

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNFLİKSİMABİN SIÇANLARDA TESTİKÜLER TORSİYON
DETORSİYON HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ecz. Semiral ALBAYRAK SEMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

1. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ

2. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Zehra YILMAZ

ZONGULDAK

2019

T.C.
ZONGULDAK BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

**İNFLİKSİMABİN SIÇANLARDA TESTİKÜLER TORSİYON
DETORSİYON HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ecz. Semiral ALBAYRAK SEMALAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

1. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ

2. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Zehra YILMAZ

ZONGULDAK

2019

KABUL VE ONAY:

“İNFLİKSİMABIN SIÇANLARDA TESTİKÜLER TORSİYON DETORSİYON HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

26/06/2019

Başkan: Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ

Üye: Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHI

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Namık BİLİCİ

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

TARİH ~~2019~~ 2019

Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu tezi hazırlamamda, çalışma sürecinde ve yapım aşamasında yapıcı ve bilimsel eleştirilerini esirgemeyen, her fırsatta bilgi ve deneyimleri ile bana güç ve güven veren, saygıdeğer hocalarım ve tez danışmanlarım sayın Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ'e ve sayın Prof. Dr. Zehra YILMAZ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle beni aydınlatan saygıdeğer hocalarım, sayın Prof. Dr. Zekiye Nur BANOĞLU'na ve sayın Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmasının biyokimyasal parametrelerinin ölçümünde ve analizinde yardımcı olan sayın Prof. Dr. Murat CAN'a ve sayın Doç.Dr. Berrak GÜVEN'e ve histopatolojik değerlendirme için sayın Doç. Dr. Meryem AKPOLAT FERAH'a ve sayın Doç. Dr. Kanat GÜLLE'ye teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca yüksek lisans eğitimim süresinde ve tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan Dr.Ecz. Ezgi AKDENİZ'e ve Ecz. Ebru KOCAKAYA'ya teşekkür ederim.

Semiral ALBAYRAK SEMALAR

Mayıs 2019/Zonguldak

ÖZET

Semiral Albayrak Semalar, İnflksimabin Sıçanlarda Testiküler Torsiyon Detorsiyon Hasarı Üzerine Etkileri. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2019.

Tümör nekrozis faktör-alfa hücre ölümünden doku rejenerasyonuna kadar değişen çok yönlü etkilere sahip olan proinflamatuvar bir sitokindir. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda tek taraflı uygulanan testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) hasarında bir anti-TNF- α fare/insan kimerik IgG monoklonal antikoru olan inflksimabın (İNF), apoptotik yollar ve sperm miktarına etkilerini araştırmaktır. Wistar albino erkek sıçanlar tiyopental sodyum ile anestezi edildi ve sham, T/D ve İNF+T/D olarak 3 gruba ayrıldı (n=7). Torsiyon, anestezi sonrası sağ testisin spermatik kordunun saat yönünde 720⁰ döndürülüp batına sabitlenmesiyle gerçekleştirildi. Sıçanlara detorsiyondan 10 dak önce İNF (ip. 5 mg/kg) ve çözücüsü uygulandı. Torsiyon (3 saat) sonrası spermatik korda detorsiyon uygulandı. Detorsiyonun 24. saatinde ve 65. gününde çıkarılan testis ve kauda epididimlerin ağırlıkları tartıldı. Detorsiyonun 24. saatinde, histopatolojik hasar Johnsen skorlaması ile kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri immünohistokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirildi. Detorsiyondan 65 gün sonra kauda epididimlerde sperm sayımı yapıldı. T/D grubunun testis ve kauda epididimlerin ağırlıkları, sperm sayısı ve Johnsen skoru sham grubuna göre anlamlı düşük bulunurken; spermatogenik seriye ait hücrelerden özellikle spermatosit ve spermatitlerde, apoptozis belirteçleri olan kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'a ait belirgin immün boyanma gözlemlendi. İNF tedavisinin, T/D'ye bağlı testis ve kauda epididim ağırlıklarında, sperm sayısında ve Johnsen skorundaki azalmayı önlemediği ve spermatogenik hücrelerdeki kaspazlara ait immün boyanmanın şiddetini azaltmadığı gözlemlendi. Sonuç olarak, İNF ile oluşturulan TNF- α blokasyonu sıçan testiküler T/D'ye bağlı hasarda koruyucu etki göstermemiştir.

Anahtar Kelimeler: İnflksimab, Kaspaz, Sperm, Testis, Torsiyon/detorsiyon

ABSTRACT

Semiral Albayrak Semalar, Effects of Infliximabine on Detection of Testicular Torsion in Rats. Zonguldak Bülent Ecevit University, Institute of Health Sciences, Department of Medical Pharmacology, Master of Science Thesis, Zonguldak, 2019.

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a proinflammatory cytokine with multiple effects ranging from cell death to tissue regeneration. The aim of this study was to investigate the effects of an anti-TNF- α , mouse / human chimeric IgG monoclonal antibody, infliximab (INF) on apoptotic pathways and sperm amount in unilateral testicular torsion / detorsion (T / D) injury in rats. Wistar albino male rats were anesthetized with thiopental sodium and divided into 3 groups as sham, T / D and INF + T / D (n = 7). Torsion was created by rotating the right testis 720° clockwise and maintained by fixing the testis. Rats were treated with INF (ip, 5 mg / kg) and solvent 10 min before detorsion. After torsion (3 hours), spermatic cord detorsion was performed. Weights of testis and cauda epididymis were measured at 24th and 65th day of detorsion. At 24 hours of detorsion, histopathological injury was evaluated by Johnsen scoring and caspase-3, caspase-8 and caspase-9 activities by immunohistochemical staining. 65 days after detorsion, sperm count was performed in cauda epididymis. The weight of T / D group, testis and cauda epididymis, sperm count and Johnsen score were significantly lower than sham group. spermatocytes and spermatitis, especially those of the spermatogenic series, showed significant immunostaining of caspase-3, caspase-8 and caspase-9, which are the markers of apoptosis. INF therapy did not prevent the decrease in sperm count and Johnsen score of T / D and testis and cauda epididymis, and did not decrease the severity of immunostaining of caspases in spermatogenic cells. As a result TNF- α blockade created with INF did not show a protective effect on rat testicular T/D injury.

Key words: Infliximab, Caspase, Sperm, Testis, Torsion / detorsion

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL ve ONAY:	ii
ÖNSÖZ	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİL DİZİNİ	x
TABLO DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Torsiyonu.....	3
2.1.1. Testis iskemi reperfüzyon hasarı	3
2.2. Apoptoz	4
2.2.1. İ/R hasarı ve apoptoz	8
2.2.2. Testis İ/R hasarı ve apoptoz.....	8
2.3. Tümör Nekrozis Faktör	11
2.3.1. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) inhibitörleri	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Hayvanlar	19
3.2. Kimyasallar	19
3.3. Gruplar	19
3.4. Testiküler Torsiyon Detorsiyon (T/D) İşlemi.....	20
3.5. Sperm sayımı.....	21
3.6. Histopatolojik Değerlendirme.....	22
3.7. İmmünohistokimyasal Boyama ile Değerlendirme	23
3.8. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	24
4. BULGULAR.....	25
4.1. Testis ve Kauda Epididim Ağırlıkları.....	25
4.2. Epididimal sperm miktarı	26
4.3. Histopatolojik değerlendirme	27
4.4. Apoptotik Değerlendirme	30

5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇLAR	40
7. KAYNAKLAR	41
8. EKLER.....	53
Ek 1: Etik Kurul Onayı	53
9. ÖZGEÇMİŞ	54



SİMGELER VE KISALTMALAR

AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
APAF-1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
ATP	Adenozin trifosfat
Bax	B hücreli Lenfoma-2 ilişkili X proteini
Bcl-2	B hücreli Lenfoma-2
CYP 450	Sitokrom P450
Cyto-c	Sitokrom c
DNA	Deoksiribonükleik asit
DED	Efektör Ölüm Bölgesi
Fab	Antijen Bağlayıcı Fragman
FADD	Fas İlişkili Ölüm Bölgesi
FasL	Fas Ligandı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
IL-1	İnterlökin-1
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
İ/R	İskemi/reperfüzyon
İP	İntraperitoneal
İV	İntravenöz
ICAM-1	Hücreler Arası Adezyon Molekülü-1
IgG	İmmunglobulin G
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
LT-α	Lenfotoksin- α
MAPK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz
MPO	Miyeloperoksidaz
mTNF-α	Transmembran TNF- α
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NIK	Nükleer Faktör Kappa B indükleyen kinaz
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PEG	Polietilen glikol
RIP	Reseptörle Etkileşen Protein

RNS	Reaktif Nitrojen Türleri
SOR	Serbest Oksijen Radikali
sTNF-α	Çözünebilir TNF- α
SC	Subkutan
TACE	Tümör Nekroz Faktör Dönüştürücü Enzim
T/D	Torsiyon/detorsiyon
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNF-β	Tümör Nekroz Faktör Beta
TNFR	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
TNFR-1	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
TNFR-2	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-2
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. Apoptoz yolakları.....	6
2. TNF- α sinyal yolakları.....	13
3. Deney grupları.....	20
4. Makler kamerada sperm sayımı yapılırken spermlerin uzaktan (A) ve yakından (B) görüntüsü.....	21
5. Detorsiyonun 24. saati; Sham, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral (A-B-C) ve kontralateral (D-E-F) testis dokularının histolojisi.....	29
6. Detorsiyonun 24. saati; Sham, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral (A-B-C) ve kontralateral (D-E-F) testislerde immunohistokimyasal kaspaz-9 boyaması.....	32
7. Detorsiyonun 24. saati; Sham, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral (A,B,C) ve kontralateral (D-E-F) testislerde immunohistokimyasal kaspaz-8 boyaması.....	33
8. Detorsiyonun 24. saati; Sham, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral (A-B-C) ve kontralateral (D-E-F) testislerde immunohistokimyasal kaspaz-3 boyaması.....	34

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. TNF- α İnhibitörleri	15
2. TNF- α İnhibitörlerinin İ/R hasarı Üzerine Koruyucu Etkileri	18
3. Johnsen Skorlama Sistemine Göre Histopatolojik Kriterler	23
4. Detorsiyonun 24. Saatinde Çıkarılan İpsilateral ve Kontralateral Testis ve Kauda Epididimlerin Ağırlıkları.	25
5. Detorsiyonun 65. Gününde Çıkarılan İpsilateral ve Kontralateral Testis ve Kauda Epididimlerin Ağırlıkları.	26
6. Detorsiyonun 65. Gününde Alınan Kauda Epididimlerden Elde Edilen Sperm Analizi.....	27
7. Detorsiyonun 24. Saatinde Alınan Testislerdeki Histopatolojik Hasar Skorlaması.....	28
8. Detorsiyonun 24. Saatinde Çıkarılan İpsilateral ve Kontralateral Testis Dokularında İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Kaspaz-9, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3 Aktiviteleri.	30

1. GİRİŞ

Testiküler torsiyon 25 yaşından genç erkeklerde 1/4000 gözlenen acil bir durumdur. Testiküler torsiyon, spermatogenezisin sürdürülebilmesi açısından, akut olarak tedavi edilmesi gereken önemli bir hasardır. Hastayı infertiliteden korumak için torsiyona uğramış olan testisin detorsiyonu gereklidir (1). Testiküler torsiyon/detorsiyonda (T/D), spermatik kordun torsiyonu testiküler arterin oklüzyonuna, dolayısıyla testis dokusunun iskemiye uğramasına ve tedavi amaçlı uygulanan detorsiyon işlemi de dokunun yeniden kanlanmasına yani reperfüzyonuna neden olur (2). Torsiyona uğramış testisin tedavi amaçlı detorsiyona uğratılması işlemi de testiste ek bir hasar meydana getirmektedir (3). Ayrıca, son zamanlarda deneysel ve klinik çalışmalarda tek taraflı testis torsiyonunun, torsiyona uğramayan testiste de yapısal değişikliklere neden olduğu ve böylece infertilite riskini artırdığı gözlenmektedir (2, 4-6).

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) hücre ölümünden doku jenerasyonuna kadar değişen çok yönlü etkilere sahip olan proinflamatuvar bir sitokindir (7). Son zamanlarda testiküler iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarına proinflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α 'nın katkısının olduğu ve özellikle reperfüzyonun erken saatlerinde doku ve kandaki düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (8-9). TNF- α 'nın üretiminin inhibisyonu ya da antikorlarla TNF- α 'nın nötralizasyonunun, iskemik bölgeye nötrofil infiltrasyonunu ve İ/R hasarını azalttığı bildirilmektedir (10-11). Bu yüzden, TNF- α üretimini sınırlayan ya da etkisini bloke eden tedavi yolları çeşitli organların İ/R hasarını azaltmada ve/veya önlemede etkili olabilir.

İnfliksımab (İNF), bir anti-TNF- α fare/insan kimerik immunglobulin G (IgG) monoklonal antikorudur (12).TNF- α 'ya bağlanarak onun biyolojik aktivitesini nötralize eder ve TNF- α 'nın kendine ait reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder (13). Son zamanlarda yapılan deneysel çalışmalarda, İNF'nin böbrek, kalp, karaciğer, beyin, spinal kord ve ince barsak gibi çeşitli organlara uygulanan iskemi reperfüzyona bağlı hasarda, koruyucu etkisinin olabileceği gösterilmiştir (10, 14-18). Bununla birlikte testiküler İ/R hasarında İNF'nin etkileri araştırılmamıştır.

Bu çalışmada, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) hasarı üzerine İNF'nin testis dokusundaki histolojik etkileri ve sperm sayısı üzerine etkileri araştırılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda tek taraflı uygulanan testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) hasarında bir anti-TNF- α fare/insan kimerik IgG monoklonal antikoru olan infliksimabın (İNF), apoptotik yolaklar ve sperm miktarına etkilerini araştırmaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Torsiyonu

Spermatik kord torsiyonu olarak da bilinen testis torsiyonu, testis vasküler pedikülünün kendi etrafında dönmesi sonucu akut olarak ortaya çıkan ve acil cerrahi müdahale gerektiren bir durumdur (19).

Testis torsiyonunun en sık görüldüğü dönemler neonatal ve puberte dönemi olup ileri yaşlarda görülmesi enderdir. Prenatal ve neonatal dönemde ortaya çıkan torsiyon ekstravajinal; adolesan ve daha ileri dönemde karşılaşılan torsiyon ise intravajinal torsiyon olarak bilinmektedir. Yaş dışında anatomik özellikler de bu ayrımın neden olmaktadır. İntravajinal torsiyon çan tokmağı deformitesi denilen anatomik bir bozukluk taşırken ekstravajinal torsiyonun nedeni çok iyi bilinmemekte ve bu tipteki torsiyon herhangi bir anatomik bozukluk içermemektedir (20).

Torsiyon olayı testiste atrofiye ve infertiliteye yol açabilir. Bu nedenle torsiyon olayına erkenden ve doğru şekilde müdahale etmek büyük önem taşır (21). Müdahale ilk 6 saat içinde gerçekleşmezse, geri dönüşümü olmayan iskemi süreci başlar. Bu sürecin 10 saati aşması durumunda torsiyone olan testisin % 80'inin; 24 saati aşması halinde ise %100'ünün infarkte ve kurtarılamaz hale geldiği tespit edilmiştir (20). Testisin alabileceği hasarı belirleyen bir diğer etmen torsiyon derecesidir. Lievano ve ark. çalışmasına göre 720° dönen testiste kan akışı anlamlı derecede azalırken; 360° dönen testiste kan akışında anlamlı bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir (22). Unilateral testis torsiyonunun kontralateral testiste de hasar yapabileceğini rapor eden çalışmalar bulunmaktadır (23).

2.1.1. Testis iskemi reperfüzyon hasarı

İskemik durumdaki bir doku oksijenden yoksun kalır. İskeminin uzaması membran potansiyelinde, iyon dağılımında ve hücre içi volümde değişikliklere neden olmakta ve endotel hücrelerinin yapısını bozmaktadır. Enerji depoları tükenen iskemik hücrelerde, prostasiklin ve nitrik oksit (NO) gibi bazı biyoaktif maddelerin sentezi azalırken; adezyon molekülleri ve sitokinlerin sentezi artmaktadır (24).

Torsiyon ve sonrasında kan dolaşımında meydana gelen tıkanıklığı düzeltmek amacıyla yapılan detorsiyon işlemi İ/R hasarına yol açar (25). Yani, reperfüzyon evresi iskeminin hücrelere verdiği hasarı şiddetlendirmektedir. İ/R sonrasında

hücrelerde şişme ve pinostotik vesikül kaybı gibi bazı morfolojik değişikliklerin yanı sıra reaktif oksijen metabolitlerinde aşırı düzeyde artış gözlenmektedir (24). Bu metabolitler membran yapıtaşlarına saldırarak hücrenin işleyişini bozmakta ve hatta ölümüne neden olmaktadır. Çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengin bir membranına sahip olan testis hücreleri, lipid peroksidasyonuna ve oksidatif strese oldukça duyarlıdır ve serbest radikaller spermatogenezis açısından tehlike oluştururlar (26). Reperfüzyon sonrası TNF- α , interlökin-1 beta (IL-1 β) gibi proinflamatuvar sitokinler (9) ve mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) (27) gibi inflamasyonu indükleyen birtakım maddelerin ekspresyonu artar ve hasarlı bölgeye nötrofil göçü gerçekleşir (28). Serbest radikallerin ve inflamatuvar mediyatörlerin artışı, testise doğrudan zarar verdiği gibi apoptoz kaynaklı hücre ölümüne neden olarak dolaylı yoldan da hasara yol açar (9, 29).

2.2. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından fizyolojik hücre ölümünü ifade etmek için tanımlanmıştır (30). Nekrozdan farklı bir ölüm şekli olan apoptoz (31), çok hücreli bir organizmanın embriyonik dönemdeki gelişiminden başlayarak erişkin bir organizma olarak var olmasına ve yaşlanmasına dek birçok gelişim aşamasında organizmada homeostazinin sürmesini sağlayan önemli bir fizyolojik işlevdir. Apoptoz yukarıda bahsedilen homeostatik mekanizma olarak karşımıza çıkabileceği gibi, aynı zamanda hastalık ya da zararlı ajanlar tarafından hücreler zarar gördüğünde ya da immün reaksiyonlarda olduğu gibi bir savunma mekanizması olarak da oluşabilir (32). Viral enfeksiyonlarda ve bazı nörodejeneratif hastalıklarda apoptozun rolü olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan azalmış apoptotik hücre aktivasyonu da, vaktinde ölmeyen hücrelerin mutasyona uğraması sonucu malign hastalık riskini artırmaktadır. Dolayısıyla hem yavaşlamış hem de hızlanmış apoptoz, canlı hücreler için dengenin bozulması demektir.

Çok hücreli canlıların normal gelişimleri sırasında da apoptozun rolü vardır. Kurbağaların yetişkin forma geçerken kuyruklarını kaybetmesi, insan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin ilerleyen dönemde kaybolması gibi örnekler, programlanmış hücre ölüm mekanizmasının yani apoptozun göstergesidir.

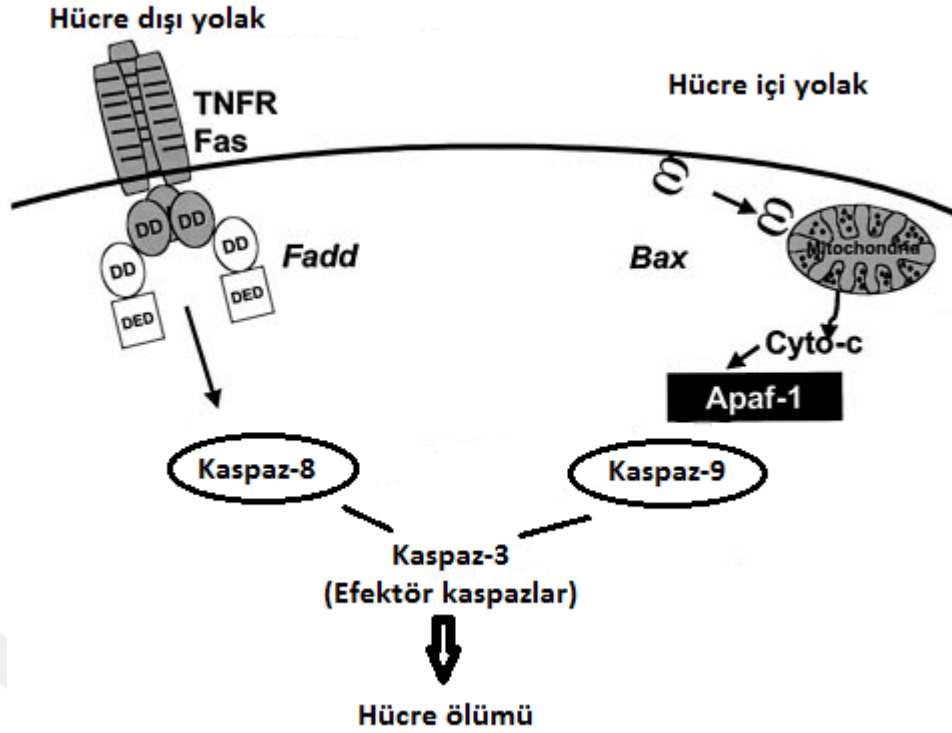
Apoptozun esas morfolojisini nükleusun yoğunlaşması ve sonrasında parçalanması olayı oluşturur. Bu olay hücrenin büzüşmesi ve etrafındaki hücrelerle temasının kaybolması ile karakterizedir. Hücre büzüşmesine yol açan mekanizma Na^+ , K^+ , Cl^- taşıyıcı sisteminin durmasından kaynaklanan hücrenin içi ile dışı arasında sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarı sonrası, hücrenin hacmi küçülür ve çevre ile teması kesilir (33). Nekrozda, hücre zarı ya da hücredeki metabolik süreçler çok hızlı işler, hücreler ağır biçimde hasar görür, zar patlar ve hücre içindeki yaşamsal maddeler dışarı saçılır. Nekrotik süreçten farklı olarak apoptozda zar bütünlüğü bozulmaz (34). Apoptoz önceden belirlenen bir yol ile koordineli olarak meydana gelirken, nekroz birçok biyokimyasal olaydan bağımsız olarak gerçekleşir ve hücrede enerji stoklarının tükenmesi ile aktive olur (35).

Apoptoz temel olarak iki yolla başlatılır (36) (Şekil 1):

1) Hücre dışından tetiklenen, pozitif (TNF- α varlığı) ya da negatif (büyüme faktörü yokluğu) ekstrinsek yol: Bu sinyal yolunda tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör gen süper ailesinin üyelerinden Fas ve TNF ölüm reseptörlerini içeren transmembran reseptörleri rol almaktadır. Reseptör kısımları hücre yüzeyinde bulunur. Bu reseptörlere Fas ligand (FasL) ve TNF- α ve β gibi ölüm aktivatörlerinin bağlanması ile bu reseptörler sitoplazmaya apoptotik sinyalleri iletirler. Bunun sonucunda kaspaz-8 aktive olur, aktif kaspaz-8 diğer kaspazları aktive eder ve sonuçta hücrenin fagosite edilmesine sebep olur.

2) Hücre içindeki deoksiribonükleik asit (DNA) hasarından, endoplazmik retikulum stresinden ya da mitokondriden tetiklenen intrinsek yol: Sağlıklı hücrelerin mitokondrilerinin dış membranında B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) proteini, membran yüzey proteini olarak eksprese olur. Bcl-2 proteini, apoptotik proteaz aktive edici faktör-1 (Apaf-1) protein molekülüne bağlı olarak bulunur. Hücrede oluşan iç hasar Bcl-2 proteinini etkileyerek Apaf-1 molekülünün kopmasına, bunun sonucu mitokondrinin içinde bulunan sitokrom-c'nin sitoplazmaya sızmasına neden olur. Salınan sitokrom c, Apaf-1 ile birlikte kaspaz-9 moleküllerine yapışır ve kaspaz-9 diğer kaspazlara bağlanarak onların aktive olmalarını sağlayarak hücre ölümü kaskadı başlamış olur (37).

Bu iki yola ilave olarak apoptozise neden olan T-hücre aracılı sitotoksisiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü de içeren bir yol daha vardır (38).



Şekil 1. Apoptoz yolları. Kısaltmalar: Apaf-1, Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1; Bax, B hücreli lenfoma-2 ilişkili X proteini; Cyto-c, sitokrom c; DED, efektör ölüm bölgesi; FADD, Fas ilişkili ölüm bölgesi; TNFR, tümör nekrozis faktör reseptörü (36).

Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizma oluşturur. Apoptotik süreç ister hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir.

Kaspazlar proteaz enzimleridir, bugüne dek 20'den fazla farklı türleri tanımlanmıştır, sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunurlar, aktif katalitik bölgelerinde sistein içerirler ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden keserler. Apoptozisin aktivasyonunda major rolü üstlenirler ve birçok hücrede inaktif proenzim formunda yaygın bir şekilde bulunurlar. Bir kez aktive olduklarında, bir proteaz kaskadının başlamasına izin veren diğer prokaspazları aktive edebilirler. Bir kaspazın diğer kaspazı aktive edebildiği bu proteolitik kaskad, apoptotik sinyal yolunu artırır ve böylece hızlı hücre ölümüne neden olur.

Kaspaz kaskadı, sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz-9'un aktivasyonu yoluyla aktiveleştirildiği gibi, kaspazlarda sitokrom c'nin salıverilmesine neden olabilirler.

Tanımlanmış olan 10 büyük kaspaz şu şekilde kategorize edilmiştir (39):

- Başlatıcılar (kaspaz-2,-8,-9,-10),
- Effektörler ya da karar vericiler (kaspaz-3,-6,-7) ve
- İnflamatuvar kaspazlar (kaspaz-1,-4,-5).

Apoptozda rol oynayan faktörler:

Apoptozun başlamasındaki iki temel yoldan biri olan mitokondriyel yol, esas olarak hücre membranında bulunan Bcl-2 proteini ile alakalıdır. Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşan ve apoptozisi düzenlemede en önemli role sahip olan protein grubudur. Bcl-2 ve Bcl-XL apoptozu engelleme fonksiyonunu ya kaspazların öncü formlarını durdurarak ya da kaspaz akışını direkt olarak aktive eden sitoplazmadaki apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve sitokrom c gibi apoptoz faktörlerin mitokondriden serbestleşmesini engelleyerek gerçekleştirir (40). Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle sitokrom c, sitoplazmaya salıverilir veya sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi baskılanır. Sitokrom c, apoptozis sırasında mitokondriden salınarak kaspaz aktivasyonunu başlatan, mitokondriyel elektron zincirinin bir bileşenidir (41).

Apoptozun düzenlenmesi:

Apoptozis p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. p53 bir tümör süpresör gen olarak çalışır, mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (42). p53 apoptozis üzerinde uyarıcı bir proteindir. Birçok anti-tümör ilaç, hedef olarak hücre DNA'sını seçer ve p53 seviyesini artırır. Bu aktivasyon ya hasarın tamirine ya da apoptozise yol açar (43).

Apoptozisi başlatan çeşitli nedenler vardır. Klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekrozis faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandlar ile etkileşime girmesi sonucu apoptozis indüklenir. Bu hücre yüzeyi reseptörleri membranda bulunurlar ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas reseptörleri lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde ve hatta miyokardda bulunur. İlgili ligandına da FasL denir. FasL, TNF ailesinin bir üyesidir. FasL, sitotoksik T lenfositlerinde ve doğal öldürücü hücrelerde bulunur (44).

2.2.1. İ/R hasarı ve apoptoz

Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz kanlanması sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücrel enerji depolarının boşalmasına ve toksik metabolitlerin birikmesine bağlı hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuda hücrenin rejenerasyonunu ve toksik metabolitlerin temizlenmesini sağlayan dokunun yeniden kanlanması reperfüzyon olarak tanımlanır. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara da yol açabilir (45).

Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikalleri (SOR) başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. İskemi sırasında küçük oranda SOR oluşmaktaysa da, reperfüzyon döneminde dokunun yeniden oksijenlenmesinin ardından çok daha büyük miktarda SOR oluşmakta ve bunlar da lipid peroksidasyonuna yol açarak hasarı artırmaktadırlar (46). İskemik dönemde oluşan oksidatif fosforilasyon hasarı, hem adenosin trifosfat (ATP) depolarında hızlı tükenmeye hem de azalmış ATP'ye bağlı hücre içi kalsiyumunda hızlı artışa neden olur. Dolayısıyla, hücre içi kalsiyumun artış hızı ve miktarı, hasarı etkileyen en önemli ve erken mekanizmadır ve de bu mekanizmanın hücrenin nekroz ve apoptozuyla direkt ilgili olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (47). Miyokard infarktüsü ve inme gibi iskemik durumlarda hücre ölümü nekroz veya apoptoz yoluyla meydana gelebilir (48). Böbrek (49), barsak (50) ve karaciğer (51) dokularında İ/R hasarı ile apoptozis arasındaki ilişki hayvan modellerinde çalışılmış; kalpte İ/R hasarında Fas reseptörünün miyokard hasarında rol aldığı gösterilmiştir (48).

Benzer şekilde karaciğerde yapılan çalışmalarda reperfüzyonun ilk saatlerinde apoptozla bağlı hücre ölümleri yüksek oranda gözlenmiştir (51). Apoptozda önemli rol oynayan TNF- α 'nın aktivasyonunun durdurulmasının, böbrek İ/R hasarında koruyucu olduğu saptanmıştır (49).

2.2.2. Testis İ/R hasarı ve apoptoz

Testiste apoptoz aracılığıyla hem kendiliğinden hem de çeşitli uyarıların tetiklemesi sonucunda hücre ölümü meydana gelmektedir. Apoptoz sperm üretimi ve olgunlaşması sürecinde rutin bir hücre ölümü şeklindedir. Testislerde spermatogenez

sonucunda üretilen spermier seminer tübül lümenine salınır. Tübül hücrelerinin sayısının normal düzeyde kalması açısından hücre proliferasyonu ve apoptotik hücre ölümü arasındaki denge belirleyici rol oynamaktadır. Spermatogenezin başlangıcında gonositlerin spermatogonyalara farklılaşması sırasında apoptozun arttığı tespit edilmiştir. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar spermatogenezin erken döneminde görülen apoptoza hem intrinsek hem ekstrinsek yolağın aracılık edebileceğini ortaya koymuştur (52). Apoptoz normal şartlarda spermatogenez için gerekli bir mekanizmadır, ancak İ/R'de olduğu gibi aşırı artması germ hücre ölümüne neden olmaktadır (53). Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda, testis İ/R sonucundaki histolojik incelemelerde, apoptotik hücre sayısının ve kaspaz-8 (54), kaspaz-9 ile kaspaz-3 (55) aktivasyonun arttığı gözlenmiştir.

Testis dokusunda İ/R sonrası apoptoz görülmesinin başlıca nedenlerinden biri oksidatif streştir. Testis hücrelerinin membran lipidleri fazla miktarda çoklu doymamış yağ asidi içerdiği için oksidatif strese oldukça duyarlıdır. Reperfüzyon sırasında oksijen miktarının aşırı düzeyde artması testisteki SOR ve reaktif nitrojen türlerini (RNS) artırır. Oluşan serbest radikaller hücre membranında başta lipidler olmak üzere proteinler ve DNA'yı okside ederek hücrenin işlevini bozarlar ve bu olay hücre ölümüne kadar uzanabilir. Testis İ/R çalışmalarında hem SOR'un hem de RNS'nin germ hücrelerinde apoptoza neden olduğu ortaya konmuştur (26, 56). Lysiak ve ark. çalışmalarında İ/R nedeniyle ortamda biriken oksidatif stres ürünlerinin mitokondriyel kaspaz-9 bağımlı yolak aracılığıyla apoptozu indüklediğini göstermişlerdir. Apoptotik mediyatörler olan Bcl-2 ilişkili X(Bax) proteini ile kaspaz-2'nin mitokondriye translokasyonu ve sitoplazmik sitokrom c proteininde artış gözlenmesi bu sonuca varılmasında etkili olmuştur (57). Endotelial veya indüklenbilir nitrik oksit sentaz(NOS) enzim aktivitelerinin ve buna bağılı olarak NO düzeylerinin artması sonucunda da apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (56).

Oksidatif stresten başka testis İ/R'de apoptoza neden olan bir diğeri olay ise ortama nötrofillerin göçüdür. Lysiak ve ark. çalışmalarında, nötrofillerin dokuya infiltrasyonunun bir belirteci olan miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinde ve testiküler subtunikal venlerdeki nötrofil miktarında artışlar olduğunu bildirmişlerdir (28). Bu artışla birlikte germ hücre apoptozunda da artış olmuştur. Aynı çalışmada endotelial hücre adezyon molekülü olan E-selektinden yoksun farelerin testisinde ise testis İ/R sonrası MPO aktivitesi ile testiküler subtunikal venlerdeki nötrofil miktarının ve apoptozun az olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında araştırmacılar

germ hücre apoptozunda ortamda nötrofil birikmesinin şart olduğunu ve E-selektinin bu olaya aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir. Testiste nötrofil toplanması ise SOR artışına neden olabilir. Bu da yine SOR aracılı hücre hasarına ve apoptoza yol açabilir.

Memelilerde apoptoza neden olan yollardan biri olan ekstrinsek sinyal yolağı diğer deyişle ölüm reseptörü kaynaklı yolak da, testiküler İ/R sonrası apoptoz meydana gelmesinde rol oynar. Sağlıklı yetişkin fare testisinde bu yolağın üyelerinden Fas ve ligandı FasL'nin ekspresyonu gösterilmiş; ancak germ hücre apoptozu ile arasında ilişki olmadığı saptanmıştır. Aynı çalışmada, Fas/FasL sisteminin ise testis İ/R nedeniyle hasar gören spermatojenik hücrelerde apoptozu indüklediği tespit edilmiştir (58).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda proinflamatuvar sitokin ailesinin ve ekstresek sinyal yolağının bir üyesi olan TNF- α 'nın da testis İ/R sonrasında apoptoza neden olduğu ortaya konmuştur. TNF- α 'nın böbrek ve beyin gibi çeşitli organ hasarlarında inflamasyon ve apoptoz mediyatörü olarak rol oynadığı ve aktivasyonunun engellenmesinin ise organ hasarında koruyucu olduğu gösterilmiştir (59-60). TNF- α 'nın testiküler bir patoloji olan otoimmün orşitte makrofajlar tarafından sekresyonunun arttığı ve beraberinde apoptoza yol açtığı bildirilmiştir. Bu olumsuz etki selektif TNF- α blokörlerinden biri olan etanersept kullanılarak tersine çevrilmiştir (61). Normal koşullarda testiste TNF- α , germ hücreleri tarafından üretilir ve spermatogenez ile Leydig hücrelerinde steroidogenezi düzenler. Spermatogenez sırasında, germ hücreleri olgunluğa erişmeden önce apoptoza uğrar. TNF- α aynı zamanda hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır. Apoptotik hücre ölümünün önemli bir mediyatörü olan TNF- α bu etkisini TNFR-1 aracılığıyla yapar (62). Rodriguez ve ark. çalışmalarında testis İ/R sonucunda kontralateral testiste TNF/TNFR-1 ekspresyonu aracılı germ hücre apoptozunun meydana geldiğini ve apoptotik germ hücrelerinin yaklaşık % 40'ının TNFR-1 eksprese ettiğini bildirmişlerdir (63). Özellikle reperfüzyonun erken saatlerinde doku ve kanda düzeyleri artan TNF- α 'nın hem inflamasyonu hem apoptotik mekanizmayı aktive ettiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (8, 63).

2.3. Tümör Nekrozis Faktör

TNF, organizmada birçok farklı hücre türüne etki ettiği için pleotropik özellik gösteren sitokin ailesinin bir üyesidir. Polipeptid yapıdaki bu mediyatörün iki çeşiti vardır. Önceleri TNF- α ve TNF- β olarak sınıflandırılan TNF türlerinin isimleri 1990'ların sonunda sırasıyla TNF ve lenfotoksin- α (LT- α) olarak değiştirilmiştir. Buna rağmen TNF- α ismi yaygın olarak kullanılmaya devam edilmektedir (64).

TNF- α başlıca makrofaj ve monositlerden, LT- α ise aktif T hücrelerinden salgınır (65). TNF- α makrofaj ve monositlerin yanı sıra lenfositler, fibroblastlar, mast hücreleri, endotel hücreleri ve nöronal doku gibi pek çok yerde sentezlenmektedir (66). Testiste ise yuvarlak spermatidlerin TNF- α sentezlediği ve pakiten spermatositler ile makrofajların TNF- α mRNA'sına sahip olduğu bilinmektedir (67). TNF- α sentezi, başta lipopolisakkaritler olmak üzere antijenler, enterotoksin, anafilatoksin ve TNF gibi bir başka sitokin olan interlökin-1 (IL-1) gibi uyarılar ile indüklenmektedir. Ayrıca TNF- α otokrin bir etkiyle kendi sentezini tetikleyebilir (68).

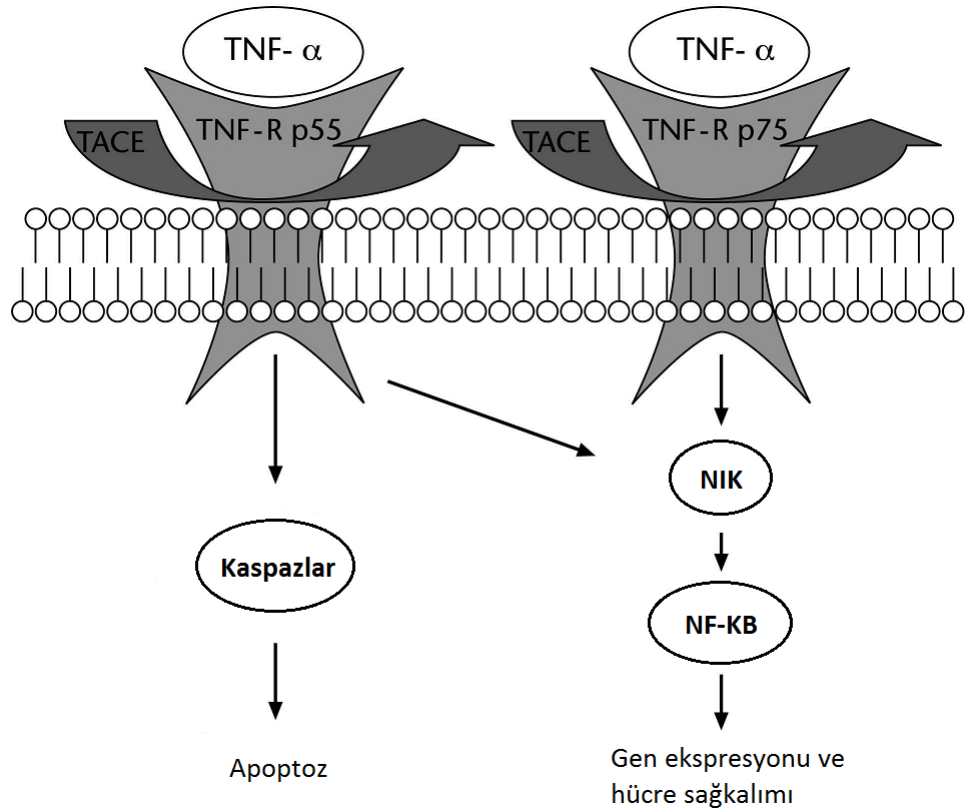
TNF- α vücutta iki şekilde bulunmaktadır. Bunlardan ilki membrana bağlı şekli olan transmembranal TNF- α 'dır (mTNF- α , 26kDa), bu haliyle aktiftir ve aynı zamanda prekürsör özelliğe sahiptir. Bir metalloproteaz olan TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) tarafından parçalanarak çözünebilir TNF- α 'ya (sTNF- α , 17kDa) dönüştürülür. sTNF- α da mTNF- α gibi biyolojik olarak aktiftir (69).

TNF- α hem immün sistem hem immün sistem dışındaki sistemlerde çok çeşitli etkilere sahiptir. Proinflamatuvar özellik gösteren TNF- α 'nın inflamasyon sürecinin başlaması ve devam etmesinde merkezi rolü vardır (70). TNF- α konak hücreyi lokal hasar durumunda korur; ancak TNF- α 'nın seviyesi yüksek konsantrasyonlara eriştiğinde inflamasyonun şiddeti de aynı şekilde artar ve doku hasarı meydana gelir. Aşırı miktarda salınması septik şokla sonuçlanabilir (64). Herhangi bir hasar veya enfeksiyon varlığında kanda ilk olarak görülen sitokin TNF- α 'dır. IL-1 β , IL-6 gibi diğer proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ise daha çok TNF- α 'ya bağlıdır (71). TNF- α E-selektin, hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) aracılığıyla lökositlerin endotele adezyonuna neden olur (72). TNF- α 'nın inflamatuvar sürecin dışında hücrenin hem sağ kalımı ve farklılaşmasında hem de apoptoza uğramasında rolü vardır. Normal hücrelerde mitojenik özellik gösteren TNF- α , değişime uğramış hücrelerde ise

apoptozu başlatır. TNF- α 'nın hangi yönde etki göstereceği ilgili hücrede aktive edilen sinyal yolağı ile ilişkilidir. Bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B'yi (NF- κ B) aktive ederek hücrenin sağ kalımına neden olan TNF- α , kaspazları aktive etmesi durumunda ise apoptoza yol açar (Şekil 2) (73). Endotoksinle muamele edilen farelerdeki bazı tümörlerin nekrozuna yol açarak sitotoksik özellik gösteren TNF'nin bu özelliğinden kanser tedavisinde yararlanılabileceği düşünülse de, aksine TNF mRNA ekspresyonunun over, meme, kolorektal ve başka kanser türleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (74-75). TNF- α 'nın yukarıda belirtilen etkilerinin yanında insülin rezistansı, kaşeksi, enerji metabolizması ile de ilişkili olduğu, pirojenik, anoreksijenik ve prokoagülan etki gösterdiği, endokrin sistem ve gastrointestinal sistemde çeşitli rollere sahip olduğu bilinmektedir (70).

Hemen her dokuda etkili olan TNF- α , düşük konsantrasyonda testisin normal fonksiyonlarının sürekliliği için de önemlidir. Sertoli hücrelerinde NF- κ B'nin aktivasyonunun yanı sıra transferrin üretimini artırarak spermatogenezi desteklemektedir. Yapılan çalışmalarla sitokrom P450 (CYP 450) aromataz, IL, indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve nitrit düzeylerini değiştirdiği tespit edilmiştir. Konsantrasyonu yüksek düzeylere eriştiğinde ise apoptoz aracılı hücre ölümüne neden olmaktadır (67).

TNF- α etkilerini glikoprotein yapıdaki reseptörleri TNFR-1 (CD120a, p55/60) ve TNFR-2'ye (CD120b, p75/80) bağlanarak gösterir. Bu reseptörlerin ikisi de ekstrasellüler kısımlarında sistein içermesine rağmen sitoplazmik kısımları farklıdır. mTNF- α her iki TNF- α reseptörünü uyarırken sTNF- α esas olarak TNFR-1'e bağlanır. Çoğu dokuda eksprese edilen TNFR-1 TNF- α 'nın proinflamatuvar ve apoptotik etkisine aracılık eder. Diğer taraftan TNF- α 'nın NF- κ B'yi aktive ederek hücrenin sağ kalımına neden olması da TNFR-1'e bağlanması sonucu gerçekleşir. Buradan anlaşılacağı üzere TNF- α , TNFR-1 aracılığıyla birbirine zıt etkiler gösterebilir. TNFR-1'in aksine TNFR-2'nin ekspresyonu ise daha çok immün sistemde olmak üzere kısıtlıdır. T hücrelerinde proliferatif olduğu ve anti-apoptotik özelliğinin bulunduğu bildirilmiştir. Ancak apoptoza neden olduğuna dair görüşler de vardır. Reseptörle etkileşen protein (RIP) varlığında hücre ölümünü tetikleyen TNFR-2'nin RIP olmadığı zamanlarda ise NF- κ B'yi aktive ettiği düşünülmektedir (76).



Şekil 2. TNF- α sinyal yolları. Kısaltmalar: NIK, NF- κ B indükleyen kinaz (73).

2.3.1. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) inhibitörleri

TNF- α başta romatoid artrit olmak üzere, psoriyatik artrit, psoriasis, ankilozan spondilit, ülseratif kolit ve Crohn hastalığı patogenezinde rol oynadığı için bu hastalıkların tedavisinde TNF- α inhibisyonundan yararlanılmaktadır. Günümüzde klinikte kullanılan, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış 5 tane TNF- α inhibitörü ilaç vardır. Bunlar onay aldıkları tarihe göre sırasıyla İNF, etanersept, adalimumab, sertolizumab pegol ve golimumabdır. Bu ilaçlardan İNF insan ve sıçan kaynaklı immünglobulin G1 (IgG1) monoklonal antikorudur olup intravenöz (iv) yoldan uygulanmaktadır. Etanersept insan IgG1 ve TNF p75 reseptöründen oluşan bir rekombinant füzyon proteinidir. TNF- α 'dan başka LT- α 'ya bağlanma özelliği de vardır. Sertolizumab pegol bir hümanize IgG4 antijen bağlayıcı fragman (Fab) parçacığı olup yapısına polietilen glikol (PEG) eklenmiştir. Adalimumab ve golimumab ise tamamen insan kaynaklı monoklonal antikorlardır. İNF dışında sayılan diğer ilaçlar subkutan (sc) yolla verilmektedir (77). Tablo 1'de TNF- α inhibitörlerinin endike olduğu hastalıklar ve bazı karakteristik özellikleri

belirtmiştir(64,78). Tablo 2’de ise TNF- α inhibitörlerinin deney hayvanlarında oluşturulan İ/R hasarı üzerine koruyucu etkilerini gösteren çalışmalar sunulmuştur.

Bu ilaç grubundan İNF, etanersept ve adalimumab Behçet hastalığı, sarkoidoz ve non-enfeksiyöz üveitte endikasyon dışı kullanılmaktadır (79). Günümüzde Sağlık Bakanlığı, TNF- α inhibitörlerinin, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, romatoid artrit, psoriatik artrit, ankilizon spondilit, psoriasis vulgaris ve ülseratif kolit, fistülize aktif luminal Crohn hastalığı teşhislerinde bedelini ödemektedir. TNF- α ’nın astım ve kronik obstrüktif solunum yolu hastalığı gibi inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rolü olduğu düşünülmekte ve TNF- α inhibitörlerinin bu hastalıklarda kullanımına ilişkin klinik araştırmalar devam etmektedir (80). Ayrıca santral sinir sisteminde yapılan çalışmalar majör depresyon, narkolepsi, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, multiple skleroz gibi bazı hastalıklarda da TNF- α sisteminin rolü olduğunu göstermektedir (73). Önümüzdeki yıllarda bu yönde yapılacak olan araştırmalar TNF- α inhibitörlerinin daha çok kullanım alanı kazanmasını sağlayabilir.

Tablo 1. TNF- α İnhibitörleri (64, 78)

	İnfliksımab	Adalimumab	Etanersept	Sertolizumab pegol	Golimumab
Ticari isim	Remicade [®] , Remsima [®]	Humira [®]	Enbrel [®]	Cimzia [®]	Simponi [®]
Hedef	mTNF- α sTNF- α	mTNF- α sTNF- α	sTNF- α LT- α	mTNF- α sTNF- α	mTNF- α sTNF- α
Kaynak	İnsan ve fare	İnsan	İnsan	İnsan	İnsan
t_{1/2}	8-10 gün	10-20 gün	4 gün	~ 14 gün	7-20 gün
C_{max}	118 μ g/mL	4.7 \pm 1.6 μ g/mL	1.1 \pm 0.6 μ g/mL		70.8 \pm 18.9 μ g/mL
Endikasyon					
Romatoid artrit	x	x	x	x	x
Psöriyatik artrit	x	x	x	x	x
Psoriyazis	x	x	x		
Ankilozan spondilit	x	x	x	x	x
Crohn hastalığı	x	x		x	
Ülseratif kolit	x	x			x
Hidradenitis suppurativa		x			
Üveit		x			
Poliartriküler idiyopatik juvenil artrit		x	x		x

2.3.1.1. İnfliksimab (İNF)

İNF, TNF- α 'ya spesifik ve ~149100 Da moleküler ağırlığında bir monoklonal antikordur. Kimerik yapıdaki bu madde %75 insan ve %25 sıçan bölümlerinden oluşur. Hem membrana bağlı şekildeki hem de çözünebilir TNF- α 'ya yüksek afinite ile bağlanma yeteneğine sahip olan İNF, TNF- α 'nın reseptörlerine bağlanmasını engeller. Böylelikle TNF- α 'nın aktivasyonunu inhibe etmiş olur. İNF'nin LT- α 'ya bağlanma özelliği ise yoktur (81).

Anti-TNF ilaç sınıfının ilk üyesi olan İNF, Crohn hastalığı için 1998 yılında FDA'dan onay aldığından beri çeşitli inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ülkemizde de Remicade® ve Remsima® ticari adıyla piyasada mevcut olup bunlardan ilk ruhsatlandırılan Remicade, Sağlık Bakanlığı'ndan 2002'de ruhsat almıştır. İNF'nin romatoid artrit, Crohn hastalığı, ankilozan spondilit, ülseratif kolit, psoriyatik artrit ve psoriyazis hastalıkları için tek başına ve/veya metotreksat ile kombine şekilde kullanım endikasyonu vardır. Pediatrik (≥ 6 yaş) inflamatuvar barsak hastalığında halen FDA'nın onayladığı tek TNF inhibitörüdür. Romatoid artrit için başlangıç ve idame dozu 3 mg/kg iv infüzyon olup endike olduğu diğer hastalıklar için 5 mg/kg iv infüzyon şeklindedir. Doz ve tedavi şemaları hastanın durumuna ve hastalıkların seyrine göre değişmektedir (77-78). İNF ayrıca Japonya'da Behçet hastalığı ile ilişkili üveoretinitte kullanılmak üzere endikasyon almıştır (82). Türkiye'de 28.11.2018 tarihinden itibaren geçerli olan Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'nun ek onayı alınmadan kullanılacak endikasyon dışı ilaç listesine göre; lokal veya sistemik steroid, azatiyopurin, siklosporin ve interferon dirençli behçet hastalığında bedeli ödenmektedir.

Yapılan araştırmalar İNF'nin dağılım hacminin düşük olduğunu ve vasküler kompartıman içinde dağıldığını ortaya koymuştur. Spesifik olmayan proteazlar tarafından yıkıldığı düşünülen İNF'nin klerensini hastanın albumin seviyesi, vücut ağırlığı ve tedavi süresince oluşan anti-ilaç antikorları etkileyebilir. Bu antikorlar ilacın dolaşımdaki miktarını ve tedaviye verilen cevabı azaltır (83-84).

İNF kullanımı ile en sık gözlenen yan etkiler infüzyon reaksiyonları ve enfeksiyonlardır. Serum hastalığı benzeri reaksiyon, lupus benzeri otoimmün bozukluklar ve uzun süreli kullanıma bağlı malignite de olası yan etkiler arasında sayılmaktadır (85-86). İlacın prospektüsünde, klinik çalışmalarda sık olarak baş ağrısı, vertigo, yüzde kızarma, bulantı, diyare, karaciğer transaminazlarında yükselme, döküntü,

kaşıntı, cilt kuruluğu, dispne, sinüzit, üst ve alt solunum yolu enfeksiyonları gibi yan etkilerin görüldüğü bildirilmiştir. Yanı sıra kullanım sonrası ciddi laringeal, faringeal ödem ve bronkospazm gibi anafilaktik benzeri reaksiyonlar ve nöbet vakaları da rapor edilmiştir.

2.3.1.2. Etanersept

Dimerik yapıdaki etanersept anti-TNF ilaç grubunun çözünebilir reseptör üyesidir. İNF ve diğer monoklonal antikoların aksine tek bir TNF reseptörünün (TNF p75) özelliklerini taşır. TNF- α ile etanersept birbirine hızlı ve geri dönüşümlü olarak bağlanır. Bu nedenle etanersept membran TNF- α 'sı ile İNF kadar stabil bir kompleks oluşturamaz. TNF- α 'ya ek olarak LT- α 'ya bağlanabilmesi etanerseptin juvenil idiyopatik artritte tedavisinde öne çıkmasını sağlar. Diğer anti TNF- α ajanlara göre immunojenite potansiyeli ve anti-etanersept antikoları daha azdır (77).

Subkütan enjeksiyonu takiben yavaşça absorbe edilen etanerseptin biyoyararlanımı sağlıklı bireylerde %58'dir. Varfarin, digoksin veya metotreksat ile birlikte uygulandığında doz ayarlanmasına gerek yoktur (87).

2.3.1.3. Adalimumab

Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen insan IgG1 monoklonal antikordur. Moleküler ağırlığı 148 kDa olup 1330 aminoasitten oluşmaktadır (88). Adalimumabın TNF- α 'ya afinitesi çok yüksektir; ancak LT- α 'yı inhibe edemez. Adalimumab membrana bağlı ve çözünebilir formda bulunan TNF- α 'nın her ikisine birden sıkı bir şekilde bağlanır ve TNF- α 'nın reseptörleri TNFR-1 ve TNFR-2 ile etkileşmesini önler. Tamamen insansı yapıda olduğu için alerjik reaksiyon görülme olasılığı azdır (89).

2.3.1.4. Sertolizumab pegol

Sertolizumab pegol, bir diğer insan monoklonal antikor olup yapısında Fab içermektedir. Fab kısmının PEG ile konjuge olması sertolizumab pegolün dolaşımında daha çok kalmasını, etkinliğinin ve inflamasyonlu dokulara geçişinin artmasını sağlamaktadır. Sertolizumab pegol Fc bölgesi içermediği için diğer monoklonal antikolar gibi sitotoksositeye neden olmaz. TNF- α 'ya afinitesi yüksektir. Monoklonal antikoların genel bir özelliği olduğu üzere hem çözünebilir hem membrana bağlı TNF- α 'ya bağlanabilir; LT- α 'ya ise etkisizdir (90).

2.3.1.5. Golimumab

Anti-TNF ilaç pazarına en son dahil olan insan monoklonal antikorudur. Adalimumab gibi tamamen humanize ve insan IgG'sine benzer özellikte olup immünojenitesi azdır. Diğer Anti-TNF sınıfındaki ilaçlardan daha az sıklıkta (ayda bir kez) uygulanmaktadır (77).

Tablo 2. TNF- α İnhibitörlerinin İ/R hasarı Üzerine Koruyucu Etkileri

Ajanlar	Organ	Koruyucu Etkileri	Kaynak	
İnfliksimab	Karaciğer	Laminin ekspresyonunda azalma Anti- TNF- α aktivite	(92)	
	Böbrek	Makrofaj ve monosit birikiminde azalma İnflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu	(93)	
	Karaciğer	Histopatolojik değişikliklerde iyileşme Antioksidan aktivite TNF- α düzeyinde azalma	(94)	
	Barsak	Mukozal hasarı ve apoptozisin önlenmesi Kaspaz 9 ve 3 aktivasyonunda inhibisyon	(50)	
	Barsak İ/R'ye bağlı akciğer hasarı	JNK sinyalinde inhibisyon Antiinflamatuvar ve antioksidan etki	(95)	
	Spinal kord	Vasküler proliferasyon, ödem ve nöron kaybında azalma	(16)	
	İskelet kası	Antioksidan etki Histopatolojik iyileşme	(96)	
	Miyokard	Notch-1 sinyal yolağının aktivasyonu sonucu miyokardial oksidatif/nitratif strese azalma	(97)	
	Etanersept	Karaciğer	Antiinflamatuvar ve antioksidan etki Histopatolojik hasarda düzelme	(98)
		Serebral	Antiinflamatuvar etki	(99)
Böbrek		ERK aktivasyonunu Bcl-2/Bax oranında yükselme	(59)	
Adalimumab	Böbrek	Antiinflamatuvar ve antioksidan etki	(100)	
	Akciğer	Sitokin salınımı, SOR üretimi ve kaspaz yolağının aktivasyonunu önleme Endotelin-1 salınımında azalma Histopatolojik hasarı önleme	(101)	
	Karaciğer	Antiinflamatuvar ve antioksidan etki	(91)	

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar

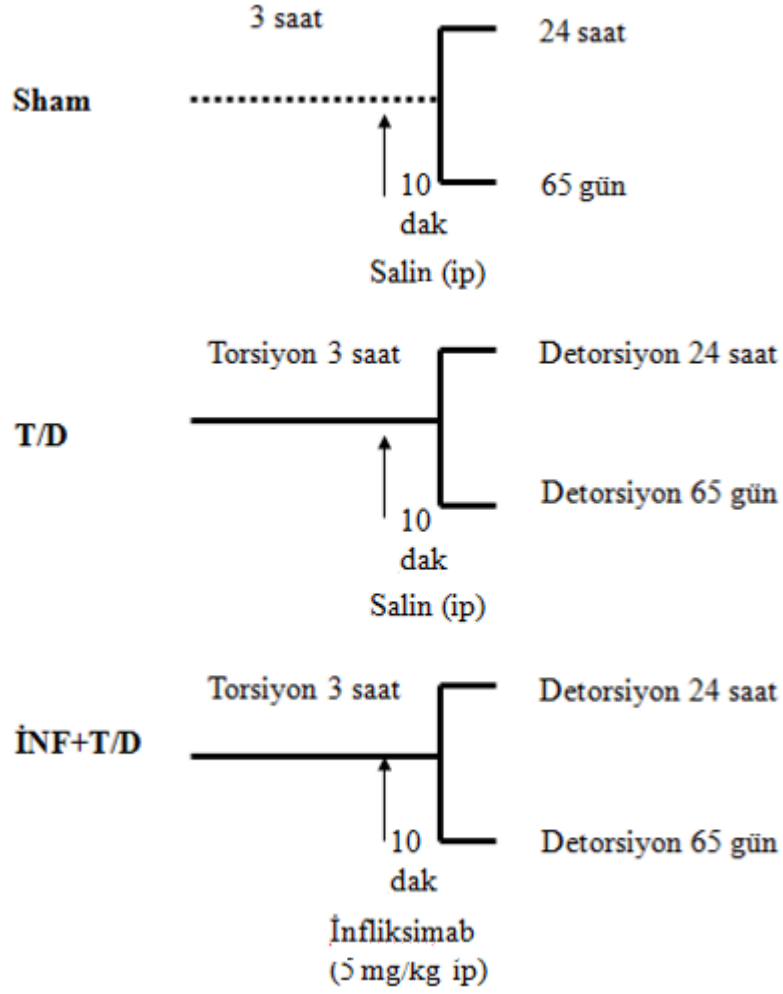
Deneyleerde, Bülent Ecevit Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde üretilen Wistar cinsi 300-350 gram (g) ağırlığında 42 adet (n=7) erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olan 21 ± 2 C° sıcaklıkta, % 60 ± 5 nem oranındaki odalarda barındırıldılar. Hayvanlar pellet yem ve çeşme suyu verilerek beslendi. Hayvanlar üzerinde yapılan uygulamalar ve protokoller için, "Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan" onay alındı (Ek 7.1.).

3.2. Kimyasallar

Deneyleerde infliksimab (Remicade®, Schering Plough Tıbbi Ürünler Ticaret A.Ş.) ve anestezi için tiyopental sodyum (Pental®, İE Ulugay İlaç Sanayi A.Ş.) kullanıldı. İlaçların hepsi salinde çözüldü. İnfliksimab salinde çözüldükten sonra, oda ısısında saklanarak 5 saatlik, buzdolabında saklanarak ise 8 saatlik süre içinde kullanıldı.

3.3. Gruplar

Sıçanlar rastgele olarak sham, T/D ve infliksimab +T/D olmak üzere 3 ana gruba ayrıldı. Her grup kendi içinde histopatolojik değerlendirme ve immünohistokimyasal boyama için 24 saat detorsiyon; sperm sayımı, testis ve kauda epididimlerin ağırlıklarını değerlendirmek için 65 gün detorsiyon uygulanacak şekilde tekrar ikiye ayrıldı (Şekil 3).



Şekil 3. Deney grupları.

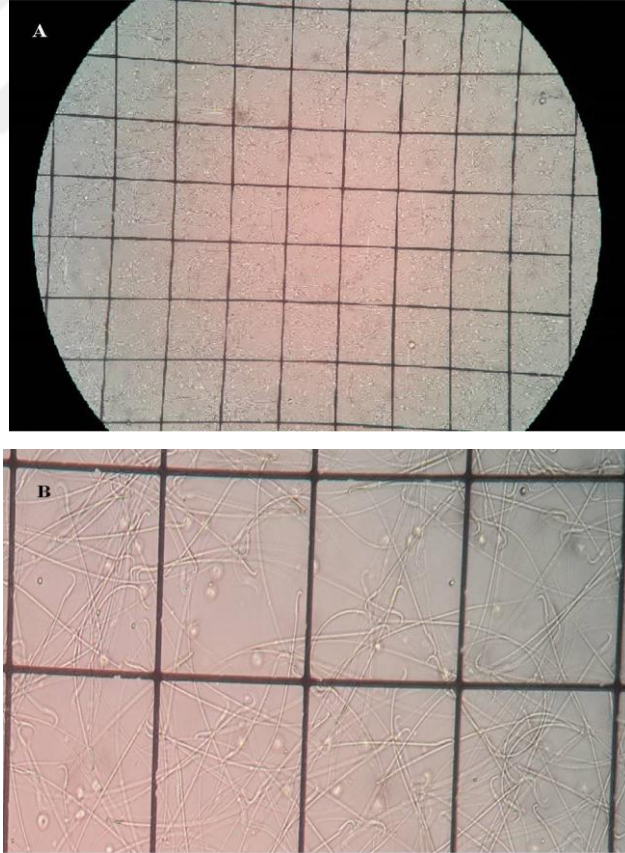
3.4. Testiküler Torsiyon Detorsiyon (T/D) İşlemi

Sıçanlara 50 mg/kg tiyopental sodyum intraperitoneal (ip) verilerek anestezi edildi. Abdominal insizyon uygulanarak, sıçanların sağ testisleri dışarı çıkarılıp spermatik kordları saat yönünde 720⁰ döndürülüp batına sabitlendi ve 3 saatlik torsiyon işlemi sonrası spermatik korda detorsiyon uygulanarak testisler skrotuma yerleştirildi. İnfliksimab ile tedavi edilecek gruba detorsiyondan 10 dk önce, 5 mg/kg İNF tek doz ip olarak uygulandı. Kontrol grubu sıçanlara, sham uygulama ile spermatik kordun T/D işlemi hariç, aynı işlemler uygulandı. Torsiyon yapılan taraftaki (ipsilateral) ve karşı taraftaki (kontralateral) testis dokuları, detorsiyon bitiminde anestezi altında çıkarıldı.

3.5. Sperm sayımı

Detorsiyonun 65. gününde çıkarılan gruplara ait ipsilateral ve kontralateral testisler ile kauda epididimler tartıldı ve kauda epididimlerde sperm sayımı yapıldı (Şekil 4).

Epididimal sperm sayımı Yokoi ve ark.'nın (102) çalışması modifiye edilerek yapıldı. Hayvanların kauda epididimleri çıkartılıp, bir cetvel yardımı ile 1 cm boyunda kesilip tartıldıktan sonra, bir eppendorf tüpe yerleştirildi ve üzerine 1 ml serum fizyolojik eklenerek katarakt makası ile parçalanıp yarım saat süre ile 37 C° sıcaklıkta bekletildi. Bu işlem epididimdeki spermlerin sıvıya salınmasını sağlamak amacıyla uygulandı. Makler kamera yardımı ile 20'lik objektifte ışık mikroskopisi altında sperm sayımı yapıldı. Örnekten alınan 10 µl sıvı makler kameranın alt kısmındaki diskin üzerine yerleştirildikten sonra bu diskin üzeri ayrı bir cam disk ile kapatıldı. Yan yana 10 kare içindeki spermler sayıldı (Şekil 4). Sayılan 2-3 alan içindeki sperm sayısının ortalaması alındı. Sperm sayımı x 10⁶/g epididim olarak sunuldu.



Şekil 4. Makler kamerada sperm sayımı yapılırken spermlerin uzaktan (A) ve yakından (B) görüntüsü.

3.6. Histopatolojik Değerlendirme

Detorsiyonun 24. saatinde anestezi edilerek çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testisler ile kauda epididimler tartıldıktan sonra testis dokuları %10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonuna alındı ve 24 saat fikse edildi. Testis dokuları transvers olarak iki eşit parçaya ayrıldı.

Tüm rnekler histopatolojik inceleme için rutin doku takibi işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitlere hematoksilin-eozin (H&E) boyası uygulandı.

Histopatolojik değerlendirmeler Zeiss marka Axiolab A1 model ışık mikroskobu (Carl Zeiss, Almanya) altında, H&E boyalı preparatlar üzerinde gerçekleştirildi. n incelemede, hazırlanan tüm preparatlar küçük büyütmede (x40) gözden geçirildi ve testis dokusunun genel morfolojisi (kesit düzlemindeki seminifer tübül sayısı, bazal membran yapısı, intersitisyel doku özelliği, Leydig hücreleri, peritübüler hyalinizasyon vb.) değerlendirildi.

Seminifer tübüllerde gözlenen histolojik bulgular Johnsen skorlama sistemine uygun olarak 1-10 arasında değişen bir skalada (103), 400 büyütmede 10 ardışık alanda skorlandı ve ortalamaları alındı. Johnsen skorlaması, öncelikle en matür hücre tiplerinin kaybı ile germinal epitelin ilerleyici dejenerasyonu ve spermatozoa, spermatid, spermatosit ve son olarak da Sertoli hücrelerinin gözlenememesi ile karakterize, testiküler hasarı temel alan bir skorlamadır. Hasar arttika skorlamada puan azalır (Tablo 3).

Tablo 3. Johnsen Skorlama Sistemine Göre Histopatolojik Kriterler (103)

Skor	Histolojik bulgular
10	Bütünüyle matür spermatogenez izlenmektedir. Seminifer tübüllerde germinal epitel çok sıralıdır ve çok sayıda spermatozoa içerir.
9	Hafif derecede bozulmuş spermatogenez izlenir. Seminifer tübüllerin germinal epitelinde disorganizasyon ve lümene doğru yığılma yanı sıra çok sayıda geç spermatozoa görülür.
8	Yoğun nükleer boyama gösteren 10 taneden az spermatozoa gözlenmektedir. Bazen piknotik cisimciklere rastlanır.
7	Spermatozoa yoktur, ancak çok sayıda matür spermatidler gözlenir. Bu hücrelerin düşük yoğunluktaki nükleer boyanma özellikleri nedeniyle periferik yerleşimi gösterilebilir.
6	Az sayıda soluk kromatinli ve dar oval başlıklı orta-büyüklikte spermatidler gözlenir, sıralı olarak dizilmişlerdir. Piknotik cisimcik yoktur.
5	Spermatozoa ve spermatid yoktur, ancak çok sayıda spermatosit görülür.
4	Sadece çok az bir miktar spermatosit (5'ten az) gözlenir. Spermatid ve spermatozoa gözlenmez.
3	Germ hücre olarak sadece spermatogonia vardır.
2	Hiç bir germ hücresi yoktur, fakat Sertoli hücreleri vardır.
1	Tübüler bölümde hücre yoktur.

3.7. İmmünohistokimyasal Boyama ile Değerlendirme

Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan testis doku örneklerinde immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Anti-caspase 3, 8 ve 9 aktivitesini araştırmak amacıyla ABC (Avidin-Biotin Kompleks) yöntemi kullanıldı. Testis dokusundan 4 µm kalınlığında alınan transvers kesitler, deparafinizasyon işlemi için 61 C°'de inkübe edilip, sırasıyla ksilen ve alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Dokuda formaldehit fiksasyonundan kaynaklanan reseptör maskelenmesini önlemek için, sitrat tamponuna alınan kesitlere mikrodalgada yüksek ısı uygulandı. Antijenik determinant bölgelerinin açığa çıkarılmasından sonra kesitler sitrat tamponundan distile suya alınıp 20 dak oda sıcaklığında tutuldu. Kesitler

fosfattamponlu salin (PBS) içerisinde 3 defa çalkalandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla 15 dak süreyle %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildi. Nonspesifik bağlanmayı önlemek amacıyla 5 dak'lık Ultra V block (LabVision, TA-015-UB) uygulamasını takiben, 1/100 dilüsyonlarda hazırlanan anti-cleavage caspase 3, anti-caspase 8 ve anti-caspase 9 primer antikorları kesitlere oda sıcaklığında ve nemli bir ortamda 1 saat süre ile uygulandı. Primer antikor aşamasından sonra, kesitler PBS'ye alınıp uygun sekonder antikor (Biotinylated Link, Dako, K0609) ile 30 dak muamele edildi. Ardından tekrar PBS'ye alınan kesitlere 10 dak Streptavidin peroksidaz (Streptavidin HRP, Dako, K0609) kompleksi uygulandı. Tekrar PBS'ye alınan kesitlere immün reaksiyon gerçekleşinceye kadar (mikroskop altında kontrol ederek) diaminobenzidin (DAB) kromojen solüsyonu (Vector, SK-4100) sonrası, Mayer's hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Kesitler alkol serilerinden geçirilip, ksilen ile muamele edildikten sonra entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Zeiss marka Axiolab A1 model ışık mikroskobu (Carl Zeiss, Almanya) altında değerlendirilerek bulgular fotoğraflandı.(Şekil: 5,6,7,8)

3.8. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak sunuldu. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Shapiro Wilk testi ile bakıldıktan sonra normal dağılım göstermediği için gruplar arası kıyaslamalarda Kruskal-Wallis varyans analizi uygulandı. Gruplar arasındaki farklılıklar Mann-Whitney *U* testi ile değerlendirildi. Sağ ve sol testislerin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde, $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Testis ve Kauda Epididim Ağırlıkları

Detorsiyonun 24. saatinde ve 65. gününde çıkarılan sıçan testis ve kauda epididimlerin ağırlıkları hassas terazi ile g cinsinden ölçülmüştür (Tablo 4, Tablo 5). Detorsiyonun 24. saatinde, hem ipsilateral hem de kontralateral taraftaki testis ve kauda epididim ağırlıklarının gruplar arasında farklılık göstermediği belirlendi.

Tablo 4. Detorsiyonun 24. Saatinde Çıkarılan İpsilateral ve Kontralateral Testis ve Kauda Epididimlerin Ağırlıkları

Gruplar	Ağırlık(g)			
	İpsilateral testis	Kontralateral testis	İpsilateral kauda epididim	Kontralateral kauda epididim
Sham	1.40±0.354	1.27±0.451	0.21±0.043	0.19±0.035
T/D	1.47±0.184	1.46±0.491	0.23±0.015	0.21±0.029
İNF+T/D	1.52±0.269	1.53±0.842	0.23±0.046	0.22±0.011

Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak sunuldu.

Detorsiyonun 65. gününde ipsilateral ve kontralateral testis ve kauda epididim ağırlıkları birbirleriyle karşılaştırıldığında, sham uygulanan grupta anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. T/D işlemi uygulanan grubun ipsilateral taraftaki testis ($p=0.002$) ve kauda epididim ($p=0.002$) ağırlık ortalamaları sham grubuna göre düşük bulunurken; kontralateral taraf ortalaması sham grubundan farklı bulunmadı. Benzer şekilde İNF+T/D gruplarında ipsilateral taraftaki testis ($p=0.003$) ve kauda epididim ($p=0.003$) ağırlıklarının ortalamaları sham grubuna göre düşük bulunurken; kontralateral taraf ortalaması sham grubundan farklılık göstermedi. İpsilateral testislerle kontralateral testisler karşılaştırıldığında, T/D grubundaki ipsilateral testislerin ($p=0.018$) ve kauda epididimlerin ($p=0.018$) ağırlık ortalamaları kontralaterale göre düşük bulundu. Benzer şekilde İNF+T/D grubunda da ipsilateral taraftaki testis ($p=0.018$) ve kauda epididim ($p=0.028$) ağırlıklarının ortalamaları kontralaterale göre düşük bulundu.

Tablo 5. Detorsiyonun 65. Gününde Çıkarılan İpsilateral ve Kontralateral Testis ve Kauda Epididimlerin Ağırlıkları

Gruplar	Ağırlık(g)			
	İpsilateral testis	Kontralateral testis	İpsilateral kauda epididim	Kontralateral kauda epididim
Sham	1.37±0.205	1.22±0.342	0.25±0.049	0.21±0.301
T/D	0.73±0.121 ^{a*}	1.49±0.109	0.13±0.017 ^{a*}	0.22±0.010
İNF+T/D	0.80±0.132 ^{a*}	1.61±0.531	0.12±0.247 ^{a*}	0.24±0.012

Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. ^a: p<0.05 sham'den, *: p<0.05 kontralateralden farkı gösterir.

4.2. Epididimal sperm miktarı

Detorsiyonun 65. günü ipsilateral ve kontralateral kauda epididimler çıkarılarak, grupların sperm miktarları değerlendirildi (Tablo 6).

Sham uygulanan grubun sperm miktarı değerlendirildiğinde, ipsilateral ve kontralateral kauda epididim değerleri karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmedi.

T/D uygulanan grubun ipsilateral kauda epididimlerinde, sperm miktarı (p=0.002) sham grubuna göre düşük bulundu. T/D uygulanan grubun kontralateral kauda epididimlerinde sperm miktarı sham grubundan anlamlı farklı bulunmadı. T/D uygulama sonrası, ipsilateral kauda epididimlerdeki sperm miktarı (p=0.018) kontralateral tarafla karşılaştırıldığında düşük bulundu.

İNF ile tedavi edilen T/D grubundaki sperm sayısının (sadece ipsilateral kauda epididimlerde) T/D uygulanan grubun sperm sayısına benzer şekilde sham grubundan düşük olduğu (p=0.003) belirlendi.

İNF+T/D ile T/D grubu karşılaştırıldığında sperm miktarı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Bu grupların ipsilateral kauda epididimlerdeki sperm miktarları (p=0.027) kontralateral tarafların değerleri ile karşılaştırıldığında düşük bulundu.

Tablo 6. Detorsiyonun 65. Gününde Alınan Kauda Epididimlerden Elde Edilen Sperm Analizi

Gruplar	Sperm Sayımı (x10 ⁶ / g epididim)	
	İpsilateral	Kontralateral
Sham	85.7± 45.80	85.6 ± 48.92
T/D	2.4 ± 1.40 ^{a*}	67.1 ± 19.71
İNF+T/D	2.0 ± 1.67 ^{a*}	51.7 ±20.11

Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. ^a: p<0.05 sham'den, *: p<0.05 kontralateralden farkı gösterir.

4.3. Histopatolojik değerlendirme

Detorsiyonun 24. saatinde alınan ipsilateral ve kontralateral testislerin histopatolojik değerlendirmesinde Johnsen skorlaması yapılmıştır (Tablo 7).

Sham grubunun ipsilateral (Şekil 5A) ve kontralateral (Şekil 5B) testis dokularında normal morfoloji ve matür spermatogenez izlendi.

T/D grubundaki ipsilateral testis dokularında (p=0.002) Johnsen skoru, sham grubuna göre düşük bulunurken; kontralateral testis dokularında anlamlı farklılık gözlenmedi. T/D grubunun ipsilateral testis dokularında, interstisyel bağ dokusunda peritübüler hyalinizasyon ve yoğunluk artışı, seminifer tübüllerde yer alan hücrelerde disorganizasyon ile birlikte vakuolizasyon ve spermatogony matürasyonunda belirgin azalma gözlemlendi (Şekil 5C) Kontralateral testislerde ise normal morfoloji izlendi (Şekil 5D).

İNF ile tedavi edilen T/D grubundaki ipsilateral testis dokularında (p=0.002) Johnsen skoru sham grubuna göre düşük bulundu. T/D grubuna göre ise, Johnsen skoru yüksek bulunmasına rağmen, bu değer istatistiksel olarak anlamlı değildi. İNF ile tedavi edilen T/D grubunun ipsilateral testis dokularında tespit edilen histolojik değişiklikler, sadece T/D uygulanan ipsilateral testis dokularında kilere benzemekle birlikte, yoğunluk olarak daha az gözlemlendi. Bu gruba ait dokularda interstisyel bağ dokusu normal yapıda izlenmekle birlikte, tübüllerin bazılarında dejeneratif değişiklikler ve vakuolizasyon tespit edildi (Şekil 5E). İNF ile tedavi edilen T/D grubunun kontralateral testis dokularında sham ve T/D grubuna göre bir farklılık bulunmadı (Şekil 5F).

İpsilateral testisler ile kontralateral testisler karşılaştırıldığında ise sham grubu (p=0.518) hariç diğer grupların ipsilateral testislerinde (p=0.018) skor düşük bulundu (Tablo 7).

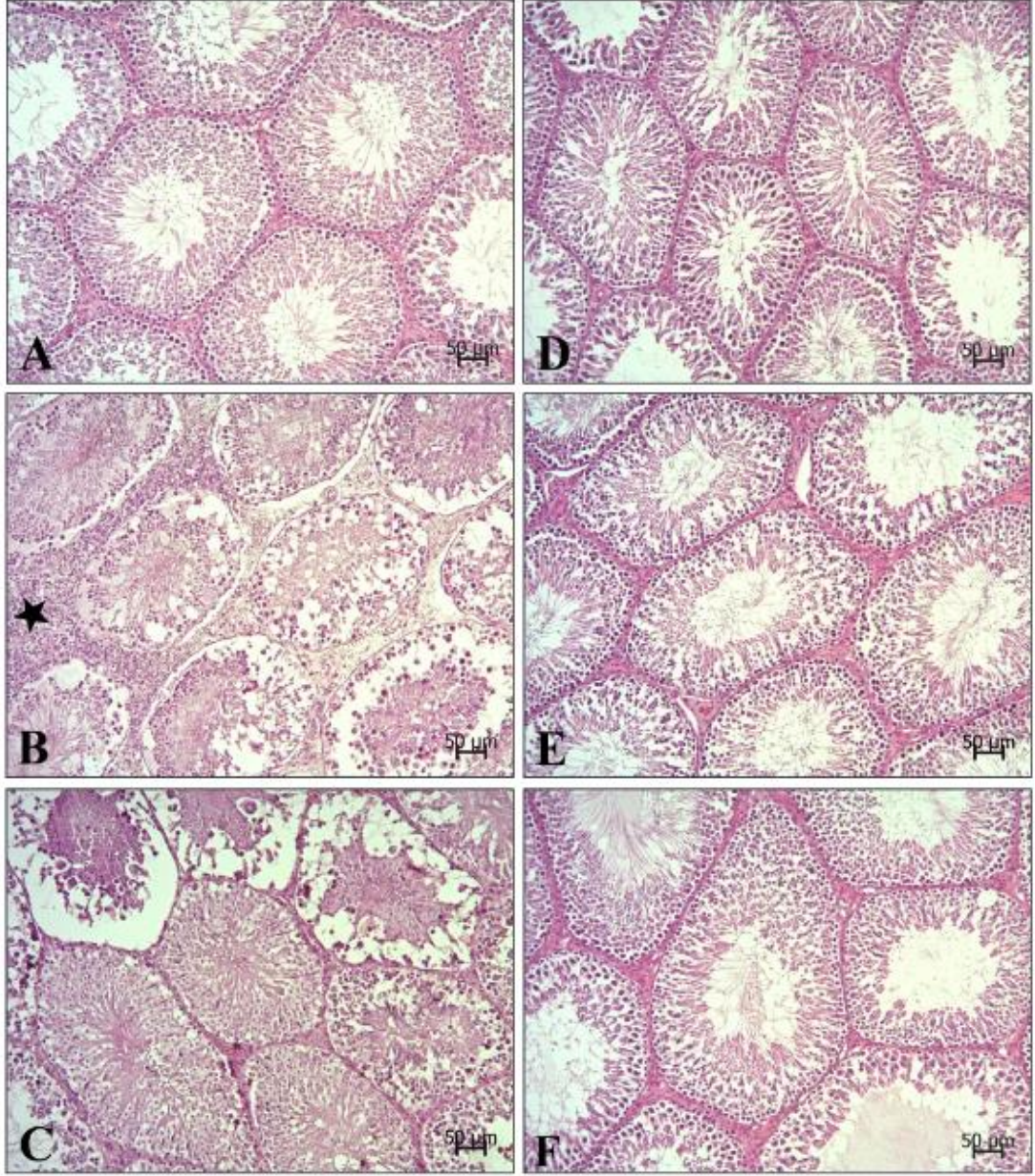
Tablo 7. Detorsiyonun 24. Saatinde Alınan Testislerdeki Histopatolojik Hasar Skorlaması

Gruplar	İpsilateral testis	Kontralateral testis
Sham	9.69 ± 0.122	9.73 ± 0.076
T/D	7.63 ± 0.844 ^{a*}	9.54 ± 0.151
İNF+ T/D	8.70 ± 0.594 ^{a*}	9.63 ± 0.125

Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. ^a: p<0.05 sham'den, * : p<0.05 kontralateralden farkı gösterir.

İpsilateral Testis

Kontralateral Testis



Şekil 5. Detorsiyonun 24. saati; Sham, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral (A-B-C) ve kontralateral (D-E-F) testis dokularının histolojisi. A. Sham grubu, ipsilateral testis dokusunda normal morfoloji izlenmekte. B. T/D grubunun ipsilateral testise ait interstisyel bağ dokusunda peritübüler hyalinizasyon ve yoğunluk artışı izlenmekte (yıldız), seminifer tübüllerde yer alan hücrelerde disorganizasyon ile birlikte vakuolizasyon (ok) dikkat çekmekte. C. İNF+T/D grubunun ipsilateral testise ait interstisyel bağ dokusu normal yapıda izlense de, tübüllerin bazılarında dejeneratif değişiklikler, vakuolizasyon (ok) dikkat çekmekte. İnfliksimab tedavisine bağlı olarak tübüllerin bir kısmının korunduğu izlenmekte. Tüm grupların kontralateral testislerinde (D-E-F) normal morfolojik yapı izlenmekte. H-E, scale bar: 50 µm.

4.4. Apoptotik Değerlendirme

Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testis dokularında immünohistokimyasal boyama yöntemi ile kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktiviteleri değerlendirildi (Tablo 8).

Tablo 8. Detorsiyonun 24. Saatinde Çıkarılan İpsilateral ve Kontralateral Testis Dokularında İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Kaspaz-9, Kaspaz-8 ve Kaspaz-3 Aktiviteleri

Grup	Spermatogonyumlar			Spermatositler			Spermatidler		
	Kaspaz 9	Kaspaz 8	Kaspaz 3	Kaspaz 9	Kaspaz 8	Kaspaz 3	Kaspaz 9	Kaspaz 8	Kaspaz 3
Sham	+++	+/-	+/-	+	++	+/-	+	+++	+/-
T/D	+/-	+/-	-	++	+++	+++	++	+++	+/-
İNF + T/D	++	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++

Sham grubundaki ipsilateral testis dokularında, özellikle spermatogonyumlar kaspaz-9 ile kuvvetli boyanırken; spermatogenetik seriye ait diğer hücrelerde ise nispeten daha zayıf bir boyanma izlenildi (Şekil 6A). Seminifer tübülün lümene yakın kısmındaki spermatidlerde kaspaz 8 ile kuvvetli boyanmalar gözlenirken (Şekil 7A), seminifer tübülün periferindeki spermatogonyumlarda, spermatositlerde ve lümene yakın yerleşimli spermatidlerin bazılarında kaspaz 3 ile çok zayıf bir immün reaktivite izlendi (Şekil 8A).

T/D grubundaki ipsilateral testis dokularında dejenere olmuş seminifer tübüllerde, spermatogonyumlar dışındaki hücrelerde kaspaz-9 ile orta şiddette boyanmalar izlenirken (Şekil 6B); seminifer tübüldeki spermatositlerde kaspaz-8 ile immün reaksiyon görüldü (Şekil 7B). Seminifer tübülün periferindeki dejenere olmuş spermatogonyumlarda kaspaz-3 ile herhangi bir reaksiyon gözlenmezken, özellikle spermatositlerde kuvvetli boyanma izlenmektedir (Şekil 8B).

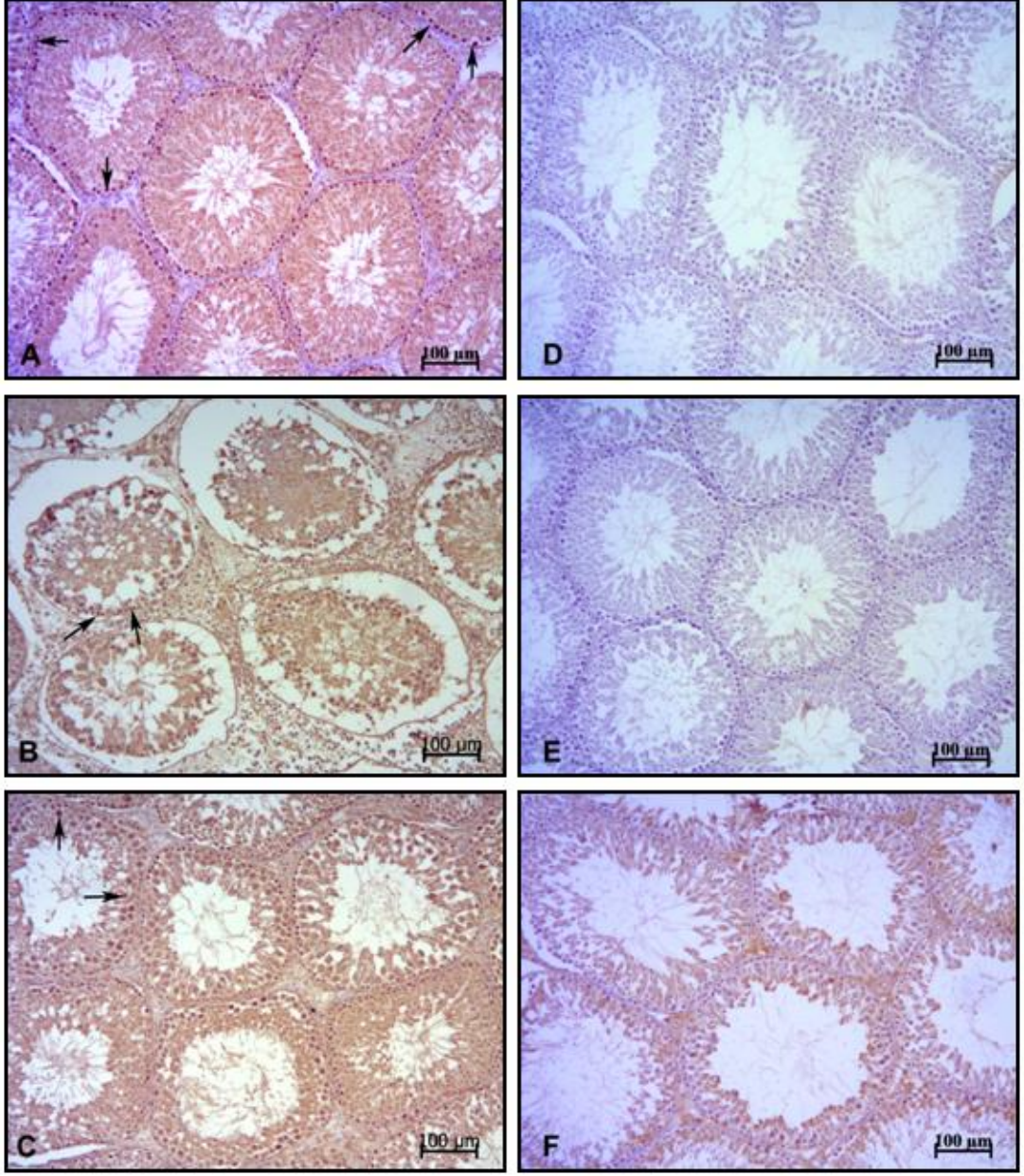
İNF+T/D grubundaki ipsilateral testis dokularında kaspaz-9 ile özellikle spermatoisitlerde kuvvetli; spermatogenetik seriye ait diğer hücrelerde de nispeten daha zayıf bir boyanma gözlenmiştir (Şekil 6C). Kaspaz-8 ile seminifer tübüldeki spermatogonyumlarda zayıf boyanma, spermatoisitlerde ve spermatidlerde kuvvetli boyanmalar gözlenmiştir (Şekil 7C). Kaspaz 3 ile spermatogenetik seriye ait hücrelerin hepsinde kuvvetli boyanmalar izlenmiştir(Şekil 8C).

Tüm gruplara ait kontralateral testis dokularında kaspazların sham grubuna benzer özellikte boyanmalar sergilediği gözlendi (D-E-F).



İpsilateral Testis

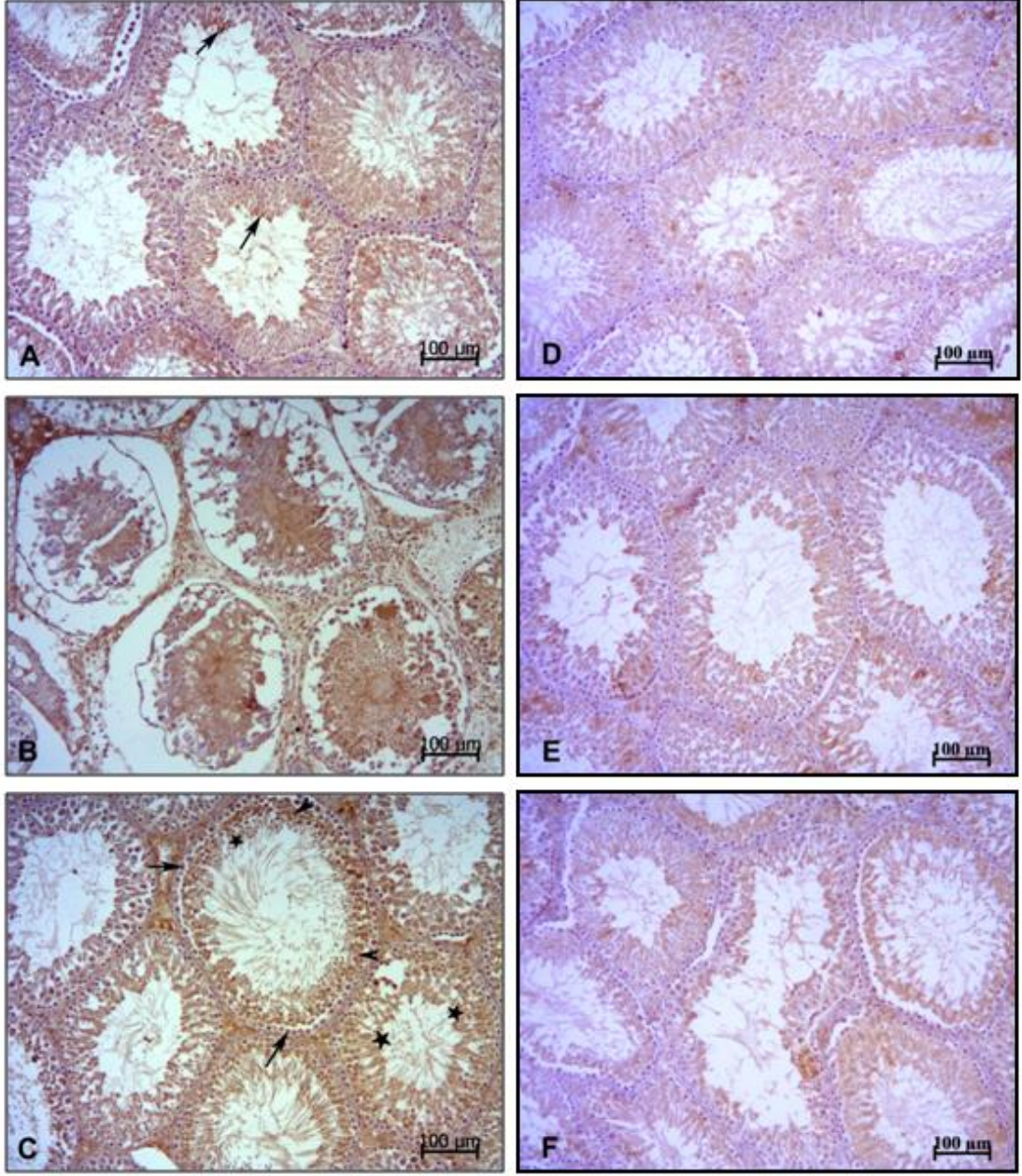
Kontralateral Testis



Şekil 6. Detorsiyonun 24. saati; Sham, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral (A-B-C) ve kontralateral (D-E-F) testislerde immunohistokimyasal kaspaz-9 boyaması. A. Sham grubunda özellikle spermatogonyumlarda (oklar) kuvvetli boyanma görülmektedir. Spermatogenetik seriye ait diğer hücrelerde de nispeten daha zayıf bir boyanma izlenmektedir. B. T/D grubunda dejenere seminifer tübülde spermatogonyumlar (oklar) dışında hücrelerde orta şiddette boyanma izlenmektedir. C. İNF+T/D grubunda özellikle spermatozoidlerde (oklar) kuvvetli boyanma görülmektedir. Spermatogenetik seriye ait diğer hücrelerde de nispeten daha zayıf bir boyanma gözlenmektedir. Kontralateral testislerde (D-E-F) nonspesifik boyanmalar dışında herhangi bir immünreaktivite izlenmemektedir.

İpsilateral Testis

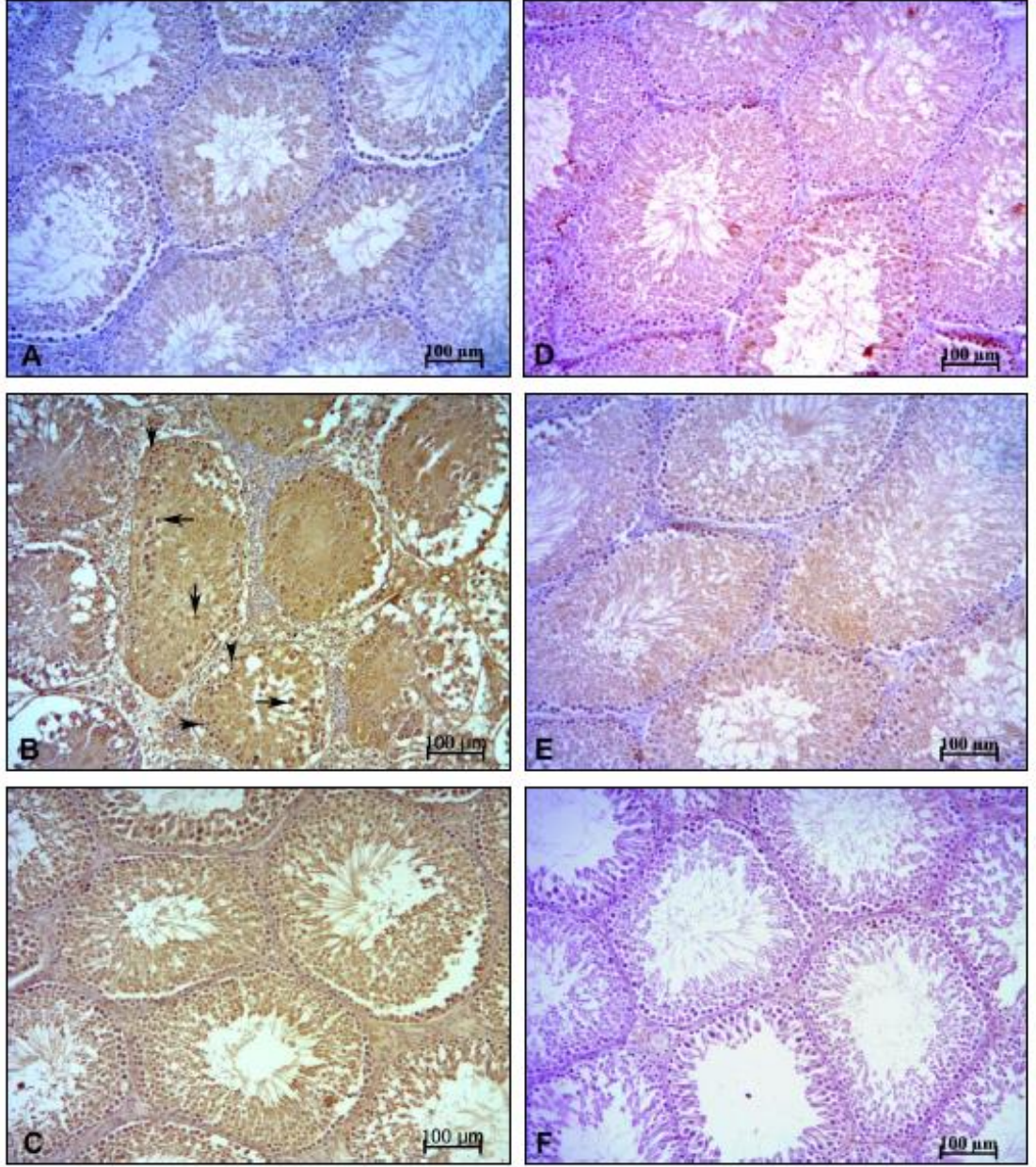
Kontralateral Testis



Şekil 7. Detorsiyonun 24. saati; Sham, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral (A,B,C) ve kontralateral (D-E-F) testislerde immunohistokimyasal kaspaz-8 boyaması. A. Sham grubunda seminifer tübülün lümene yakın kısmındaki spermatidlerde kuvvetli (oklar) boyanmalar izlenmektedir. B. T/D grubunda dejenere seminifer tübüllerde özellikle spermatositlerde (oklar) immün reaksiyon görülmektedir. C. İNF+T/D grubunda seminifer tübülde spermatogonyumlarda (oklar) zayıf boyanma gözlenirken, spermatositlerde (ok başı) ve spermatidlerde (yıldız) kuvvetli boyanma gözlenmektedir. Kontralateral testislerde (D-E-F) bazı bölümlerdeki çok zayıf nonspesifik boyanmalar dışında spesifik bir immün reaktivite izlenmemektedir.

İpsilateral Testis

Kontralateral Testis



Şekil 8. Detorsiyonun 24. saati; Sham, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral (A-B-C) ve kontralateral (D-E-F) testislerde immunohistokimyasal kaspaz-3 boyaması. A. Sham grubunda seminifer tübülün perifer kısmındaki spermatogonyumlarda, spermatositlerde ve lümene yakın yerleşimli spermatidlerin bazılarında çok zayıf bir immün reaktivite mevcuttur. B. T/D grubunda seminifer tübülün perifer kısmındaki dejenere olmuş spermatogonyumlarda herhangi bir reaksiyon gözlenmezken (ok başı), özellikle spermatositlerde (oklar) kuvvetli boyanma izlenmektedir. C. İNF+T/D grubunda spermatogenetik seriye ait hücrelerin hepsinde kuvvetli boyanma görülmektedir. Tüm gruplardaki kontralateral testislerin (D-E-F) sham grubuna benzer özellikte boyandığı görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada sıçanlara tek taraflı uygulanan testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) hasarında bir anti-TNF- α fare/insan kimerik IgG monoklonal antikoru olan infliksimabın, apoptotik yollar ile sperm miktarı üzerine etkileri araştırıldı. T/D grubunun testis ve kauda epididimlerinin ağırlıkları, sperm sayısı ve Johnsen skoru sham grubuna göre anlamlı düşük bulunurken; spermatogenik seriye ait hücrelerden özellikle spermatosit ve spermatitlerde, apoptozis belirteçleri olan kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'a ait belirgin immün boyanma gözlemlendi. İNF tedavisinin, T/D'ye bağlı testis ve kauda epidim ağırlıklarında, sperm sayısında ve Johnsen skorundaki azalmayı önlemediği ve spermatogenik hücrelerdeki kaspazlara ait immün boyanmanın şiddetini azaltmadığı gözlemlendi.

İNF, kimerik bir monoklonal antikor olup TNF- α 'ya bağlanır ve TNF- α 'nın etkilerini önler (81). TNF- α çok yönlü bir sitokindir. Fizyolojik pek çok rolü bulunmakla birlikte, miktarının yüksek seviyelere ulaşması sonucu patolojik etki gösterebilir. İnflamatuvar hastalıkların patogenezinde sıklıkla karşılaşılan TNF- α , reseptörü TNFR1 aracılığıyla apoptotik hücre ölümüne de neden olabilir (62). TNF- α 'nın üretimi inhibe edilerek veya antikorlarla nötralizasyonu sağlanarak etkileri önlenebilmektedir. Bir TNF- α antikoru olan İNF'in daha önce yapılan araştırmalar sonucunda bazı organların İ/R hasarında faydalı etkileri olduğu bildirilmiştir. DiPaola ve ark., çalışmalarında böbrek İ/R hasarında farelere 10 mg/kg dozda uygulanan İNF ön tedavisinin, TNF- α 'yı inhibe ederek hasarı önlediğini bildirmişlerdir (104). Akdoğan ve ark. sıçan karaciğer dokusunda İ/R sonrasında mukozada olumsuz etkiler, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve nekroz gibi histopatolojik hasarlar tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, sıçanlara karaciğer iskemisi öncesinde günde 3 mg/kg dozda ardışık 3 gün boyunca infliksimab uyguladıklarında ise TNF- α ekspresyonunda azalma, NF- κ B p65 ekspresyonunda artma, fibrozis belirteci olarak kullanılan laminin ekspresyonunda azalma gözlemleyerek, hasarın azaldığını bildirmişlerdir (92). Guzel ve ark. çalışmalarında sıçanlarda barsakta İ/R modeli oluşturularak sıçanlara intestinal İ/R'den 3 gün önce 3 mg/kg dozunda İNF uygulamışlar ve İ/R sonrası uzak organ akciğerin akut hasarında bu ilacın rolünü araştırmışlardır. İNF ön tedavisinin akciğer dokusundaki ödem, hemoraji, alveolar duvar kalınlaşması gibi morfolojik hasarı, inflamatuvar hücre sayısını ve iNOS

ekspresyonunu azalttığı; oksidatif stresle ilişkili enzim aktivitelerinde İ/R'yi iyileştirici yönde etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (95).

Literatürde yer alan böbrek, karaciğer gibi organlara uygulanan İ/R sonrası bu organlarda gözlenen hasarın ya da bağırsak İ/R sonrası akciğerde gözlenen uzak doku hasarının İNF tarafından azaltıldığını gösteren çalışmalara rağmen çalışmamızda İNF tedavisi T/D hasarını belirlemek için kullandığımız Johnsen skorlamasını anlamlı olarak etkilemiştir. Johnsen skorlamasına göre, skorun yüksekliği hasarın az olduğunu, skorun düşüklüğü hasarın çok olduğunu göstermektedir (103). Çalışmamızda, T/D işlemi uygulanan ipsilateral testislerde, önceki çalışmalara benzer şekilde Johnsen skorunda düşme olduğu belirlendi. İNF ile tedavi edilen T/D grubundaki dokulara ait Johnsen skoru, T/D grubuna göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farklı bulunmadı. T/D işleminin sham grubuna kıyasla interstisyel bağ dokusunda peritübüler hiyalinizasyon ve yoğunluk artışı, seminifer tübüllerde yer alan hücrelerde disorganizasyon ile birlikte vakuolizasyon ve spermatogonya matürasyonunda belirgin azalma gibi dokuda önemli hasarlara yol açtığı histolojik olarak tespit edildi. İNF ile tedavi edilen T/D grubundaki histolojik değişiklikler de T/D grubuna benzer bulundu; ancak daha az yoğunlukta gözlemlendi. İNF ile tedavi edilen grupta interstisyel bağ dokusunun normal yapıda olduğu ve tübüllerin bir kısmının korunduğu gözlemlendi. Çalışmamızda yer alan bütün grupların kontralateral testislerinde ise normal morfolojik yapı izlendi. Bu sonuçlara göre, tek taraflı uygulanan T/D, ipsilateral testislerde hasar oluştururken; kontralateral testislerde hasar meydana getirmedi ve İNF tedavisinin ipsilateral testislerdeki histolojik hasarı anlamlı bir şekilde azaltmadığı tespit edildi.

Torsiyonun süresi ve derecesi testisteki hasar derecesini belirleyen iki önemli etkidir (105). Torsiyona uğrayan testisi bu iskemik durumdan kurtarmak için acil yapılan manuel veya cerrahi detorsiyon işlemi ile reperfüzyon sağlanmakla birlikte, bu işlem de testiste ek bir hasar oluşturmaktadır. Baker ve Turner, 1 saatlik iskemi ve 720⁰'lik torsiyon ve reperfüzyon sonrasında spermatogenezde kalıcı kayıp yaşanabileceğini bildirmişlerdir (106). Spermatogenezdeki bu kaybın, germ hücre apoptozisi ile olduğu düşünülmektedir (53, 107). Yurtçu ve ark. çalışmalarında testiküler T/D sonrasında detorsiyonun 6. saatinde Sertoli hücreleri ve spermatogenezin yeterliliği açısından önemli bir yeri olan serum inhibin düzeylerinin azaldığını gözlemlemişlerdir (108). Hekimoğlu ve ark. çalışmalarında reperfüzyondan 30 gün sonra sperm sayısında ve motilitesinde azalma ile anormal

sperm oranında artma olduğunu tespit etmişlerdir (26). Çalışmamızda detorsiyonun 65. gününde çıkarılan kauda epididimlerde sperm miktarını değerlendirdiğimizde; T/D uygulanan ipsilateral kauda epididimlerde sperm miktarının sham grubuna ve kontralateral kauda epididimlere göre düşük olduğu bulundu. İNF ile tedavi edilen T/D grubundaki ipsilateral kauda epididimlerdeki sperm miktarının sham grubuna ve kontralateral kauda epididimlere göre düşük olduğu görülürken; T/D grubu ile karşılaştırıldığında sperm miktarı açısından aralarında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmadı. Bu sonuçlara göre, tek taraflı uygulanan T/D, ipsilateral kauda epididimlerde sperm sayısını azaltırken; kontralateral kauda epididimleri etkilemedi ve İNF tedavisi sperm sayısını artırmadı.

T/D sonrası, testiste atrofi geliştiği deneysel çalışmalar ve insanlardaki klinik gözlemler ile bildirilmektedir (20-21, 23). Testiste gelişen atrofi deneysel çalışmalarda testis ağırlığı ölçülerek kolayca gösterilebilir. Spermatogenezis açısından spermlerin niteliği ve niceliğine ek olarak testis ağırlığındaki değişimler de önemlidir ve testiküler T/D sonrasında testis ağırlıklarında azalma yönünde bir değişiklik olduğu da önceki yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (28, 109). Çalışmamızda detorsiyonun 24. saatinde ve 65. gününde testis ve kauda epididim ağırlıkları değerlendirilmiştir. Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan doku ağırlıkları karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Detorsiyonun 65. gününde çıkarılan doku ağırlıkları incelendiğinde ise, T/D işlemi uygulanan grupta doku ağırlıklarında sham grubuna ve kontralateral tarafa göre azalma olduğu; ancak İNF tedavisinin bu azalmayı önlemediği belirlenmiştir. Detorsiyonun 24. saati ve 65. gününde çıkarılan kontralateral taraftaki testis ve kauda epididim ağırlıklarında sham grubundan farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, literatürde bildirildiği üzere testiküler İ/R sonrası apoptotik hücre ölümünde görülen artışa bağlı olarak testiküler dokuda atrofi meydana gelmesini desteklemektedir (107, 110). T/D sonrasında germ hücre apoptozisinde artış olduğu özellikle son yıllarda yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur (27, 111-112). Bu durumun germ hücre ölümünden ve spermatogenezdeki kayıptan sorumlu olduğu düşünülmektedir (53, 107).

Apoptotik hücre ölümü aynı zamanda spermatogenezin başlangıcında yoğun bir şekilde gerçekleşen fizyolojik bir süreçtir (52). Spermatogonyumlar, spermatogenetik serinin ilk hücreleridir. Spermatogenezis esnasında bu hücrelerin bir kısmı kaynak hücre olarak kalır; bir kısmı ise seminifer tübülün bazal membranından lümenine doğru hareket ederler ve mitoz bölünme sonucu primer spermatositleri meydana getirirler (113). Sertoli hücreleri, germ hücrelerinin gelişmesi için besin ve

mekanik destek sağlayan, zararlı maddelerin kan-testis bariyerinden geçişini engelleyen hücrelerdir (114). Sertoli hücreleri ile germ hücre sayısının oranında bir denge kurulması olayı açısından spontan apoptozis önemlidir, bu evrede spermatogonyum hücreleri Sertoli hücrelerinin destekleyebileceğinden fazla sayıda olduğu için elimine edilmektedir (111).

Apoptotik hücre ölümüne giden bu sürecin mitokondriyel (intrensek) yolak aracılığıyla olabileceği gibi ölüm reseptörü kaynaklı (ekstresek) yolak aracılığıyla da gerçekleşebileceği bildirilmektedir (107). Bizim çalışmamızda T/D sonrası apoptotik süreci değerlendirebilmek için kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9 aktivitesi immünohistokimyasal yöntemle boyanarak değerlendirildi. Kaspazlar, apoptozisi başlatan ve devamını sağlayan enzim ailesidir. Kaspaz-9 mitokondriyel yolağın, kaspaz-8 ise ölüm reseptörü kaynaklı yolağın başlatıcı kaspazlarıdır. Kaspaz-3 ise başlıca uygulayıcı kaspazdır; hem kaspaz-9 hem kaspaz-8 tarafından uyarılabilmekte ve apoptozisin devamını sağlamaktadır (36). Daha önce yapılan çalışmalarda İ/R'yi takip eden saatler içinde apoptoziste artış olduğu, 24. saatte ise maksimum seviyeye eriştiği bildirilmiştir (55). Çalışmamızda detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokuları incelendiğinde; sham grubunda özellikle kaspaz-9 ile spermatogonyumlarda, kaspaz-8 ile spermatidlerde immün boyanmanın fazla olduğu, uygulayıcı kaspaz olan kaspaz 3'ün spermatosit ve spermatidlerde az bir immün boyanmaya neden olduğu; T/D grubunda spermatogonyumlarda immün boyanma gözlenmezken, kaspaz-8'de daha fazla olmak üzere kaspaz-9 da dahil spermatosit ve spermatidlerde yoğun bir boyanma gözlendiği, aynı zamanda kaspaz-3 ile de spermatositlerde yoğun boyanmanın devam ettiği; İNF+T/D grubunda ise spermatosit ve spermatidlerde kaspaz-9, 8 ve 3 ile yoğun boyanmaların olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlardan hareketle; sham grubundaki boyanmalar fizyolojik apoptozisi gösterirken; T/D uygulaması sonrası apoptotik boyanmanın spermatogonyumlardan ziyade spermatosit ve spermatidlerde daha belirgin olduğu ve uygulayıcı kaspaz olan kaspaz-3'ün de aktive olduğu; TNF- α inhibitörü İNF'nin T/D uygulaması ile gözlenen immün reaktiviteleri değiştirmedeğini, hatta artırdığını söyleyebiliriz.

TNF- α , TNFR1 reseptörü aracılığıyla apoptotik hücre ölümünü aktive edebildiği gibi ayrıca, NF- κ B ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerini aktive ederek hücrenin sağ kalımına da aracılık edebilir. Suominen ve ark. tarafından TNF- α 'nın sıçanların seminifer epitelinde, hücrenin sağ kalımını destekleyici yönde etki

gösterdiği ve bu etkinin İNF tarafından önlendiği bildirilmiştir (115). Bu duruma, apoptozisi engelleyen Bcl-xL'nin TNF- α tarafından mitokondri membranında up-regüle edilmesi; İNF'nin ise bu up-regülasyonu inhibe etmesinin neden olduğu düşünülmektedir. Pentikainen ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada da insan testis dokularında TNF- α 'nın Fas ligand'ı down regüle ettiğini ve germ hücre apoptozisini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (116). Bizim çalışmamızda da İNF ile gerçekleştirilen TNF- α inhibisyonu sonucu kaspazlardaki immün boyanmanın görülmeye devam etmesi hatta artması, testiküler T/D olayında TNF- α 'nın apoptozis-sağ kalım ikileminde, etkisinin daha çok sağkalım yönünde gerçekleşmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Testiküler İ/R sonrasında, germ hücre apoptozisine birden çok etmen yol açabilmektedir. Bunlardan biri reaktif oksijen ürünleridir ve çeşitli antioksidanlar kullanılarak yapılan çalışmalarda İ/R nedeniyle ortaya çıkan histopatolojik hasarın düzeldiğini ve germ hücre apoptozisinde azalma sağlandığı bildirilmiştir (56, 117). Lysiak ve ark. çalışmalarında oksidatif stres ürünlerinin İ/R sonrasında mitokondriyel kaspaz-9 bağımlı yolak aracılığıyla apoptozu indüklediğini göstermiştir (28). T/D sonrasında inflamasyon mediyatörü olarak rol oynayan ve germ hücrelerinin apoptozisine neden olan mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) ailesi testiküler İ/R patogeneziyle ilişkili bir diğer etmendirdir (27). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda İNF tedavisinin apoptotik süreci baskılamamış olmasının bir diğer nedeni de apoptotik süreçte TNF- α 'nın tek başına rol oynamaması olabilir. Her ne kadar diğer organların İ/R hasarında TNF- α patolojide sorumlu tutulsa ve İNF ile nötralizasyonu koruyucu etkiler sergilese de, bizim çalışmamızda testis T/D hasarında İNF ile benzer bir koruyucu etki gözlenmemiştir.

Sonuç olarak, deneysel olarak oluşturulan testiküler İ/R modelinde, TNF- α inhibitörü İNF tedavisinin T/D'ye bağlı testis ve kauda epididim ağırlıkları ve sperm sayısındaki azalmayı önlemediği ve histopatolojik hasar üzerinde olumlu etkiler yapmadığı ve spermatogenik hücrelerdeki kaspazlara ait immün boyanmanın şiddetini azaltmadığı gözlenmiştir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda sıçanların sağ testislerinin spermatik kordunun saat yönünde 720⁰ derece döndürülmesi ile 3 saatlik torsiyon ve sonrasında detorsiyon işlemi gerçekleştirilerek oluşturulan T/D hasarında İNF'nin etkileri araştırıldı. Bu amaçla tedavi grubuna İNF detorsiyondan 10 dak önce 5 mg/kg dozda i.p. yoldan verildi. Detorsiyonun 24. saatinde ve 65. gününde ipsilateral ve kontralateral testisler ve kauda epididimler çıkarılıp tartıldı. Detorsiyonun 65. gününde çıkarılan kauda epididimlerde sperm sayımı yapıldı. Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testislerde histopatolojik incelemeler yapıldı. Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan testis doku örneklerinde immünohistokimyasal boyama yöntemi ile kaspaz- 3, 8 ve 9 aktivitesi değerlendirildi.

- Testis ve kauda epididim ağırlıkları değerlendirildiğinde; detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral tarafa ait dokularda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Detorsiyonun 65. gününde çıkarılan dokularda, ipsilateral tarafta T/D ve İNF+T/D gruplarının ağırlık ortalamalarının sham grubuna kıyasla daha az olduğu belirlenmiştir. İNF+T/D grubu ile T/D grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- Sperm miktarı değerlendirildiğinde; ipsilateral taraftaki T/D ve İNF+T/D gruplarının sperm miktarları sham grubuna göre düşük bulunmuştur. İNF+T/D grubu ile T/D grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.
- Histopatolojik değerlendirmede; T/D uygulamasının dokuda histolojik hasara neden olduğu; İNF+T/D grubunda da T/D grubuna benzer histolojik değişikliklerin görüldüğü; ancak daha az yoğunlukta olduğu belirlenmiştir.
- Apoptosis belirteçleri olan kaspaz aktiviteleri değerlendirildiğinde; T/D işleminin kaspaz-3, 8 ve 9 ile immün boyanmada belirgin olarak artmaya neden olduğu; ancak İNF tedavisinin immün boyanmanın şiddetini azaltmadığı gözlenmiştir.
- Kontralateral testisler, oluşturduğumuz T/D hasarından etkilenmemiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. *Am Fam Physician* 74(10): 1739–1743, 2006.
2. Akgür FM, Kiliç K, Aktuğ T. Reperfusion injury after detorsiyon of unilateral testicular torsion. *Urol Res* 21(6): 395-399, 1993.
3. Dokmeci D. Testicular torsion, oxidative stress and the role of antioxidant therapy. *Folia Med (Plovdiv)* 48(3-4): 16-21, 2006.
4. Kurcer Z, Hekimoglu A, Aral F, Baba F, Sahna E. Effect of melatonin on epididymal sperm quality after testicular ischemia/reperfusion in rats. *Fertil Steril* 93(5): 1545-9, 2010.
5. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, Baba F, Aksoy N, Celik N. Effect of melatonin on testicular ischemia/reperfusion injury in rats: Is this effect related to the proinflammatory cytokines? *Fertil Steril* 89(5 Suppl): 1468-73, 2008.
6. Akgür FM, Kiliç K, Tanyel FC, Büyükpamukçu N, Hiçsönmez A. Ipsilateral and contralateral testicular biochemical acute changes after unilateral testicular torsion and detorsion. *Urology* 44(3): 413-418, 1994.
7. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: Role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(4): G583-9, 2006.
8. Minutoli L, Antonuccio P, Romeo C, Nicòtina PA, Bitto A, Arena S, Polito F, Altavilla D, Turiaco N, Cutrupi A, Zuccarello B, Squadrito F. Evidence for a role of mitogen-activated protein kinase 3/mitogenactivated protein kinase in the development of testicular ischemia-reperfusion injury. *Biol Reprod* 73(4): 730-6, 2005.
9. Lysiak JJ, Nguyen QAT, Kirby JL, Turner TT. Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and activation of c-jun N-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biol Reprod* 69(1): 202-10, 2003.

10. Mahmoud MF, El Shazly SM, Barakat W. Inhibition of TNF- α protects against hepatic ischemia- reperfusion injury in rats via NF- κ B dependent pathway. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 385(5): 465-71, 2012.
11. Yang YL, Li JP, Xu XP, Dou KF, Yue SQ, Li KZ. Protective effects of tumor necrosis factor alpha antibody and ulinastatin on liver ischemic reperfusion in rats. *World J Gastroenterol* 10(21): 3161–3164, 2004.
12. Atzeni F, Doria A, Carrabba M, Turiel M, Sarzi-Puttini P Potential target of infliximab in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmun Rev* 6(8): 529-36, 2007.
13. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, Furst D, Kalden J, Weisman M, Smolen J, Emery P, Harriman G, Feldmann M, Lipsky P. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: A randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. *Lancet* 354(9194): 1932-9, 1999.
14. Tasdemir C, Tasdemir S, Vardi N, Ates B, Parlakpınar H, Kati B, Karaaslan MG, Acet A. Protective effect of infliximab on ischemia/reperfusion-induced damage in rat kidney. *Ren Fail* 34(9): 1144-9, 2012.
15. Pergel A, Kanter M, Yucel AF, Aydin I, Erboğa M, Guzel A. Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion injury. *Toxicol Ind Health* 28(10): 923-32, 2012.
16. Guven C, Borcek AO, Cemil B, Kurt G, Yildirim Z, Ucanus NL, Kilic N, Ceviker N. Neuroprotective effects of infliximab in experimental spinal cord ischemic injury. *J Clin Neurosci* 17(12): 1563-7, 2010.
17. Niemann JT, Rosborough JP, Youngquist S, Shah AP, Lewis RJ, Phan QT, Filler SG. Cardiac function and the proinflammatory cytokine response after recovery from cardiac arrest in swine. *J Interferon Cytokine Res* 29(11): 749-58, 2009.
18. Watters O, Pickering M, O'Connor JJ. Preconditioning effects of tumor necrosis factor- α and glutamate on calcium dynamics in rat organotypic hippocampal cultures. *J Neuroimmunol* 234(1-2): 27-39, 2011.
19. Pentylala S, Lee J, Yalamanchili P, Vitkun S, Khan SA. Testicular torsion: A review. *J Low Genit Tract Dis* 5(1): 38-47, 2001.

20. Kapoor S. Testicular torsion: A race against time. *Int J Clin Pract* 62(5): 821-7, 2008.
21. Cuckow PM, Frank JD. Torsion of testis. *BJU Int* 86: 349-53, 2000.
22. Lievano G, Nguyen L, Radhakrishnan J, Fornell L, John E. New animal model to evaluate testicular blood flow during testicular torsion. *J Pediatr Surg* 34(6): 1004-6, 1999.
23. Pakyz RE, Heindel RM, Kallish M, Cosentino MJ. Spermatic cord torsion: Effects of cyclosporine and prednisone on fertility and the contralateral testis in the rat. *J Androl* 11(5): 401-8, 1990.
24. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190(3):255-66, 2000.
25. Powell JD, Elshtein R, Forest DJ, Palladino MA. Stimulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha) protein in the adult rat testis following ischemic injury occurs without an increase in HIF-1alpha messenger RNA expression. *Biol Reprod* 67(3):995-1002, 2002.
26. Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Sahna E, Atessahin A. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion rats. *Tohoku J Exp Med* 218: 141-147, 2009.
27. Minutoli L, Antonuccio P, Polito F, Bitto A, Squadrito F, Di Stefano V, Nicotina PA, Fazzari C, Maisano D, Romeo C, Altavilla D. Mitogen-activated protein kinase 3/mitogen-activated protein kinase 1 activates apoptosis during testicular ischemia-reperfusion injury in a nuclear factor-kappaB-independent manner. *Eur J Pharmacol* 604(1-3): 27-35, 2009.
28. Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QAT, Singbartl K, Ley K, Turner TT. Essential role of neutrophils in germ cell-specific apoptosis following ischemia/reperfusion of the mouse testis. *Biol Reprod* 65:718-725, 2001.
29. Al-Maghrebi M, Kehinde EO, Anim JT. Long term testicular ischemia-reperfusion injury-induced apoptosis: Involvement of survivin down-regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 395(3): 342-7, 2010.
30. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4): 239-57, 1972.

31. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu* 17 Pt 2: 229-59, 1982.
32. Norbury CJ, Hickson JD. Cellular responses to DNA damage *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 367-401, 2001.
33. Aksit H, Bildik A. Apoptozis. *YYÜ Vet Fak Derg* 19(1): 55-63, 2008.
34. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306, 1980.
35. Denecker G, Vercammen D, Steemans M, Vanden Berghe T, Brouckaert G, Van Loo G, Zhivotovsky B, Fiers W, Grooten J, Declercq W, Vandenaabeele P. Death receptor-induced apoptotic and necrotic cell death: Differential role of caspases and mitochondria. *Cell Death Differ* 8(8): 829-40, 2001.
36. Reed JC Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157(5):1415-30, 2000.
37. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem Sci* 26(1): 61-6, 2001.
38. Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J. Granzim A induces caspase- independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22(3): 355-70, 2005.
39. Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 326(1): 1–16, 1997.
40. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells* 3(11): 697-707, 1998.
41. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: Anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 5(22): 2592-601, 2006.
42. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Stem Cells* 17(5): 306-13, PMID:10527465, 1999.
43. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267(5203): 1456-62, 1995.
44. Suda T, Nagata S. Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis. *J Exp Med* 179(3): 873-9, 1994.

45. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 72(1): 65-83, 1992. .
46. Paller MS. The cell biology of reperfusion injury in the kidney. *J Invest Med* 42(4): 632-9, 1994.
47. Shibasaki F, McKeon F. Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* 131(3): 735-43, 1995.
48. Jeremias I, Kupatt C, Martin-Villalba A, Habazettl H, Schenkel J, Boekstegers P, Debatin KM. Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia. *Circulation* 102(8): 915-20, 2000.
49. Chen HH, Chen TW, Lin H. Prostacyclin-induced peroxisome proliferator-activated receptor- α translocation attenuates NF-kappaB and TNF- α activation after renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 297(4): F1109-18, 2009.
50. Yang Q, Zheng FP, Zhan YS, Tao J, Tan SW, Liu HL, Wu B. Tumor necrosis factor- α mediates JNK activation response to intestinal ischemia-reperfusion injury. *World J Gastroenterol* 19(30): 4925-34, 2013.
51. Eum HA, Cha YN, Lee SM. Necrosis and apoptosis: Sequence of liver damage following reperfusion after 60 min ischemia in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 358(2): 500-5, 2007.
52. Tripathia R, Mishrab DP, Shahaa C. Male germ cell development: Turning on the apoptotic pathways. *Journal of Reproductive Immunology* 83: 31–35, 2009.
53. Turner TT, Tung KS, Tomomasa H, Wilson LW. Acute testicular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. *Biol Reprod* 57(6): 1267-74, 1997.
54. Aydos TR, Başar MM, Kul O, Atmaca HT, Uzunalıoğlu T, Kisa U, Efe OE. Effects of ozone therapy and taurine on ischemia/reperfusion-induced testicular injury in a rat testicular torsion model. *Turk J Med Sci* 44(5): 749-55, 2014.
55. Sun J, Ying M, Li H, Shang X, He Y, Chen K, Zhou R. Role of UCH/L1 ubiquitin in acute ischemia-reperfusion injury. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 366: 539-544, 2008.

56. Kanter M. Protective effects of Ginkgo biloba (EGb 761) on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Exp Mol Pathol* 91(3): 708-13, 2011.
57. Lysiak JJ, Zheng S, Woodson R, Turner TT. Caspase-9-dependent pathway to murine germ cell apoptosis: Mediation by oxidative stress, BAX, and caspase 2 *Cell Tissue Res* 328: 411–419, 2007.
58. Koji T, Hishikawa Y, Ando H, Nakanishi Y, Kobayashi N. Expression of Fas and Fas Ligand in Normal and Ischemia-Reperfusion Testes: Involvement of the Fas System in the Induction of Germ Cell Apoptosis in the Damaged Mouse Testis. *Biology of Reproduction* 64: 946–954, 2001.
59. Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, Na KR, Shin YT, Lee KW. Pretreatment with the tumor necrosis factor- α blocker etanercept attenuated ischemia-reperfusion renal injury. *Transplantation Proceedings* 41: 3590–3596, 2009.
60. Savitz SI, Erhardt JA, Anthony JV, Gupta G, Li X, Barone FC, Rosenbaum DM. The novel beta-blocker, carvedilol, provides neuroprotection in transient focal stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 20(8): 1197-204, 2000.
61. Theas MS, Rival C, Jarazo-Dietrich S, Jacobo P, Guazzone VA, Lustig L. Tumour necrosis factor-alpha released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. *Human Reproduction* 23(8): 1865–1872, 2008.
62. Suescun MO, Rival C, Theas MS, Calandra RS, Lustig L. Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol Reprod* 68(6): 2114-21, 2003.
63. Rodriguez MG, Rival C, Theas MS, Lustig L. Immunohistopathology of the contralateral testis of rats undergoing experimental torsion of the spermatic cord. *Asian J Androl* 8(5): 576–583, 2006.
64. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117(2): 244-79, 2008.
65. Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett* 285(2): 199-212, 1991.

66. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10(1): 45-65, 2003.
67. Lysiak JJ. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2: 1-9, 2004.
68. Camussi G, Albano E, Tetta C, Bussolino F. The molecular action of tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Biochem* 202(1): 3-14, 1991.
69. Sethu S, Melendez AJ. New developments on the TNF α -mediated signalling pathways. *Biosci Rep* 31(1): 63-76, 2011.
70. Schottelius AJ, Moldawer LL, Dinarello CA, Asadullah K, Sterry W, Edwards CK 3rd. Biology of tumor necrosis factor-alpha- implications for psoriasis. *Exp Dermatol* 13(4): 193-222, 2004.
71. Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF, Cerami A. Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 beta and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 170: 1627-1633, 1989.
72. Mackay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *J Exp Med* 177(5): 1277-86, 1993.
73. Berthold-Losleben M, Himmerich H. The TNF α System: Functional Aspects in Depression, Narcolepsy and Psychopharmacology. *Current Neuropharmacology* 6: 193-202, 2008.
74. Naylor MS, Stamp G, Foulkes WD, Eccles D, Balkwill FR. Tumor Necrosis Factor and Its Receptors in Human Ovarian Cancer Potential Role in Disease Progression. *J Clin Invest* 91: 2194-2206, 1993.
75. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(9): 3666-70, 1975.
76. Ihnatko R, Kubes M. TNF signaling: Early events and phosphorylation. *Gen Physiol Biophys* 26(3): 159-67, 2007.

77. Willrich MA, Murray DL, Snyder MR. Tumor necrosis factor inhibitors: Clinical utility in autoimmune diseases. *Transl Res* 165(2): 270-282, 2014.
78. Üstünes L (2017). RxMediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. Sürüm 17.0.12, İzmir.
79. Sánchez-Cano D, Callejas-Rubio JL, Ruiz-Villaverde R, Ríos-Fernández R, Ortego-Centeno N. Off-label uses of anti-TNF therapy in three frequent disorders: Behçet's disease, sarcoidosis, and noninfectious uveitis. *Mediators Inflamm* doi: 10.1155/2013/286857, 2013.
80. Matera MG, Calzetta L, Cazzola M. TNF-alpha inhibitors in asthma and COPD: We must not throw the baby out with the bath water. *Pulm Pharmacol Ther* 23(2): 121-8, 2010.
81. Harriman G, Harper LK, Schaible TF. Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNFalpha treatment. *Ann Rheum Dis* 58 Suppl 1: I61-4, 1999.
82. Sfikakis PP, Markomichelakis N, Alpsoy E, Assaad-Khalil S, Bodaghi B, Gul A, Ohno S, Pipitone N, Schirmer M, Stanford M, Wechsler B, Zouboulis C, Kaklamanis P, Yazici H. Anti-TNF therapy in the management of Behcet's disease--review and basis for recommendations. *Rheumatology (Oxford)* 46(5): 736-41, 2007.
83. Dotan I, Ron Y, Yanai H, Becker S, Fishman S, Yahav L, Ben Yehoyada M, Mould DR. Patient factors that increase infliximab clearance and shorten half-life in inflammatory bowel disease: A population pharmacokinetic study. *Inflamm Bowel Dis* 20(12): 2247-59, 2014.
84. Klotz U, Teml A, Schwab M. Clinical pharmacokinetics and use of infliximab. *Clin Pharmacokinet* 46(8): 645-60, 2007.
85. Ma X, Xu S. TNF inhibitor therapy for rheumatoid arthritis. *Biomed Rep* 1(2): 177-184, 2013.
86. Hamzaoglu H, Cooper J, Alsahli M, Falchuk KR, Peppercorn MA, Farrell RJ. Safety of infliximab in Crohn's disease: A large single-center experience. *Inflamm Bowel Dis* 16(12): 2109-16, 2010.

87. Zhou H. Clinical pharmacokinetics of etanercept: A fully humanized soluble recombinant tumor necrosis factor receptor fusion protein. *J Clin Pharmacol* 45(5): 490-7, 2005.
88. Balevic SJ, Rabinovich CE. Profile of adalimumab and its potential in the treatment of uveitis. *Drug Des Devel Ther* 10: 2997-3003, 2016.
89. Neri P, Zucchi M, Allegri P, Lettieri M, Mariotti C, Giovannini A. Adalimumab (Humira™): A promising monoclonal anti-tumor necrosis factor alpha in ophthalmology. *Int Ophthalmol* 31(2): 165-73, 2011.
90. Keser G. Sertolizumab pegolün moleküler yapısı ve etki mekanizması. *RAED Dergisi*. 7(Suppl 1): S8–S13, 2015.
91. Cure E, Cumhuri Cure M, Tumkaya L, Kalkan Y, Aydın I, Kirbas A, Yilmaz A, Yuce S, Yücel AF. Adalimumab ameliorates abdominal aorta cross clamping which induced liver injury in rats *Biomed Res Int* Volume Article ID 907915, 2014.
92. Akdogan RA, Kalkan Y, Tümkaya L, Rakici H, Akdogan E. The Effects of Infliximab on Laminin, NFκB, and Anti-TNF Expression through Its Effect on Ischemic Liver Tissue. *Gastroenterol Res Pract* Volume Article ID 1738430, 2016.
93. Nagata Y, Fujimoto M, Nakamura K, Isoyama N, Matsumura M, Fujikawa K, Uchiyama K, Takaki E, Takii R, Nakai A, Matsuyama H. Anti-TNF-α Agent Infliximab and Splenectomy Are Protective Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation* 100(8): 1675-82, 2016.
94. Yucel AF, Pergel A, Aydın I, Alacam H, Karabacak I, Kesicioglu T, Tumkaya L, Kalkan Y, Ozer E, Arslan Z, Sehitoglu I, Sahin DA. Effect of infliximab on acute hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Int J Clin Exp Med* 8(11): 21287-94, 2015.
95. Guzel A, Kanter M, Guzel A, Pergel A, Erbogga M. Anti-inflammatory and antioxidant effects of infliximab on acute lung injury in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion. *J Mol Histol* 43(3): 361-9, 2012.
96. Ersoy B, Çevik Ö, Çilingir ÖT. Etanercept protects myocutaneous flaps from ischaemia reperfusion injury: An experimental study in a rat tram flap model. *J Plast Surg Hand Surg* 50(4): 208-15, 2016.

97. Pei H, Song X, Peng C, Tan Y, Li Y, Li X, Ma S, Wang Q, Huang R, Yang D, Li D, Gao E, Yang Y. TNF- α inhibitor protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Notch1-mediated suppression of oxidative/nitrative stress. *Free Radic Biol Med* 82: 114-21, 2015.
98. Kilicoglu B, Kilicoglu SS, Tuncal S, Onalan AK, Celepli S, Tasova V, Namuslu M, Erdemli E. Ultrastructural view of a promising anti TNF- α agent on hepatic ischaemia reperfusion injury. *Bratisl Lek Listy* 116(10): 601-7, 2015.
99. Iwata N, Takayama H, Xuan M, Kamiuchi S, Matsuzaki H, Okazaki M, Hibino Y. Effects of Etanercept against Transient Cerebral Ischemia in Diabetic Rats. *Biomed Res Int* Volume Article ID 189292, 2015.
100. Cure MC, Cure E, Kalkan Y, Tumkaya L, Aydin I, Kirbas A, Efe H, Kurt A, Yuce S. The Protective Effect of Adalimumab on Renal Injury in a Model of Abdominal Aorta Cross-Clamping. *Adv Clin Exp Med* 25(2): 219-26, 2016.
101. Kurt A, Tumkaya L, Kalkan Y, Turut H, Cure MC, Cure E, Sehitoglu I, Bilgin H, Usta M. Is adalimumab protective in ischemia-reperfusion injury in lung? *Iran J Basic Med Sci* 18(11): 1093-9, 2015.
102. Yokoi K, Uthus EO, Nielsen FH. Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats. *Biol Trace Elem Res* 93(1-3): 141-54, 2003.
103. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1(1): 2-25, 1970.
104. Di Paola R, Genovese T, Impellizzeri D, Ahmad A, Cuzzocrea S, Esposito E. The renal injury and inflammation caused by ischemia-reperfusion are reduced by genetic inhibition of TNF- α R1: A comparison with infliximab treatment. *Eur J Pharmacol* Jan 30; 700(1-3): 134-46, 2013.
105. Williamson RNC. The continuing conundrum of testicular torsion. *Br JSurg* 72: 509-510, 1985.
106. Baker LA, Turner TT. Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *J Androl* Jan-Feb; 16(1): 12-7, 1995.
107. Lysiak JJ, Turner SD, Turner TT. Molecular pathway of germ cell apoptosis following ischemia/reperfusion of the rat testis. *Biol Reprod* 63: 1475-1482, 2000.

108. Yurtçu M, Abasiyanik A, Avunduk MC, Muhtaroglu S. Effects of melatonin on spermatogenesis and testicular ischemia-reperfusion injury after unilateral testicular torsion-detorsion. *J Pediatr Surg* 43(10): 1873-8, 2008.
109. Wei SM, Yan ZZ, Zhou J. Beneficial effect of taurine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology* 70(6): 1237-42, 2007.
110. Zhang Y, Lv Y, Liu YJ, Yang C, Hu HJ, Meng XE, Li MX, Pan SY. Hyperbaric oxygen therapy in rats attenuates ischemia-reperfusion testicular injury through blockade of oxidative stress, suppression of inflammation and reduction of nitric oxide formation. *Urology* 82(2): 489.e9-489, 2013.
111. Karagüzel E, Kutlu Ö, Yuluğ E, Mungan S, Kazaz İO, Tok DS, Özgür GK. Comparison of the protective effect of dipyridamole and acetylsalicylic acid on long-term histologic damage in a rat model of testicular ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* Sep 47(9): 1716-23, 2012.
112. Yapanoglu T, Aksoy Y, Gursan N, Ozbey I, Ziypak T, Calik M. Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia* 40(1): 38-43, 2008.
113. Sinha-Hikim AP, Lue Y, Diaz-Romero M, Yen PH, Wang C, Swerdloff RS. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(2-5): 175-82, 2003.
114. Wong CH, Cheng CY. Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: A review of recent data. *Dev Biol* Oct 1; 286(1): 1-15, 2005.
115. Suominen JS, Wang Y, Kaipia A, Toppari J. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promotes cell survival during spermatogenesis, and this effect can be blocked by infliximab, a TNF-alpha antagonist. *Eur J Endocrinol* 151(5): 629-40, 2004.
116. Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Ojala M, Pentikainen MO, Parvinen M & Dunkel L. TNF alpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 86 4480-4488, 2001.

117. Yuluğ E, Türedi S, Karagüzel E, Kutlu O, Menteşe A, Alver A. The short term effects of resveratrol on ischemia-reperfusion injury in rat testis. J Pediatr Surg 49(3): 484-9, 2014.



8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 15.02.2013
TOPLANTI NO : 2013/01

3- B.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2013-01-15/02 Protokol no'lu "İnflksimabın Sıçanlarda Testiküler Torsiyon Detorsiyon Hasarı Üzerine Etkileri" konulu çalışmanın Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Rafet KOCA
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

Semiral Albayrak Semalar, 1982 yılında Zonguldak'ta doğdu. İlk,orta ve lise eğitimini TED Zonguldak Koleji Vakfı Özel Okulunda tamamladı. Üniversite eğitimine 2000 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde başladı ve 2005 yılında mezun oldu. Meslek hayatına Hedef Ecza Deposu Zonguldak şubesinde mesul müdür olarak başladı. 2007 yılında Zonguldak Kilimli ilçesinde serbest eczanesini açtı ve halen KİLİMLİ ECZANESİ'nin sahibi ve mesul müdürü olarak çalışmaya devam etmektedir. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine 2012 yılında başladı.

