the human testis. *J Anat.* 107(Pt 1):191, 1970
- 7 Beck EM, Schlegel PN, Goldstein M. Intraoperative varicocele anatomy: a macroscopic and microscopic study. *J Urol.*;148(4):1190-4. 1992.
- 8 Ozdiler E, Aydos K. *Klinik androloji*, 2000
- 9 Aydos K, *Androloji ders notları*
- 10 Campbell *üroloji* 8. baskı
- 11 Kaler LW, Neaves WB. Attrition of the human Leydig cell population with advancing age. *Anat Rec.* 192(4):513-8. 1978
- 12 Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med.*;201(2):125-40. 1992
- 13 Christensen AK. Leydig cells. In: Greep RO, Astwood EB, Hahninton DW, Geiger S (Eds). *Handbook of Physiology.* Washington; American Physiological Society, 1975: p.57-94.
- 14 Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 1973; 9:500-2.

- 15 Haider SG. Cell Biology of Leydig Cells in the Testis. *Int Rev Cytol* 2004; 233:181-241.
- 16 Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Levallet J. Reproductive system: Aromatase and estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2002; 193:137–143.
- 17 Genissel C, Carreau S. Regulation of the aromatase gene expression in mature rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 178:141–6.
- 18 Rouiller-Fabre V, Lecref L, Gautier C, Saez JM, Habert R. Expression and effect of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology* 1998; 139:2926–34.
- 19 Gartner, L.P. at Hiatt, J.L., 2003, *Color Textbook of Histology*, 2nd Edition
- 20 Junqueira, L.C. at Carneiro, J., 2003, *Basic Histology Text&Atlas*, 10th edition, Mc Graw Hill Campony
- 21 Kierszenbaum, A.L., 2002, *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*, Mosby
- 22 Leesen, T.S., Leesen, C.R. at Paparo, A.A., 1988, *Text/Atlas of Histology*, W.B.Saunders Company
- 23 Mruk, D.D. at Cheng, C.Y., 2004, Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis, *Endocrine Reviews*
- 24 Ross, M.H., Kaye, G.I. at Pawlina, W., 2003, *Histology A Text and Atlas*, Fourth Edition, Lippincott Williams &Wilkins,
- 25 Stevens, A. at Lowe, J., 2005, *Human Histology*, Elsevier Mosby, 3rd Edition
- 26 Hassa, H., 2003, İnfertilite olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuar Uygulamaları Osmangazi Üniversitesi Yayınları, Eskisehir
- 27 Kierszenbaum, A.L., 2002, *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*, Mosby
- 28 Ross, M.H., Kaye, G.I. at Pawlina, W., 2003, *Histology A Text and Atlas*, Fourth Edition, Lippincott Williams &Wilkins,
- 29 Zhengwei, Y., Wreford, N.G., Royce, P. at Kretser, D.M., 1990, A

- Quantitative Study of Spermatogenesis in the Developing Rat Testis, *Biology of Reproduction*, 43, 629-635 p.
- 30 Zhengwei, Y., Mclachlan, R.I., William, J.B. at Wreford, N.G., 1997, Quantitative (Stereological) Study of Normal Spermatogenesis in the Adult Monkey (*Macaca fascicularis*), *Journal of Andrology*, 18, 681-87 p.
- 31 Cheng. C.Y. at Dolores D. M., 2002, "Cell Junction Dynamics in the Testis: Sertoli-Germ Cell Interactions and Male Contraceptive Development" *Physiol Rev* 82: 825-874 p.
- 32 Cooper, G.M. at Hausman, E., 2007, *The Cell A Molecular Approach*, ASM Press, USA 4th Edition
- 33 Gartner, L.P. at Hiatt, J.L., 2003, *Color Textbook of Histology*, 2nd Edition
- 34 Junqueira, L.C. at Carneiro, J., 2003, *Basic Histology Text&Atlas*, 10th edition, Mc Graw Hill Campony
- 35 Leesen, T.S., Leesen, C.R. at Paparo, A.A., 1988, *Text/Atlas of Histology*, W.B.Saunders Company
- 36 Kierszenbaum, A.L., 2002, *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*, Mosby
- 37 Mruk, D.D. at Cheng, C.Y., 2004, Sertoli-Sertoli and Sertoli-Germ Cell Interactions and Their Significance in Germ Cell Movement in the Seminiferous Epithelium during Spermatogenesis, *Endocrine Reviews*
- 38 Enders, G.C., Henson, J.H. at Millette, C.F., 1986, Sertoli Cell Binding to Isolated Testicular Basement Membrane, *The Journal of Cell Biology*
- 39 Erkoçak, A., 1975, *Genel Histoloji*, Ankara Üniv. Tıp Fak. Yayınları, 4. Baskı
- 40 Stevens, A. at Lowe, J., 2005, *Human Histology*, Elsevier Mosby, 3rd Edition
- 41 Cyr1, D.G., Gregory, M., Dubé, É., Dufresne, J., Chan, P.T. K. at Hermo, L., 2007, Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans, *Asian Journal of Andrology*; 9, (4): 463–475 p.
- 42 Dym, M. at Fawcett, W., 1970, The Blood-Testis Barrier in the Rat and the Physiological Compartmentation of the Seminiferous Epithelium, *Biology*

- of Reproduction, 3, 308-326 p.
- 43 Enders, G.C., Henson, J.H. at Millette, C.F., 1986, Sertoli Cell Binding to Isolated Testicular Basement Membrane, The Journal of Cell Biology
- 44 Gartner, L.P. at Hiatt, J.L., 2003, Color Textbook of Histology, 2nd Edition
- 45 Cheng. C.Y. at Dolores D. M., 1997, Quantitative (stereological) study of normal spermatogenesis in the adult monkeys (*Macaca fascicularis*) Journal of Andrology, 18, 681-687 p.
- 46 Zhengwei, Y., Wreford, N.G., Royce, P. at Kretser, D.M., 1990, A Quantitative Study of Spermatogenesis in the Developing Rat Testis, Biology of Reproduction, 43, 629-635 p.
- 47 Zhengwei, Y., Mclachlan, R.I., William, J.B. at Wreford, N.G., 1997, Quantitative (Stereological) Study of Normal Spermatogenesis in the Adult Monkey (*Macaca fascicularis*), Journal of Andrology, 18, 681-87 p.
- 48 Cheng. C.Y. at Dolores D. M., 1997, Quantitative (stereological) study of normal spermatogenesis in the adult monkeys (*Macaca fascicularis*) Journal of Andrology, 18, 681-687 p.
- 49 Larsen, W.J., 2003, Human Embryology, Churchill Livingstone, 3rd edition
- 50 Guyton, A.C. at Hall, J.E., 1996, Textbook of medical physiology, Harcourt Brace, 9th Edition
- 51 Gnessi, L., Fabbri, A. at Spera, G., 1997, Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of The Testis: an integrated system with hormones and local environment, Endocrin Review
- 52 Ganong, W.F., Ganong Tıbbi Fizyoloji, 1995, (Çev.: Doğan, A.), Baris Kitapevi, İstanbul
- 53 England, M.A., 1996, Life Before Birth, Mosby-Wolfe, 2nd edition
- 54 Carlson, B.M., 2004, Human Embryology and Developmental Biology, Elsevier Mosby Updated Edition
- 55 Gürsoy, E. ve Koptagel, E., 1997, Embriyoloji Atlası, Esnaf Ofset Matbaacılık
- 56 Drews, U., 2000, Color Atlas of Embryology, Nobel Tıp Kitapevi,
- 57 Larsen, W.J., 2003, Human Embryology, Churchill Livingstone, 3rd edition
- 58 Moore, K.L., 2003, The Developing Human Clinically Oriented

Embryology, Saunders, 7th Edition

59 Sadler, T.W., 1995, Langman's Medical Embryology, Mass Publishins CO., 7th Edition

60 Yıldırım, M., Okar, D. ve Dalçık, H., 2002, İnsan Embriyolojisi, Nobel Kitabevleri

61. Seeley, R.R., Stephens, T.D. at Tate, P., 1999, Essential of Anatomy and Physiology, Third Edition, MC Graw Hill, North America.

62 Shen, H., 2001, New concepts and test methods of curve profile area density in surface: Estimation of aeral density on curved spatial surface, Image Analyze Stereology, 20, 59-64 p.

63. Pierik FH, Vreeburg JT, Stinjen T et al: Serum Inhibin B As A Marker Of Spermatogenesis. J Clin Endocrinol Metab 1998, 83: 3110-3114.

64. Meachem SJ, Niesclag E, Simoni M: Inhibin B In Male Reproduction: Pathophysiology And Clinical Relevance. Eur J Endocrinol 2001; 145: 561-571.

65. Meachem SJ, Niesclag E, Simoni M: Inhibin B In Male Reproduction: Pathophysiology And Clinical Relevance. Eur J Endocrinol 2001; 145: 561-571.

66. Klingmüller D, Haidl G: Inhibin B In Men With Normal And Disturbed Spermatogenesis. Hum Reprod 1997, 12: 2376-2378.

67. Richthoff J, Rylander L, Jonsson BA, Akesson H, Hagmar L, Nilsson-Ehle P, Stridsberg M, Giwercman A.: Serum Levels Of 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (Cb-153) In Relation To Markers Of Reproductive Function In Young Males From The General Swedish Population. Environ Health Perspect 2003, 111: 409-13.

68. Foresta C, Bettella A, Rossato M, La Sala G, De Paoli M, Plebani M.: Inhibin B Plasma Concentrations In Oligozoospermic Subjects Before And After Therapy With Follicle Stimulating Hormone. Hum Reprod 1999, 14: 906-12.

69. Anderson RA, Irvine DS, Balfour C, Groome NP, Riley SC.: Inhibin B In Seminal Plasma: Testicular Origin And Relationship To Spermatogenesis. Hum Reprod 1998, 13: 920-6.

70. Luboshitzky R, Kaplan-Zverling M, Shen-Orr Z, Nave R, Herer P.: Seminal Plasma Androgen/Oestrogen Balance In Infertile Men. *Int J Androl* 2002, 25: 345-351.
71. Akiyama HA: Study On Testicular Aromatase Activity-Spermatogenic Damage In High Testicular E2 Models Of Rat. *Nippon Hiyokika Gakkai Zasshi* 1997, 88: 649-657.
72. H. Murat TEZER, Selçuk GÜVEN, Ahmet ERSAY, Bülent EROL, Ateş KADIOĞLU Reconstructive surgery in male infertility: The technique and predictive parameteres.
73. Poore RE, Schneider A, DeFranzo AJ, Humphries ST, Woodruff RD, Jarow JP. Comparison of puncture versus vasotomy techniques for vasography in an animal model. *J Urol* 1997;158:464-466.
74. Borovikov A. Treatment of large vasal defects. In: Goldstein M ed. *Surgery of Male Infertility*. Philadelphia: WB Saunders, 1995, pp. 77-95.
75. Anderson, R., at Baird, D. T., 2002, *Reviews, Male Contraception, Endocrin*
76. Delilbası, L., Balaban, B. ve Ayas, B., 1997, *Tüp Bebek, Yardımcı Üreme Tekniklerinde Laboratuar Yöntemleri*, Baysev
77. Scott, R., Deane, R. at Fletcher C. R., 1975, *Urology Illustrated*, Churchill Livingstone
78. Schlegel PN, Goldstein M. Vasectomy. In: Goldstein M (ed). *Surgery of Male Infertility*. Philadelphia: WB Saunders, 1995:35-45.
79. Li SQ, Goldstein M, Zhu J, Huber D. The no-scalpel vasectomy. *J Urol* 1991;145:341-344.
80. Labrecque M, Nazerali H, Mondor M, Fortin V, Nasution M. Effectiveness and complications associated with 2 vasectomy occlusion techniques. *J Urol* 2002;168:2495-2498; discussion 2498.
81. Schwingl PJ, Guess HA. Safety and effectiveness of vasectomy. *Fertil Steril* 2000;73:923-936.
82. Hatcher RA et al.(Eds) *Kontraseptif yöntemler: Uluslar arası Basım*, (Dervişoğlu AA, çev., ed), Demircioğlu Matbaacılık, Ankara 1990.

- 83 T.C. Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü. Kontraseptif Yöntemler. Ulusal Aile Planlaması Hizmet Rehberi, Cilt II, Anadolu Matbaası, İstanbul, 1995.
- 84 Goldstein M. Surgical Management of Male Infertility and Other Scrotal Disorders. In; Campbell's Urology, Volume 2, pp 1541-1547, 2002.
- 85 Weidner W, et al. EAU Guidelines on Male Infertility. Eur Urol 2002; 42:313-322.
- 86 Anawalt BD, Amory JK. Advances in male hormonal contraception. Annals of Medicine 2001;33:587-595.
- 87 Wang C, Swerdloff RS. Male Contraception. Best Practice & Research in Clinical Obstetrics & Gynaecology 2002;16:193-203.
- 88 Belker AM, Thomas AJ Jr, Fuchs EF, Konnak JW, Sharlip ID. Results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group. J Urol 1991;145:505-511.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=1997700&dopt=Abstract
- 89 Erdoğan B B (2003): Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. Akciğer Arşivi, 4: 165-174.
90. Hikim A P S, Wang C, Leung A R, Swerdloff S (1995): Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. Endocrinology, 136 (6): 2770-2775.
91. Öztürk F (2002): Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9 (2): 143-148.
- 92 Kumar V. Abbas A, Fausto N. Cellular Adaptations, Cell Injury and Cell Death. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N., eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Elsevier Philadelphia, 2005:26-32.
- 93 Willingham M.C. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. J Histochem Cytochem. 1999;47:1101-1109.
- 94 Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. JNH Res 3:75, 1991.

- 95 Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-245, 1972.
- 96 Ulukaya E (2007): Apoptozis ders notları. Erişim: <http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf>
- 97 Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 15: 35-43, 1993.
- 98 Cohen J J. Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130, 1993.
99. Galle P R (1997): Apoptosis in liver disease. *Journal of Hepatology*, 27: 405-412.
100. Walker P R, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M (1999): Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Enzymology*, 17: 329-338.
- 101 Öktem S, Özhan M H, Özol D (2001): Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2 (1): 91-95.
- 102 Zhang J, Xu M (2002): Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. *Trends in Cell Biology*, 12 (2): 84-89.
103. Wijsman J H, Jonker R R, Keijzer R, Velde C J H, Cornelisse C J, Dierendonck J H V (1993): A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41 (1): 7-12.
- 104 .Dayan Y B, Kaveri S V, Kazatchkine M D, Shoenfeld Y (2000): Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies?. *Medical Hypotheses*, 55 (2): 103–108.
- 105 Roshal M, Zhu Y, Planelles V (2001): Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*, 6: 103–116.
- 106 Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 25: 1859-1866, 2000.
- 107 Erdoğan B B (2003): Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi*, 4: 165-174.

108. Barisic K, Petrik J, Rumora L (2003): Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm.*, 53: 151-164.
- 109 Brouckaert G, Kalai M, Krysko D V, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu M, Haegeman G, D'herde K, Vandenabeele P (2004): Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Molecular Biology of the Cell*, 15: 1089-1100.
- 110 Huppertz B, Frank H G, Kaufmann P (1999): The apoptosis cascade; morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat. Embryol.*, 200: 1-18.
- 111 Willingham MC (1999): Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47 (9): 1101-1109.
- 112 Hornsby PJ. Aging of the human adrenal cortex. *Ageing Research Reviews* 2002; 1:229-242
- 113 Crowe M J, Bresnahan J C, Shuman S L, Masters J N, Beattie M S. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 3: 73-76, 1997.
- 114 Li M, Ona V O, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X, Stieg P E, Lipton S A, Friedlander R M. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 99: 333-342, 2000.
- 115 Lou J, Lenke L G, Ludwig F J, O'Brien M F. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 36 : 683-690, 1998.
- 116 Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 25: 1859-1866, 2000.
- 117 Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, Yoshimoto M, Yoshida J. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 43: 20-29, 2003.
- 118 Hu Y M, Benedict M A, Ding L Y. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18: 3586- 3595, 1999.

- 119 Liu X Z, Xu X M, Hu R, Du C, Zhang S X, McDonald J W, Dong H X, Wu Y J, Fan G S, Jacquin M F, Hsu C Y, Choi D W. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 17: 5395-5406, 1997.
- 120 Krajewski S, Krajewska M, Ellerby L M, Welsh K, Xie Z, Deveraux Q L, Salvesen G S, Bredesen D E, Rosenthal R E, Fiskum G, Reed J C: Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci, USA* 96: 5752-5757, 1999.
- 121 Keane R W, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea J R, Krajewski S, Reed J C, Dietrich W D. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 422-429, 2001.
- 122 Banasiak K J and Haddad G G. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res* 797: 295-304, 1998.
- 123 Kromer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere J L and Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *Fedn Am. Soc. exp. Biol. J.* 9: 1277-1287, 1995.
- 124 Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, et al. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 150: 731-740, 2000.
- 125 Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol* 146: 3-15, 1995.
- 126 Levison D A, Hopwood D: Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *J Pathol* 119: 159-166, 1976.
- 127 Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 15: 35-43, 1993.
- 128 Cohen J J. Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130, 1993.
129. Kumar V. Abbas A, Fausto N. Cellular Adaptations, Cell Injury and Cell Death. In: Kumar V., Abbas A., Fausto N., eds. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. Elsevier Philadelphia, 2005:26-32.

130. Öztürk F. Apoptoz. _nönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002;9:142-148.
131. Roshal M, Zhu Y, Planelles V (2001): Apoptosis in AIDS. *Apoptosis*, 6: 103–116.
132. Staley K, Blaschke A J, Chun J (1997): Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death and Differentiation*, 4: 66 -75.
133. Willingham M.C. Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 1999;47:1101-1109.
134. Dubska L., Matalova E., Mísek I. Detection of Apoptosis in Parafin Embedded Tissues: the Influence of Tissue Type and Fixation. *Acta Vet. BRNO* 2002;71:529-553.
135. Negoescu A., Guillermet C., Lorimier P. Brambilla E. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to Tunel specificity. *Biomed Pharmacother*. 1998;52:252-258.
136. Hekim N. Apoptosis. Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu. 2003:115-140.
137. Katherine L, Jonathan M. Advances in Cytochemical Methods for Detection of Apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 2001;49:821-832
138. Sinha Hikima P, Wang C, Lue Y. Johnson L, Wang X-H, Swerdloff R S. Spontaneous Germ Cell Apoptosis In Humans: Evidence For Ethnic Differences In The Susceptibility Of Germ Cells To Programmed Cell Death. *J Clin Endoc And Metab*, 83:152, 1998.
139. Sharper M: Regulation Of Spermatogenesis. In *The Physiology Of Reproduction*. Edited By Knobil E, Neill J D. Raven Pres. New York, Pp:1364-1434, 1994.
140. Beumer T L, Roepers L H, Gademan S U, Lock M T W, Tycko K B, Kal H B, Rooij D G. Apoptosis Regulation In The Testis: Involvement Of Bcl-2 Family Members. *Mol Repr Development*. 56:353-359, 2000.

- 141 Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis And Relevance To Urologist. *Br J Urol*.86:598-606,2000.
- 142 Kerr J B. Spontaneous Degeneration Of Germ Cells In Normal Rat Testis: Assessment Of Cell Types And Frequency During The Spermatogenetic Cycle. *J Reprod Fertil*. 95:825-830,1992
- 143 Hsueh A J W, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal Cell Apoptosis. *Recent Progress In Hormone Research*. 51:432-457,1996.
- 144 Ayaşoğlu E. Apoptoz. *T Klin Tıp Bilimleri Dergisi*.21:57-62,2001
- 145 Hikim S, Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff R S. Involvement Of Apoptosis In The Induction Of Germ Cell Degeneration Releasing Hormone Antagonist Treatment. *J Androl*.57:136-141, 2000.
- 146 Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassall P. An Early And Massive Wave Of Germinal Cell Apoptosis Is Required For The Development Of Functional Spermatogenesis. *Embo J*,24: 2262-2270,1997.
- 147 Wylie A H. Apoptosis: An Overview. *Br Med Bull*, 53: 451-465,1997.
- 148 Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Cell Death In The Normal And Cryptorchid Human Testis: The Effect Of Human Chorionic Gonadotropin On Testicular Cell Survival Pediatric Research. 40: 351-356,1996.
- 149 Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role Of Radical Oxygen Species In Rat Testicular Germ Cell Apoptosis Induced By Heat Stress. *Biol Repr*.61:393-399,1999.
- 150 Tapanainen J S, Tilly J L, Vihko K K, Hsueh A J W. Hormonal Control Of Apoptotic Cell Death In The Testis: Gonadotropins And Androgens As Testicular Cell Apoptosis In Adult Mice. *J Androl*. 18:159-165, 1997
- 151 Yin Y, Hawkins K L, Devvolf W C, Morgentaler A, Heat Stress Causes Testicular Germ Cell Apoptosis Adult Mice. *J Androl*. 18: 159-165,1997.
- 152 Lin W W, Lamb D J, Lipshultz L I, Kim E D. Demonstration Of Testicular Apoptosis In Human Male Infertility States Using A Dna Laddering Technique. *Int Urol Nephrol*.31(3):361-370, 1999

- 153 Blanco-Rodriguez J ,Garcia Martinez V. Apoptosis Partern Elicited By Several Apoptogenic Agents On The Seminiferous Epithelium Of The Adult Rat Testis.Jandrol. 19:487-497,1998.
- 154 Cohen J J. Overview : Mechanisms Of Apoptosis. Immunol Today . 14:126-130,1993
- 155 Çam H K. Varikosel Patogenezinde Serbest Oksijen Radikalleri Ve Apoptozisin Rolünün Rat Modelinde araştırılması ve E Vitaminin Koruyucu Etkileri. Uzmanlık Tezi.Marmara Ü. Tıp Fak.Üroloji,1998
- 156 Korsmeyer S J.Regulators Of Cell Death.Reviews. 11:101-105,1995
- 157 Kerr J F R, Wylie A H, Currie A R. Apoptosis. A Basic Biological Phenemenon With Wide Ranging Implications In Tissue Kinetics. Br J Cancer 26:239-245,1972.
- 158 Lepow Ih,Crozier R:Vasectomy: Immunologic And Pathophssilologic Effects İn Animal And Man: New York, Academicpress,1979
- 159 C.M. Mcvicar, D.A. O’neill, N. McClure, B. Clements, S. McCullough And S.E.M. Lewis: Effects Of Vasectomy On Spermatogenesis And Fertility Outcome After Testicular Sperm Extraction Combined With Icsi: Human Reproduction 2005 20(10):2795-2800
- 160 Cakan M, Yilmazer D, Cakan T, Aydos Tr, Oğus E, Kilinc As, Hüçmenoglu S, Altug U:Effect Of Naloxone On Oxidative Stress And Testicular Injury Due To Spermatic Vessel Ligatin Of Rat Testis . Urol Int 2008;81:279-284
- 161 Shio Kumar Singh, Sumana Chakravarty. Histologic Changes In The Mouse Testis After Bilateral Vasectomy Asian J Androl 2000 Jun; 2: 115-120
- 162 Y. Inaba, M. Fujisawa, H. Okada S. Arakawa, S. Kaminodo. The Apopitotic Changes Of The Testicular Germ Cells In The Obstructive Azospermia Models Of Prepubertal And Adult Rats. The Journal Of Urology, Volume 160, Issue 2, Pages 540-544
- 163 C.M.McVicar, D.A.O’Neill, N.McClure, B.Clements, S.McCullough and S.E.M.Lewis. Human Reproduction Vol.20, No.10 pp. 2795–2800, 2005
164. Çavdar C, Sifil A, Çamsar› T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association 1997; 3-4: 92-95

- 165 Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA Hasar› ve Yafllanma. Cerrahpafla T›p Dergisi Cilt (Say›) 35 (4).
- 166 Chen H, Liu J, Luo L et al. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol* 2005;40:728-736.
167. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7162–7166.
- 168 Lin KT, Xue JY, Nomen M, Spur B, Wong PY. Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 1995; 270:16487–16490.
- 169 Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 199:316-331.
- 170 Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl* 1992; 13:450-455.
- 171 Bray TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1990; 8:281-291.
- 172 Johnson FC. The antioxidant vitamins CRC. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1979; 11:217-309.
- 173 Kumagai A, Kodama H, Kumagai J et al. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod.* 2002; 8:118-123.
- 174 Ozyurt B, Parlaktas BS, Ozyurt H et al. A preliminary study of the levels of testis oxidative stress parameters after MK-801-induced experimental psychosis model: Protective effects of CAPE. *Toxicology* 2007; 230:83-89.
- 175 Ahotupa M, Huhtaniemi I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biol Reprod* 1992; 46:1114-1118.
- 176 Viebahn-Haensler R. Genel Bilgi; Ozonun T›pta Kullanımı Medikal Ozon Oksijen Dernegi 2005: 145-163.
- 177 Viebahn-Haensler R. Uygulama Biçimleri ve Kullanım Alanları; Ozonun T›pta Kullanımı Medikal Ozon Oksijen Dernegi 2005: 53-66.

- 178 Vogelsberger W, Herget H: Klinische ozonanwendung. OzoNachrichten 1983;2:1. Rilling S: The basic clinical applications of ozone therapy. Ozonachrichten 1985; 4:7-17.
- 179 Riva-Sanseverino E: The influence of ozone therapy on the remineralization of the bone tissue in osteoporosis. OzoNachrichten 1987;6:75-79.
- 180 Viebahn-Haensler R. Tıbbi Ozonun Etkime Mekanizmaları; Ozonun Tıpta Kullanımı. Medikal Ozon Oksijen Dernegi 2005: 102-135.
- 181 G. Sadıkoğlu, A. Özçakır, Y. Uncu, C. Yıldız, Periferik Arter Hastalıklarında Risk Faktörleri ve Klinik Bulgular. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002,28 (3): 77-80.
- 182 S. Erdine Vasküler Ağrılar; Ağrı Sendromları ve Tedavisi Sanovel İlaç San. Ve Tic A.S. 2. baskı(2003);235-239.
- 183 A. Babacan, Ozon, Ozonterapi ve Klinik Kullanımı, Türkiye Klinikleri J Med Sci 2008;28(Suppl):S245-S247.
- 184 Jacqueline IK. Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology. 3rd ed. John Wiley & Sons, 1981.
- 185 Bocci V. Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. Mediators Inflamm. 2004; 13(1): 3-11.
- 186 Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. state of the art. Archives of Medical Research. 2006; 37: 425-435.
- 187 Wolff HH. Die Behandlung peripherer Durchblutungsstörungen mit Ozon. Erfahr-Heilkd. 1974; 23: 181-184.
- 188 Bocci V. Scientific and medical aspects of ozone therapy. state of the art. Archives of Medical Research. 2006; 37: 425-435.
- 189 Pryor WA, Squadrito GL, Friedman M. The cascade mechanism to explain ozone toxicity: the role of lipid ozonation products. Free Radic Biol Med. 1995; 19(6): 935-41.
- 190 Di Paolo N, Gaggiotti E, Galli F. Extracorporeal blood oxygenation and ozonation: clinical and biological implications of ozone therapy. Redox Rep. 2005; 10(3): 121-30.

- 191 Mustafa MG. Biochemical basis of ozone toxicity. *Free Radical Biol Med.* 1990; 9: 245-265.
- 192 Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal.* 2008; 10(8): 1343-74.
- 193 Bocci V, Aldinucci C. Biochemical modifications induced in human blood by oxygenation-ozonation. *J Biochem Mol Toxicol.* 2006; 20(3): 133-8.
- 194 Bocci V. Is it true that ozone is always toxic? The end of a dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2006; 216: 493-504.
195. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000; 486: 10-13.
- 196 Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Fanetti G. Studies on the biological effects of ozone: 8. Effects on the total antioxidant status and on interleukin-8 production. *Mediat Inflamm.* 1998; 7: 313-317.
- 197 Travagli V, Zanardi I, Silvietti A, Bocci V. A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. *Int J Biol Macromol.* 2007; 41(5): 504-11.
- 198 Di Paolo N, Bocci V, Gaggiotti E. Ozone therapy. *Int J Artif Organs.* 2004; 27(3): 168-75.
- 199 Bocci V, Aldinucci C, Bianchi L. The use of hydrogen peroxide as a medical drug. *Riv Ital Ossigeno Ozonoterapia.* 2005; 4: 30-39.
- 200 Bocci V, Aldinucci C, Mosci F, Carraro F, Valacchi G. Ozonation of human blood induces a remarkable upregulation of heme oxygenase-1 and heat stress protein-70. *Mediators Inflamm.* 2007; 2007: 1-6.
- 201 LE Otterbein, MP Soares, K Yamashita, FH Bach. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *trends in Immunology.* 2003; 24(8): 449-55.
- 202 Bocci V. *Ozone a new medical drug.* Dordrecht. The Netherlands. Springer, 2005, p. 75-85.
- 203 Kim H C, Byun J S, Lee T K, Jeong C W, Ahn M, Shin T. Expression Of Nitric Oxide Synthase Isoforms In The Testis Of Pigs. *Anat. Histol. Embryol.* 2007;36(2):135-8

- 204 Middendorff R, Muller D, Wichers S, Holstein A F. Evidence For Production And Functional Activity Of Nitric Oxide In Seminifer Tubules And The Blood Vessels Of The Human Testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:4154-61
- 205 Zini A, O'bryan Mk, Magidms, Schlegel Pn. Immunohistochemical Localization Of Endothelial Nitric Oxide Synthase In Human Testis ,Epydidymis, And Vas Deferens Suggest A Possible Role For Nitric Oxidein Spermatogenezsis,Sperm Maturation ,And The Programmed Cell Death, *Biol Reprod* 1996;55:935-41
- 206 M.Fujisawa,K Yamanaka, H. Tanaka, H Okada , S Arakawa And S. Kaminodo Expression Of Endothelial Nitric Oxide Synthase In The Sertoli Cells Of Men With Infertility Of Various Cases *Bju International* (2001),87,85-88.
- 207 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 2007 May;99(5):1086-90. Epub 2007 Mar 6
- 208 Celik-Ozenci C, Bayram Z, Akkoyunlu G, Korgun Et, Erdogru T, Seval Y, Ustunel I, Baykara M, Demir R. Localization Of Ngf And Nnos In Varicocele-Induced Rat Testis. *Acta Histochem.* 2006;107(6):435-42. Epub 2005 Dec 2
- 209 Ishikawa T, Kondo Y, Goda K, Fujisawa M. Overexpression Of Endothelial Nitric Oxide Synthase In Transgenic Mice Accelerates Testicular Germ Cell Apoptosis Induced By Experimental Cryptorchidism. *Placenta.* 2007 Feb-Mar;28(2-3):133-8. Epub 2006 May 23
- 210 Taneli F, Vatansever S, Ulman C, Giray G, Genc A, Taneli C. Pre-Ischemic Administration Of Nitric Oxide Synthase Inhibitors Reduced Germ Cell Apoptosis After Spermatic Vessel Ligation In The Rat Testis.*Urol Int.* 2005;75(1):70-4.
- 211 Grewal RS, Sachan MS. Changes in testicle after vasectomy. An experimental study. *Int Surg* 1968;49:460-2.
- 212 Vare AM, Bansal PC. Changes in the canine testis after bilateral vasectomy-an experimental study. *FertilSteril* 1973;24:793-7.
- 213 Tung KSK. Pathogenesis of testicular pathology in vasectomized guinea pigs. In: Lepow IH, Crozier R, eds. *Vasectomy: immunologic and pathophysiologic effects in animals and man.* New York: Academic Press, 1979:407-21.

- 214 Bigazzi PE. Immunopathological findings in vasectomized rabbits. In: Lepow IH, Crozier R, eds. Vasectomy: immunologic and pathophysiologic effects in animals and man. New York: Academic Press, 1979:339-53.
- 215 Alexander NJ, Tung KSK. Vasectomy in the rabbit: immunological and morphological effects. In: Lepow IH, Crozier R, eds. Vasectomy: immunologic and pathophysiologic effects in animals and man. New York: Academic Press, 1979:355-77.
- 216 Bedford JM. Adaptations of the male reproductive tract and the fate of spermatozoa following vasectomy in the rabbit, rhesus monkey, hamster and rat. Biol Reprod 1976;14:118-42.
- 217 McDonald SW, Falconer JS, Al-Saffar RA, Scothorne RJ. Sperm granuloma formation in the caput epididymidis is associated with testicular degeneration in rats. Clinical Anatomy 1990;3:65.
- 218 McDonald SW, Spilg EG, Alexander JA, Scothorne RJ. Testicular atrophy following
- 219 Roman, J. Miller, Gary, J. Killian, Peter Vasilenko Effects of Long and Short term vasectomy on Structural and Functional. Parameters of the Rat.. Journal of andrology
- 220 Amiya P. Sinha Hikim and Ronald S. Swerdloff Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis reviews of reproduction(1999)4,38-47
- 221 Smith M, Dohle GR, Wildhagen MF, Weber RF. Can inhibin-B predict the outcome of microsurgical epididymal sperm aspiration in patients with suspected primary obstructive azoospermia. Asian J Androl. 2007 9(3):382-7,2006.
- 222 Kubota Y, Sasaki S, Kubota H, Tatsura H, Kohri K. Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi. A study on the mechanism of the spermatogenic damage after vasectomy in rats 2001 Jan;92(1):13-22.
- 223 Kolasa A, Marchlewicz M, Kurzawa R, Głabowski W, Trybek G, Wenda-Rózewicka L, Wiszniewska B. The expression of inducible nitric oxide synthase (i-NOS) in the testis and epididymis of rats with a dihydrotestosterone (DHT) deficiency. Cell Mol Biol Lett. 2009;14(3):511-27. Epub 2009 Apr 29.
- 224 Guo J, Jia Y, Tao SX, Li YC, Zhang XS, Hu ZY, Chiang N, Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Wang C, Liu YX. Expression of nitric oxide synthase during

- germ cell apoptosis in testis of cynomolgus monkey after testosterone and heat treatment. *Endocrinology*, 2003 - Endocrine Soc
- 225 Basaran UN, Dokmeci D, Yalcin O, Inan M, Kanter M, Aydogdu N, Turan N. Effect of curcumin on ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular torsion in a rat model. *Urol Int*. 2008;80(2):201-7. Epub 2008 Mar 19.
- 226 Jang AS, Choi IS, Lee JU, Park SW, Lee JH, Park CS. Changes in the expression of NO synthase isoforms after ozone: the effects of allergen exposure. *Respir Res*. 2004 Jun 5;5:5.
- 227 Chen H, Xing B, Liu X, Zhan B, Zhou J, Zhu H, Chen Z. Similarities between ozone oxidative preconditioning and ischemic preconditioning in renal ischemia/reperfusion injury. *Arch Med Res*. 2008 Feb;39(2):169-78. Epub 2007 Nov 28.
- 228 1 Weber RF, Dohle GR. Male contraception: mechanical, hormonal and non-hormonal methods. *World J Urol* 2003;21:338-340.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=14569410&dopt=Abstract
229. Jarow, J. P., Budin, R. E., Dym, M., Zirkin, B. R., Noren, S. And Marshall, F. F.: Quantitative pathologic changes in the human testis after vasectomy. A controlled study. *New Engl. J. Med.*, 313: 1252, 1985.
- 230 McVicar CM, O'Neill DA, McClure N, Clements B, McCullough S, Lewis SE. *Hum Reprod*. 2005 Oct;20(10):2795-2800
- 231 Y. Lue, A. P. Hikim, C. Wang, J. J. Bonavera, S. Baravarian, A. Leung and R. S. Swerdloff Early effects of vasectomy on testicular structure and on germ cell and macrophage apoptosis in the hamster *Journal of Andrology*, Vol 18, Issue 2 166-173,
- 232 Davies MG, Fulton GJ, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg* 1995; 82:1598-1610.
- 233 Kuyumcu A, Duzgun AP, Ozmen MM, Besler HT. Travma ve enfeksiyonda nitrik oksidin rolü. *Ulusal Travma Dergisi* 2004;10:149-159.
- 234 Ramirez DC, Gimenez MS. Induction of redox changes, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by chronic cadmium exposure in mouse peritoneal macrophages. *Toxicol Lett* 2003;145:121-132.

235 Martynowicz H, Skoczynska A, Wojakowska A, Turczyn B. Serum vasoactive agents in rats poisoned with cadmium. Int J Occup Med Environ Health. 2004;17:479-485.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Afyonkarahisar'da doğdum. İlk eğitim ve öğrenimimi Uşak Mehmetçik İlkokulunda, orta öğrenimimi Uşak Anadolu Lisesinde, lise öğrenimimi Akşehir Anadolu Lisesinde tamamladım. 2004 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. 2004 yılından bu yana Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim dalında uzmanlık eğitimi görmekteyim.