

## **The Effect of Varicocele Repair on Experimental Varicocele-Induced Testicular Germ Cell Apoptosis**

**J Androl 2008;29:29-34; DOI: 10.2164/jandrol.107.002717**

ADEM FAZLIOGLU (1), INANC YILMAZ (1), ÖZGÜR METE (2), FATİH KURTULUS (1), OGUZHAN PARLAKKILIC (1), ÖZGÜR GÜCTAS (1), AND METE CEK (1)

(1) Urology Department, Taksim Teaching Hospital, and the (2) Department of Pathology, Istanbul Medical School, Istanbul, Turkey.

Correspondence to: Mete Cek, Chief, Taksim Teaching Hospital Department of Urology (e-mail: [cekmd@doruk.net.tr](mailto:cekmd@doruk.net.tr)).

The purpose of this study was to evaluate the variance of apoptosis in rats in which experimental varicocele was induced and then treated by varicocelectomy. Forty adult male Wistar albino rats were used in this experimental study. Experimental varicocele was created in 30 rats. A total of 5 rats underwent a sham operation, and the remaining 5 rats were the control group. A total of 5 rats from the varicocele group were sacrificed on the 14th postoperative day, and 5 more were sacrificed on the 28th postoperative day to document the level of apoptosis due to varicocele. Varicocelectomy was performed on 20 rats with varicocele on the 14th postoperative day. These 20 rats were divided into 4 groups to evaluate the level of apoptosis in their testis after varicocelectomy. They were sacrificed on days 7, 14, 21, and 28 after varicocelectomy. The testes were fixated by perfusion with 10% formaldehyde and then placed in paraffin blocks. From each testis, 2 samples were stained with hematoxylin and eosin, and 2 samples were stained using the TUNEL method. In each specimen, apoptotic germ cells stained by TUNEL were counted in the cross section of 100 seminiferous tubules. The apoptotic index was defined by calculating the number of apoptotic cells per seminiferous tubule. Apoptotic index = total apoptotic germ cell count/100. In the adult rats on which experimental varicocele was performed, both in the second and fourth week, apoptosis in both left and right testes were significantly higher compared with the control group (with varicocele day 14: 0.25–0.26, with varicocele day 28: 0.28–0.32, control: 0.11–0.13). After varicocelectomy on the 7th and 14th days, the slight increase in the level of apoptosis continued (day 7 left testis: 0.30, day 7 right testis: 0.28; day 14 left testis: 0.25, day 14 right testis: 0.31). After varicocelectomy, apoptosis decreased significantly on day 21 (left testis: 0.16, right testis: 0.22), and on day 28 it was almost equal to the level of the control group (left testis: 0.14, right testis: 0.16). After the creation of unilateral varicocele, the level of apoptosis increased in both the left and right testes. Apoptosis in both testes decreased after surgical treatment.

### **L'effetto della riparazione del varicocele sull'apoptosi delle cellule germinali da varicocele indotto sperimentalmente**

Lo scopo di questo studio fu di valutare la variazione dell'apoptosi nei ratti a cui fu prodotto il varicocele sperimentale e sottoposti poi a varicocelectomia. In questo studio furono impiegati quaranta maschi adulti di ratti albini Wistar. Il varicocele sperimentale fu generato in 30 ratti. A un gruppo di 5 ratti fu eseguito un finto intervento e i rimanenti 5 ratti furono impiegati come gruppo di controllo. Un gruppo di 5 ratti del gruppo varicocele furono sacrificati il 14<sup>o</sup> giorno dopo l'intervento, altri 5 il 28<sup>o</sup> giorno dopo l'intervento per documentare il livello di apoptosi dovuto al varicocele. La varicocelectomia fu eseguita sui 20 ratti con varicocele al 14<sup>o</sup> giorno dopo l'intervento. Questi 20 ratti furono divisi in 4 gruppi per valutare il livello di apoptosi nei loro testicoli dopo la varicocelectomia. Furono sacrificati 7, 14, 21, 28 giorni dopo la varicocelectomia. I testicoli furono fissati con per fusione di formaldeide al 10% e posti in blocchi di paraffina. Per ogni testicolo, 2 campioni furono colorati con ematossilina-eosina e 2 campioni usando il metodo TUNEL. In ogni campione, furono contate le cellule germinali apoptotiche colorate con il metodo TUNEL su una sezione trasversale comprendente 100 tubuli seminiferi. L'indice apoptotico fu definito calcolando il numero di cellule apoptotiche per ogni tubulo seminifero. Indice apoptotico = totale delle cellule germinali apoptotiche/100. Nei ratti adulti in cui fu generato il varicocele sperimentale, sia alla seconda che alla quarta settimana, l'apoptosi sia nel testicolo destro che sinistro fu significativamente maggiore rispetto al gruppo di controllo (al 14<sup>o</sup> giorno con il varicocele: 0.25-0.26, al 28<sup>o</sup> giorno : 0.28-0.32, nei controlli: 0.11-0.13). Dopo la varicocelectomia al 7<sup>o</sup> e al 14<sup>o</sup> giorno si osservò la prosecuzione di un moderato livello di apoptosi (testicolo sinistro al 7<sup>o</sup> giorno: 0.30, testicolo destro al 7<sup>o</sup> giorno: 0.28; testicolo sinistro al 14<sup>o</sup> giorno: 0.25, testicolo destro al 14<sup>o</sup> giorno: 0.31). Dopo la varicocelectomia al 21<sup>o</sup> giorno l'apoptosi diminuì significativamente (testicolo sinistro: 0.16, testicolo destro 0.22), e al 28<sup>o</sup> giorno ritornò quasi equivalente al livello del gruppo di controllo (testicolo sinistro: 0.14, testicolo destro: 0.16). Dopo la generazione di un varicocele unilaterale, il livello di apoptosi aumenta in entrambi i testicoli destro e sinistro. In entrambi i testicoli l'apoptosi diminuisce dopo il trattamento chirurgico.

**Il commento** – Questo è un lavoro sperimentale che riportiamo, per quanto svolto sui ratti, perché mette in evidenza un fatto fondamentale della patologia testicolare da varicocele. E' qui utile dare alcune spiegazioni dei termini presenti: l'apoptosi è la morte cellulare autoindotta dalla cellula che è sofferente per questioni relative all'ambiente in cui vive, la colorazione TUNEL è una tecnica che evidenzia la frammentazione (ossia il danno) del DNA che porta all'apoptosi, la colorazione con ematossilina-eosina consente di osservare le strutture contenenti le cellule. Lo studio mette in evidenza lo stato di sofferenza bilaterale, troppo spesso ancora oggi sottovalutato o per nulla preso in considerazione da molti medici generali e peggio da molti andrologi, che entrambi i testicoli sopportano in presenza della stasi vascolare prodotta dal varicocele anche solo monolaterale e indipendentemente, come altri studi anche sull'uomo hanno più volte evidenziato, dal grado di dilatazione delle vene varicose. La stasi che le vene varicose peritesticolari producono, induce effetti di stress ossidativo (aumento delle molecole ossidanti) e di ipossia (ridotto apporto di ossigeno) che sono responsabili dei danni al DNA degli spermatozoi. La stasi permane anche qualora si diminuisca il carico del reflusso ematico con le tecniche di legatura alta o scleroembolizzazione, quindi queste non sono mai la reale soluzione allo stato di sofferenza testicolare. Il risultato è il permanere dell'apoptosi (la morte cellulare) delle cellule germinali (le cellule che producono gli spermatozoi) a livelli consistenti sino a quando tale stasi non venga realmente rimossa con la varicectomia radicale, come questo studio dimostra. Altro aspetto importante che emerge è che il recupero funzionale di produzione degli spermatozoi richiede tempi relativamente lunghi che nella nostra esperienza non è mai meno di 12-18 mesi. Il tempo qui osservato di 4 settimane per avere parametri analoghi ai soggetti sani è relativo al tempo di vita medio di un ratto che è di circa 2-3 anni nelle migliori condizioni nutrizionali, ambientali e stressogene; quindi ne consegue che è sostanzialmente pari a quanto da noi osservato come esito dei trattamenti effettuati. Ovvio che il recupero è poi strettamente dipendente dagli altri fattori concausali al varicocele e che possono, ove non risolti contestualmente, aumentare anche di molto i tempi. Questo studio deve sollecitare gli uomini di qualunque età e i medici a non trascurare mai il quadro di varicocele e le patologie connesse, a provvedere al radicale e risolutivo trattamento terapeutico così da evitare l'instaurarsi di quadri di infertilità anche grave difficili poi da risolvere e da attivare la fattiva prevenzione per lo stato di buona salute genitale.