

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

**İNFİLİKSİMABİN SIÇANLARDA TESTİKÜLER TORSİYON
DETORSİYON HASARINDA NF-κB, MAP KİNAZLAR VE
HSP70 ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ecz. Ebru KOCAKAYA

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 HASARINDA NF-κB, MAP KİNAZLAR VE
HSP70 ÜZERİNE ETKİLERİ**

Ecz. Ebru KOCAKAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

1. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ

2. TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Zehra YILMAZ

ZONGULDAK

2019

KABUL VE ONAY:

**“İNFİLİKSİMABIN SIÇANLARDA TESTİKÜLER TORSİYON DETORSİYON
HASARINDA NF-κB, MAP KİNAZLAR VE HSP70 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: 26/06/2019

Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

KABUL ve ONAY:

“İNFİLİKSİMABİN SIÇANLARDA TESTİKÜLER TORSİYON DETORSİYON HASARINDA NF-κB, MAP KİNAZLAR VE HSP70 ÜZERİNE ETKİLERİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından değerlendirilerek, Farmakoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Günnur ÖZBAKIŞ DENGİZ

Üye: Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ

Üye: Dr. Namık BİLİCİ

ONAY:

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

TARİH

Prof. Dr. Veysel Haktan ÖZAÇMAK

Sağlık Bilimleri Enstitüsü 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, Ecz. Semiral ALBAYRAK SEMALAR'a ve Uzm. Ecz. Burcu KARAÜZÜM'e teşekkür ederim.

Ebru KOCAKAYA
Mayıs 2019/Zonguldak

ÖZET

Ebru KOCAKAYA, İnfiliksimabın Sıçanlarda Testiküler Torsiyon Detorsiyon Hasarında NF-κB, MAP Kinazlar ve HSP70 Üzerine Etkileri. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Zonguldak, 2019

Bu çalışmada, testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) hasarına tümör nekrozis faktör alfanın (TNF-α) etkilerini ve bu etkilerde nükleer faktör kappa B (NF-κB), mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) yolları ve ısı şok proteini 70 (HSP70)'in katkısının olup olmadığı TNF-α inhibitörü infiliksimab (İNF) kullanılarak araştırıldı. Sıçanlar SHAM, T/D ve İNF+T/D olarak 3 ana gruba ayrıldı. Sağ testisin spermatik kordunun saat yönünde 720° döndürülüp batına sabitlenmesi ile 3 saatlik torsiyon gerçekleştirildi. Sıçanlara detorsiyondan 10 dak önce tek doz 5 mg/kg (i.p.) İNF veya çözücüsü uygulandı. Detorsiyonun 2. ve 24. saatinde testislerin ağırlıkları tartıldı. Detorsiyonun 2. saatinde testislerde HSP70 düzeyleri ölçüldü. Detorsiyonun 24. saatinde testislerde histopatolojik hasar ve NF-κB ile JNK, p38 MAPK ve ERK 1/2'yi içeren MAPK yolları değerlendirildi. T/D'nin uygulandığı testislerde detorsiyonun 2. saatinde ağırlık artışı, 24. saatinde ise histopatolojik hasar da artış gözlemlendi. Detorsiyonun 2. saatinde testis dokusundaki HSP70 düzeyleri SHAM grubunun düzeylerinden farklı bulunmadı. İNF tedavisi testis ağırlıkları, histopatolojik hasar ve HSP70 düzeyleri üzerine T/D etkisini değiştirmede. T/D uygulamasının, detorsiyonun 24. saatinde tübül lümenine yakın spermatogenik seriye ait hücrelerde NF-κB ve ERK1/2 ile orta şiddette, seminifer tübül lümenine yakın spermatidlerde JNK ile, lümendeki sperm ve lümeneye yakın spermatositlerde p38 MAPK ile şiddetli immün boyanmaya neden olduğu fakat İNF tedavisinin immün boyanmanın şiddetini azaltmadığı gözlemlendi. Bu çalışma ile testiküler T/D hasarında NF-κB ile MAPK yollarından özellikle JNK ve p38 MAPK'nın germinal hücrelerde aktive olduğu gösterilmiştir. T/D sonrası gözlenen hasarın İNF tarafından azaltılmaması; TNF-α'nın testiküler T/D hasarında bu proteinlerin aktivasyonunda tek başına rol almadığını göstermektedir.

Anahtar Sözcükler: Testiküler torsiyon/detorsiyon, TNF-α inhibitörü, İnfiliksimab, MAP kinaz yolağı, NF-κB, JNK, ERK, p38 MAPK, HSP70

ABSTRACT

Ebru KOCAKAYA, The Effects of Infliximab on NF- κ B, MAP Kinases and HSP70 on Testicular Torsion Detorsion Injury in Rats. Zonguldak Bülent Ecevit University, Health Science Institute, Department of Pharmacology, Master of Science Thesis, Zonguldak, 2019

The purpose of the present study, the effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in testicular torsion/detorsion (T/D) injury and whether there is a contribution of nuclear factor kappa B (NF- κ B), mitogen activated protein kinase (MAPK) pathways and heat shock protein 70 (HSP70) in these effects to investigate using infliximab (INF) as a TNF- α inhibitor. Rats were divided into 3 groups as SHAM, T/D and INF+T/D. Torsion was created by rotating the right testis 720° clockwise and maintained by fixing the testis for 3 hours. The rats were treated with infliximab 5 mg/kg (i.p.) and vehicle, at 10 min prior detorsion. Two and 24 hours after detorsion, weights of testes were measured. At the 2nd hour of detorsion, HSP70 levels were measured in the testes. At the 24th hour of detorsion, histopathological damage and MAPK activated JNK, p38 MAPK and ERK pathways and NF- κ B was evaluated in the testes. In the testis with T/D; there was the weight increase at the 2nd hour of detorsion and an increase in the histopathological damage at 24th hours of detorsion. After 2 hours of detorsion, levels of HSP70 in testicular tissue were not different from those of SHAM group. INF did not effected on testis weights, histopathological damage and HSP70 levels. At the 24th hour of detorsion, T/D application was observed to cause the İmmünological staining at the middle intensity NF- κ B and ERK1/2 in spermatogenic cells and at the severe intensity JNK in the spermatids close to seminiferous tubule lümen and p38 MAPK in the sperm in lumen and close lumen in spermatocytes. However it was observed that INF treatment did not reduce the severity of İmmüne staining. This study demonstrated that NF- κ B and MAPK pathways, especially JNK and p38 MAPK, are active in germinal cells in testicular T/D injury. It was that not reduced T/D injury by INF was showed TNF- α does not act alone in the activation of these proteins in testicular T/D injury.

Keywords: Testicular torsion/detorsion, TNF- α inhibitor, Infliximab, MAP kinaz pathways, NF- κ B, JNK, ERK, p38 MAPK, HSP70

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL ve ONAY:	ii
ÖNSÖZ	iii
ÖZET.....	iv
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
2.2. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi	4
2.3. Testiküler İskemi/Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi.....	5
2.4. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)	8
2.4.1. Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) inhibitörleri	10
2.4.2. İnfiliksimab (İNF).....	13
2.5. Nükleer Faktör Kappa-B (NF- κ B)	14
2.6. Mitojenle Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı	17
2.6.1. Ekstraselüler sinyalle ilişkili kinazlar (ERK)	19
2.6.2. c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK).....	20
2.6.3. p38 mitojenle aktive protein kinaz (p38 MAPK)	21
2.7. Isı Şok Protein 70 (HSP70)	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Hayvanlar	27
3.2. Kimyasallar	27
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	27
3.4. Testiküler Torsiyon Detorsiyon (T/D) İşlemi	28
3.5. Testis Ağırlıklarının Ölçümü.....	29
3.6. Testis Dokularında HSP70 Düzeylerinin Ölçülmesi.....	29
3.7. Testis Dokularının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	29

3.8. Testis Dokularında NF- κ B ve MAPK Yolaklarının İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi	30
3.9. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	31
4. BULGULAR	32
4.1. Testis Ağırlıkları.....	32
4.2. Testis Dokularında HSP70 Düzeyleri	33
4.3. Testis Dokularındaki Histopatolojik Bulgular	33
4.4. Testis Dokularında NF- κ B ve MAPK Yolaklarının İmmünohistokimyasal Boyanma Bulguları.....	35
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR	46
7. KAYNAKLAR	48
8. EKLER	64
Ek 1: Etik Kurul Onayı.....	64
9. ÖZGEÇMİŞ	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

AP-1	Aktivatör Protein-1
AR	Androjen reseptörü
ATF-2	Aktive Edici Transkripsiyon Faktör-2
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
ERK1/2	Ekstraselüler sinyalle ilişkili kinazlar 1/2
Fab	Antijen bağlayıcı fragman
FADD	Fas-ile ilişkili ölüm domaini
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
HSP70	Isı şok protein 70
IκB	İnhibitör kappa B
IκK	İnhibitör kappa B kinaz
İ/R	İskemi/reperfüzyon
ICAM-1	İntraselüler adezyon molekülü-1
IFN-γ	İnterferon gama
IGFBP-3	İnsülin benzeri büyüme faktörü bağlayan protein-3
IgG	İmmünglobulin G
IgG1	İmmünglobulin G1
IL-1	İnterlökin-1
IL-1β	İnterlökin-1 beta
IL-6	İnterlökin-6
İNF	İnfliksimab
i.p.	İntraperitoneal
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentazı
JAK	Janus kinaz
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal kinaz
KAT	Katalaz
LAM	Lökosit adezyon molekülleri
MAPK	Mitojenle aktive protein kinaz
MAPKK	Mitojenle aktive protein kinaz kinaz
MAPKKK	Mitojenle aktive protein kinaz kinaz kinaz
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1

NF- κ B	Nükleer faktör kappa B
NK	Doğal öldürücü
NO	Nitrik oksit
O ₂ ⁻	Süper oksit anyonu
OH ⁻	Hidroksil
p38 MAPK	p38 mitojenle aktive protein kinaz
PBS	Fosfat tamponlu salin
PGI ₂	Prostasiklin
PMNL	Polimorfonükleer lökositler
RA	Romatoid artrit
RIP	Reseptör ilişkili protein
RIP1	Reseptör ilişkili protein 1
SOD	Süperoksid dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikali
STAT3	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü3
T/D	Torsiyon/detorsiyon
TACE	TNF- α dönüştürücü enzim
TNF	Tümör nekrozis faktör
TNFR	Tümör nekrozis faktör reseptörü
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa
TNF- β	Tümör nekrozis faktör beta
TRADD	TNFR1 ile ilişkili ölüm domaini
TRAF2	TNFR ilişkili faktör 2
VCAM-1	Vasküler selüler adezyon molekül 1

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1. MAPK yolakları	19
2. Deneş grupları.....	28
3. Detorsiyonun 24. saatindeki; SHAM, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral ve kontralateral testislerin morfolojisi.....	34
4. SHAM grubuna ait detorsiyonun 24. saatindeki testis dokularının immünohistokimyasal boyama ile değeriendirilmeleri.	37
5. T/D grubuna ait detorsiyonun 24. saatindeki testis dokularının immünohistokimyasal boyama ile değeriendirilmeleri.	38
6. İNF+T/D grubuna ait detorsiyonun 24. saatindeki testis dokularının immünohistokimyasal boyama ile değeriendirilmeleri.	39

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
1. TNF- α İnhibitörleri ve Genel Özellikleri	12
2. Testis Hasarını Değerlendirmede Temel Alınan Histopatolojik Kriterler (A) ve Skorum Sistemi (B)	30
3. Detorsiyonun 2. ve 24. Saatinde İpsilateral ve Kontralateral Testislerin Ağırlıkları	32
4. Detorsiyonun 2. Saatinde Testis Dokularındaki HSP70 Düzeyleri.	33
5. Detorsiyonun 24. Saatinde İpsilateral Testis Dokularının Histopatolojik Skoruması	33

1. GİRİŞ

Testiküler torsiyon 25 yaşından genç erkeklerde 1/4000 oranında gözlenen, erken tanı ve cerrahi gerektiren acil ürolojik bir durumdur (1). Testiküler torsiyon/detorsiyonun (T/D) ana patofizyolojisinin, testisin iskemi/reperfüzyon (İ/R) hasarı olduğu görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla testiküler İ/R hasarında tümör nekrozis faktör- α (TNF- α)'nın katkısının olduğu ve özellikle reperfüzyonun erken saatlerinde doku örneklerinde ve kanda düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (2-3). TNF- α 'nın üretiminin inhibisyonunun ya da antikorlarla TNF- α nötralizasyonunun, iskemik bölgeye nötrofil infiltrasyonunu ve İ/R hasarını azalttığı bildirilmektedir (4). Böylece TNF- α üretimini azaltan ya da etkisini bloke eden tedavi yolları çeşitli organların İ/R hasarını azaltmada etkili olabilir.

İnfiliksımab (İNF), bir anti-TNF- α fare/insan kimerik immünglobulin G (IgG) monoklonal antikorudur. İNF, TNF- α 'ya bağlanarak onun biyolojik aktivitesini nötralize eder ve TNF- α 'nın kendine ait reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder. İNF'nin TNF- α inhibisyonu yaparak, akciğer, karaciğer ve intestinal İ/R hasarlarında, bu hücreleri koruduğu ve tedavi edici etkiler gösterdiği bildirilmektedir (5-7), ancak testiküler İ/R hasarında etkili olup olmadığı gösterilmemiştir.

Hücrelerdeki sinyal transdüksiyon yolağında mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) önemli rol oynar ve testis İ/R hasarında TNF- α tarafından aktive edilir. MAPK aktivasyonuna bağlı ERK1/2, JNK ve p38 MAPK yolları testiküler İ/R hasarında etkilidirler (3). Nükleer faktör kappa B (NF- κ B) inflamasyon, immün regülasyon ve hücre sağ kalımında etkili bir transkripsiyon faktörüdür. Aktive NF- κ B, TNF- α gibi inflamatuvar proteinler için hedef genlerin transkripsiyonunu aktive eder (8) ve NF- κ B testiküler İ/R hasarında TNF- α tarafından indüklenen apoptozu antagonize etmektedir (9).

Yüksek ısı ve stres gibi durumlarda hücrenin ortaya çıkardığı ve savunma mekanizmalarından biri olan ısı şok protein 70 (HSP70), ısı şok proteinleri ailesinin bir üyesidir (10). Yapılan çalışmalarda, hücrenin strese maruz kalması durumunda HSP70' in antiinflamatuvar aktivite gösterdiği ve hücre koruyuculuğuna katkıda bulunduğu ifade edilmektedir (11-12). Böbrek (13), karaciğer (14), mesane ve prostat (15) İ/R hasarında HSP70 seviyelerinin arttığı ve hücrelerde sitoprotektif etkinlik gösterdiği belirtilmektedir. Testiküler İ/R hasarında da HSP70 ekspresyonunda artış olduğu gösterilmiş, ancak HSP70'in etkileri tam olarak belirlenememiştir (16). TNF-

α kaynaklı apoptozda hücrede HSP70 seviyelerinin arttığı ve apoptoza karşı hücreleri koruduğu da bildirilmektedir (17-18).

Bu çalışmada, testiküler torsiyon/detorsiyon (T/D) hasarında TNF- α inhibitörü olan infliximab kullanılarak, TNF- α 'nın olası etkilerinde nükleer faktör kapp B (NF- κ B), mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) yolları ve ısı şok proteini 70 (HSP70)'in katkısının olup olmadığı araştırıldı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Torsiyonu

Testis torsiyonu, spermatik kord ve yapılarının testiküler eksen etrafında dönmesi sonucu testis kan akımının bozulmasıdır. Testis 360°-720° arasında torsiyone olabilmektedir. Torsiyonun nedeni genellikle bilinmemektedir ve torsiyon olayına müdahale edilmediği takdirde hastalarda gonad kaybı gelişebilmektedir. Travma, aşırı egzersiz, kremaster veya dartos kaslarının kasılması torsiyonun başlamasında etken olabilir (19-20). Çevre ısısının 2 °C'nin altına düştüğü ortamlarda torsiyonun daha sık görüldüğü bildirilmiştir (21). Puberte döneminde testisteki hızlı volüm artışı torsiyonun bu dönemde sık görülmesine neden olmaktadır. Sol testis daha uzun bir spermatik korda sahip olduğundan sağ testise oranla iki defa daha sık torsiyona uğrayabilir (22). Testiküler torsiyonun görülme sıklığı 25 yaşından genç erkeklerde 1/4000'dir (1). Her yaşta görülebilmesine rağmen vakaların 2/3'ü 12-18 yaş arasındadır; en fazla 14 yaşında, daha sonra yenidoğan döneminde tespit edilir ve yenidoğan döneminde görülen torsiyonların %72'si prenatal, %28'i ise postnatal dönemde gözlenir, olguların %2 kadarı ise bilateraldir (23). Torsiyon sonucu meydana gelen hasarda torsiyon derecesi, süresi ve tekrarlayan torsiyon sayısı etkilidir. Testiküler torsiyonun intravajinal ve ekstravajinal olmak üzere iki tipi vardır:

- Ekstravajinal Torsiyon: Perinatal dönemde görülür. Testisin skrotuma fiksasyonunun tamamlanamamasından kaynaklanır. Spermatik kord, testis ve tunika vajinalis birlikte bükülür, torsiyonun başlangıcında venöz tıkanıklık görülür ve bu tıkanıklık arteriyal dolaşımı da bozar. Torsiyon genellikle testiküler atrofi ile sonuçlanır. Skrotumda görülen şişlik en önemli belirtisidir. Erken cerrahi girişim önerilir (24). Ekstravajinal torsiyonda ilk altı saat kritik zaman dilimidir. Bu dönemde testis %85-97 oranında kurtarılabilir. 6-12 saatte bu oran %55-85 ve 12-24 saat arasında %20-80 iken 24. saatten sonra %10'un altına inmektedir (25).
- İntaravajinal Torsiyon: Sıklıkla peripubertal yaş grubunda, nadiren de perinatal dönemde görülür. Testis tunika vajinalise normalden farklı şekilde tutunur. Tunika vajinalis içinde serbest şekilde asılı kalır ve kolayca torsiyona uğrar. Testis ve spermatik kord tunika vajinalisin içinde döner. Torsiyon

sonucu oluşan anatomik bozukluğa “Bell Clapper Deformitesi” denir. En belirgin şikayet ani başlayan ağrıdır. Ağrıya bulantı ve kusma da eşlik edebilir. İnvajinal torsiyon çoğunlukla bilateraldir. Bu tip torsiyonlarda kritik zaman dilimi ilk 12 saattir. Sadece ilk 12 saat içerisinde detorsiyon yapılan testisler kurtarılabilir (26).

2.2. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Fizyopatolojisi

Vücudumuzdaki tüm organlarda meydana gelebilen İ/R hasarı, sadece olduğu organla sınırlı kalmayan, pek çok organ ve sisteme de olumsuz etkiler yapan bir patolojidir (27). Organların İ/R hasarının fizyopatolojisi ile ilgili, birbiriyle ilişkileri karmaşık hücrel ve humoral çeşitli faktörler ileri sürülmüştür (28). Serbest oksijen radikalleri (SOR), polimorfonükleer lökositler (PMNL), kompleman sistemi ve endotel hücreleri hasarın ortaya çıkmasında etkili olduğu düşünülen faktörlerden bazılarıdır (29).

İskemi, dokuda yeterli miktarda kanlanma olmama durumudur ve doku hasarının ilk basamağını oluşturur. İskemi sırasında dokuya yetersiz oksijen gitmesi nedeni ile hücrede ihtiyaç duyulan enerji miktarı karşılanamaz. Enerji depoları boşalmaya başlar, ATP konsantrasyonunun azalmasıyla hücre membranında bulunan Na^+,K^+ -ATPaz pompasının fonksiyonu bozulur ve hücre içinde Na^+ ve Ca^{+2} iyonlarında artışlar meydana gelir (30). Hücre içinde artan Ca^{+2} konsantrasyonu ile yıkımdan sorumlu çeşitli enzimler ve proinflamatuvar sitokinler aktive edilir. $TNF-\alpha$ ve interlökin- 1β (IL- 1β) gibi proinflamatuvar sitokinler oksidatif stres varlığında stres bağımlı kinaz yolunu aktive ederek iskemik bölgeye nötrofil göçünü artırır (2), bunun sonucu bu bölgede SOR miktarı artar ve doku hasarı gerçekleşmeye başlar (31). SOR bir veya daha çok sayıda çiftleşmemiş elektronlar içerir ve en iyi bilinenleri süper oksit anyonu (O_2^-) ve hidroksil (OH^-) radikalleridir. Bunlar yüksek reaktiviteye sahiptirler ve kararsızdırlar. Kararlı hale gelmek için diğer moleküllerle reaksiyona girebilecek aktif bir yapı gösterirler. SOR, hücrelerin lipid, protein, karbonhidrat, DNA ve enzim gibi tüm önemli bileşikleriyle reaksiyona girer ve oksidatif hasara neden olur (32).

Oksidatif stres ile endotel hücrelerinin aktivasyonu bozulur, kompleman sistemi aktive olur. Kompleman sistemi, lökosit adezyon molekülleri (LAM) ekspresyonu ve $TNF-\alpha$, interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) gibi

proinflamatuvar sitokinlerin sekresyonu dahil olmak üzere çeşitli inflamasyona neden olan sinyalleri başlatır. LAM, PMNL'lerin aktivasyon ve migrasyonuna neden olur. PMNL hücrelerinin, İ/R hasarında mikrovasküler oklüzyon, SOR üretimi, vasküler permeabilite artışı, sitotoksik enzim salınımı ve sitokin salınımı artışı gibi mekanizmalarla doku hasarına neden olduğu öne sürülmektedir. İskemi sırasında yavaşlayan veya duran kan akımı reperfüzyon esnasında normale döner, ancak paradoksal olarak iskemik dokunun reperfüzyonu doku hasarını artırır. Reperfüzyondaki kanlanma boyunca meydana gelen biyokimyasal ve moleküler değişimler SOR'un oluşumuna neden olurlar (31). Ayrıca hasara yanıt olarak endotel hücrelerinden koruyucu mediyatör olan nitrik oksid (NO) salgılanır ancak ilerleyen süreçte endotel hücrelerinin NO üretim fonksiyonları bozulduğu için reperfüzyonun erken döneminde bu hücreler NO üretemez, O₂ birikimi olur ve SOR üretimi gerçekleşir (33). Böylece iskemi ile oluşan hasar reperfüzyon ile daha da artabilmektedir.

TNF- α ; monositler-makrofajlar, lenfositler ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi pek çok hücreden salınan inflamatuvar, immünoregülatör ve normal hücrelerin proliferasyonunu aktive eden bir sitokindir. TNF- α , İ/R hasarında kendisi gibi proinflamatuvar sitokinlerin artışını uyarır, iskemik hasarın şiddetlenmesine yol açar (34) ve kendi reseptörleri aracılığı ile apoptozu indükler (35). TNF- α ve IL-1 gibi inflamatuvar sitokinler NF- κ B'yi aktive ederler, NF- κ B ise pek çok antiapoptotik faktörün aktivasyonunu kontrol ederek hücrede apoptozu inhibe etmektedir (36). NF- κ B, inflamasyon genlerinin transkripsiyonunda ve immün regülasyonda görev alır ve bazı durumlarda aktive olarak, hücrelerin ölümünü hızlandırabilmektedir (37).

2.3. Testiküler İskemi/Reperfüzyon Hasarının Fiziopatolojisi

Testiküler İ/R hasarında çeşitli biyokimyasal ve immünolojik mediyatörler rol almaktadır (38). Son yıllarda, bu mediyatörlerden TNF- α 'nın testis İ/R hasarında yer aldığı gösterilmiştir (39).

TNF- α , inflamatuvar, immünoregülatör ve antiviral etkilere sahiptir. Normal hücrelerin proliferasyonunu aktive ederken, tümör hücrelerine karşı sitolitik ve sitostatik etki göstermektedir. Fiziyojik durumlarda TNF- α 'nın testiste bazı düzenleyici işlevleri bulunmakla birlikte, İ/R sonrasında testis dokusunda

ekspresyonu artmakta ve proinflamatuvar sitokinleri artırarak hücrede hasara neden olmaktadır (39).

TNF- α etkilerini kendi reseptörleri olan TNF-reseptörleri 1 ve 2 (TNFR1 ve TNFR2) ile gösterir.

TNFR1 sitoplazmik ölüm alanı içeren ölüm reseptör ailesinin bir üyesidir. TNF- α TNFR1'e bağlanarak apoptotik etki meydana getirir. TNF- α 'nın TNFR1 aracılığı ile hücre hasarı ve apoptozisle sonuçlanan farklı yolları tetiklediği düşünülmektedir. TNF- α 'nın uyardığı ve inflamasyona uzanan bu yollardan biri mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) aktivasyonudur. Bu ailenin üyeleri olan c-Jun NH2-terminal kinaz (JNK), p38 MAPK ve ekstrasellüler sinyalle ilişkili kinazlar 1/2 (ERK1/2)'nin de testiste İ/R sonrasında artan TNF- α ekspresyonuna bağlı olarak aktive oldukları gösterilmiştir (3, 40). ERK yolağı öncelikli olarak hücre çoğalması, büyümesi ve farklılaşmasında aktive olurken, JNK ve p38 MAPK yolları ise inflamasyon ve hücre ölümü gibi durumlarda aktive olmaktadır (41).

Pek çok transkripsiyon faktörünün ekspresyonundan sorumlu olan MAPK'nın son yıllarda testis İ/R hasarında da rolü olduğu tespit edilmiştir. Bu ailenin üyelerinden ERK1/2 ve JNK'nın reperfüzyon olayını takiben aktive oldukları bildirilmiştir (3). Aktif haldeki MAPK'lar, inflamasyona aracılık eden sitokinlerin ekspresyonunu uyarırken, ayrıca kendisi gibi inflamatuvar sitokin ekspresyonunu artıran NF- κ B'yi de fosforile ederler (42). Tüm hücre tiplerinde bulunan NF- κ B bir transkripsiyon faktörüdür; stres, sitokinler ve serbest radikaller ile uyarılır, inflamasyon genlerinin transkripsiyonunda ve immün regülasyonda rol alır. NF- κ B'nin testis İ/R hasarında önemli fonksiyonu vardır. NF- κ B geninden yoksun "knockout" farelerle yapılan bir çalışmada, bu farelerde TNF- α ekspresyonunun ve histolojik hasarın bu gene sahip farelere göre daha az olduğu ortaya konulmuştur (8). NF- κ B inflamatuvar yolak dışında antiapoptotik yolakla da ilişkilidir. Aktif haldeki NF- κ B nükleusa transloke olur ve antiapoptotik proteinlerin sentezini artırarak hücrenin yaşamasını sağlar (43). Ayrıca inflamatuvar süreç esnasında JNK yolağını baskılayarak TNF- α 'nın apoptotik etkisini de antagonize eder (9). Read ve ark. çalışmalarında, TNF- α 'nın, JNK ve p38 MAPK ile NF- κ B sinyal yolağını aktive ederek testis dokusuna nötrofil göçüne neden olduğunu bildirmektedirler (40). Nötrofil göçü ise testiste İ/R durumunda apoptotik hücre ölümü için olmazsa olmaz bir faktör gibi görünmektedir (44).

Diğer taraftan TNF- α , yine TNFR1 aracılığıyla NF- κ B yolağını aktive ederek antiapoptotik etki ortaya çıkmasına da neden olabilir (36). NF- κ B, inhibitör κ B (I κ B) ile birlikte inhibitör κ B kinaz (IKK) kompleksini oluşturur ve bu oluşan kompleks inaktiftir. TNF- α , I κ B'nin fosforlanmasına ve proteolitik olarak parçalanmasına neden olur. I κ B'nin parçalanması sonucu serbest kalan NF- κ B, aktif hale geçer ve nükleusa transloke olur (45). Böylece TNF- α , NF- κ B ile hücre nükleusunda antiapoptotik proteinlerin sentezini artırarak hücrenin yaşamasını sağlayabilir.

Testiküler İ/R hasarıyla ilişkili olan bir diğer olay SOR üretimidir. İskemiye takip eden reperfüzyon safhasında artan oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak dokudaki SOR miktarı artar. SOR hücrenin membranındaki lipid, karbonhidrat ve proteinlere saldırarak lipid peroksidasyonuna neden olur. İmmünolojik açıdan oldukça korunaklı olan testisler lipid bakımından zengin bir hücre membranına sahip oldukları için oksidatif strese oldukça duyarlıdırlar. SOR hücre membranının yapı taşlarının yanında hücrenin DNA'sına da saldırır. Bu şekilde SOR'un saldırısına uğrayan testiste spermatogenez olayı hasar görür; sperm motilitesi azalır ve bozulmuş sperm sayısında artış gözlenir. Bu durum infertiliteye kadar uzanabilir (46-47). SOR lipid peroksidasyonunun yanı sıra apoptoz kaynaklı hücre ölümüne de neden olur ve testis İ/R hasarına katkıda bulunur.

Sıçanlarda oluşturulan testiküler İ/R hasarı modellerinde testis dokularında ısı şok protein 70 (Heat-shock protein, HSP70) isimli bir şaperon proteinin düzeylerinde belirgin artışlar olduğu gösterilmiştir (15-16). Normal şartlarda hücrelerde düşük seviyede bulunan HSP70'in, iskemi durumunda üretiminin arttığı bildirilmiştir (43, 48); iskemi gibi stres durumlarında, HSP70 hücrelerde artan toksik proteinleri tanır, birikmelerini engeller ve bu proteinlerin doğru bir biçimde katlanmalarına yardımcı olur (49). İskemi durumunda artan HSP70 üretiminin, NF- κ B'nin I κ B ile oluşturduğu inaktif haldeki IKK'nın gama alt birimine bağlanıp NF- κ B'nin aktif hale geçmesini engelleyerek inflamatuvar cevabı baskıladığı ileri sürülmektedir (50). Böylece HSP70'in, TNF- α aktivasyonuna bağlı NF- κ B'nin aktif hale geçmesini engelleyerek TNF- α aracılı hücre ölümüne duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (51). Ayrıca TNF- α , HSP70 üretimini artırmaktadır (52). Bununla birlikte bazı çalışmalarda da HSP70'in apoptoza karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. HSP70'in, MAPK aktivasyonunda JNK ve ERK fosforilasyonu ile p38 MAPK'nın translokasyonunu düzenleyerek apoptozu önlediği bildirilmektedir (53-54).

HSP70'in testiküler İ/R hasarındaki rolü üzerinde yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir.

2.4. Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α)

TNF ilk olarak 1975 yılında Carswell ve ark. tarafından endotoksinler ile indüklenen ve sarkomlarda hemorajik nekroza neden olan bir glikoprotein olarak tanımlanmıştır (55). Aggarwal ve ark. ise 1984'te yapıları birbirinden farklı olan iki tane TNF geni klonlamışlardır. Bunlardan biri makrofajlardan salınan TNF- α 'dır, diğeri ise lenfositlerden salınan, lenfotoksin olarak bilinen, tümör nekrozis faktör betadır (TNF- β) (56).

TNF- α başta monositler ve makrofajlar olmak üzere T hücreleri, PMNL, NK hücreleri, endotel hücreleri ve tümör hücrelerinde 26 kDa ağırlığında pro-TNF olarak sentezlenir, TNF- α dönüştürücü enzim (TACE) tarafından pro-domaininden ayrılarak 17-kDa molekül ağırlığında 157 aminoasitten oluşan bir protein olan TNF- α 'ya dönüşür ve pek çok inflamatuvar, enfeksiyöz ve malign olayda görev alır (57). TNF- α kaşeksi, endotoksik şok, inflamasyon, doğal ve kazanılmış immünolojik olaylar, koagülasyon, hücre proliferasyonu, apoptoz ve İ/R hasarında rol oynar (35). Düşük konsantrasyonlarda TNF- α , lökosit ve endotel hücrelerinde düzenleyici biyolojik etkiler gösterirken; yüksek konsantrasyonlarda öldürücü etki gösterir. Damar endotel hücrelerinden prostasiklin (PGI₂) ve NO gibi otakoidlerin salıverilmesini uyarıp damar düz kaslarını gevşeterek kan basıncını ve doku perfüzyonunu azaltır. Aynı etkileri düz kas hücrelerine direkt etki ederek de gerçekleştirir. Miyokardın kasılabilirliğini ve doku perfüzyonunu azaltır (58).

TNF- α , biyoaktivitesini TNFR1 ve TNFR2 ile gösterir. Bu reseptörler hücre membranı üzerinde ya da membrandan ayrı olarak çözünebilir (sTNFR) formda bulunurlar. TNF- α , TNFR2'ye TNFR1'den 5 kat fazla afinite göstermesine rağmen, biyolojik aktivitesinin çoğunluğunu TNFR1 ile başlatır. Bu iki reseptör arasındaki temel fark, TNFR1'in TNFR2'de olmayan ölüm domainine (DD) sahip olmasıdır. TNFR1, bu ölüm domaini sayesinde apoptotik hücre ölümünü indükleme yeteneğine sahip ölüm reseptör ailesinin önemli bir üyesidir. TNFR1, apoptozun yanında yaşamsal hücre sinyalleri ve çoğalma ile ilgili yolağı da aktive eder. TNF- α , TNFR1'in ekstraselüler domainine bağlanır ve sinyal başlar. Reseptöre bağlı ölüm domainlerine gelen sinyal hücre içindeki pek çok adaptör protein aracılığıyla iletilir.

Bu adaptör proteinlerden biri olan TNFR1 ile ilişkili ölüm domaini (TRADD); TNFR ilişkili faktör (TRAF2), reseptör ilişkili protein 1 (RIP1) ve Fas-ile ilişkili ölüm domaini (FADD) gibi proteinleri aktive eder. TRAF2 aktivasyonu ile MAPK yolu aktiflenir ve JNK, ERK fosforilasyonu ile p38 MAPK'nın translokasyonu düzenlenir. TRAF2 aynı zamanda RIP yolunu da indükleyerek NF- κ B'nin inaktif haldeki IKK kompleksinden ayrılıp aktif hale geçmesine neden olur (59).

TNF- α testis dokusunun homeostazında önemli role sahiptir. Normal testisin germ hücrelerinde CYP450 aromataz salınımını artırarak androjenlerden östrojen sentezini indükler (60), dolaylı yoldan spermatogenez destekler ve Sertoli hücrelerindeki hücre içi androjen reseptörü (AR) testesteron sinyaline aracılık eder. Sertoli hücrelerinde NF- κ B'nin fazla ekspresyonu AR'nin promotör aktivitesini uyarır. TNF- α ise, bu hücrelerde NF- κ B'nin aktivasyonunu stimüle ederek AR promotörüne bağlanmasını uyarır ve endojen AR ekspresyonunu artırır. TNF- α , invitro olarak Sertoli hücrelerindeki transferin mRNA ve protein seviyelerini artırır, bu hücrelerdeki laktat dehidrojenaz A salınımını stimüle ederek spermatogenezin devamlılığını sağlar. Ayrıca, Sertoli hücrelerinde insülin benzeri büyüme faktörü bağlayan protein-3 (IGFBP-3)'ü stimüle eder. Sıçan Sertoli hücre kültürlerinde IL-1 α ve IL-6 üretimini artırır. Bu da Sertoli hücrelerindeki sitokin üretimini değiştirdiğini ve Sertoli hücrelerinin fonksiyonları ile spermatogenez etkileyebileceğini gösterir. Hem Sertoli hem de seminifer peritübüler hücrelerde indüklenebilir nitrik oksit sentazı (iNOS) ve nitriti stimüle eder. Sertoli hücrelerindeki TNF- α , IL-1 β ve IL-6 kombinasyonu transferrin ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) sekresyonunda artışa neden olur. TNF- α , konsantrasyona bağımlı olarak, insan seminifer epitelyal kültür segmentlerinde germ hücre apoptozunu inhibe eder. Seminifer epitelyum segmentlerinin Fas ligand üretiminde down-regülasyona neden olur. Sertoli hücrelerinde düşük konsantrasyonlarda çözünür Fas (hayatta kalma faktörü olan) üretimini indüklerken, inflamasyon esnasında ise yüksek konsantrasyonlara ulaşarak membrana bağımlı Fas (hücre ölümüne neden olan) üretimini indüklemektedir (39).

TNF- α 'nın İ/R hasarındaki rolü seksenli yılların sonunda anlaşılmıştır. Miyokard infarktüsü geçirmiş kişilerin serumlarında TNF- α 'nın düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (61). Daha sonra TNF- α 'nın karaciğer (62) ve intestinal (63) İ/R hasarındaki etkileri tanımlanmıştır. İntestinal İ/R hasarında TNF- α üretiminin arttığı ve TNF- α 'nın intestinal İ/R sonrası meydana gelen akut akciğer hasarında da en önemli rolü olan sitokin olduğu belirlenmiştir (64).

Normal koşullarda testis homeostazında mitojenik özellik gösteren TNF- α , testiste İ/R durumunda inflamasyona ve apoptoza (39) neden olur. İnflamatuvar reaksiyon sırasında TNF- α ve IL-6 sekresyonu Leydig hücrelerinde steroidogenezis inhibisyonuna neden olabilir. Testis fonksiyonlarını bozar ve apoptozu başlatır. İmmüno-regülatör cevaplarda rol oynar (65). Lysiak ve ark. testiste İ/R sonrasında TNF- α konsantrasyonunun arttığını ve TNF- α 'nın proinflamatuvar sitokinlerin artışıını uyararak hücrede hasara neden olduğunu göstermiştir (39). Minutoli ve ark. TNF- α 'nın testis İ/R durumunda hücre hasarına neden olan yollardan biri olan MAPK yolağını aktive ettiğini ortaya koymuştur (3). Bu ailenin üyeleri olan JNK, p38 MAPK ve ERK1/2'yi aktive eder. TNF- α , JNK ve p38 MAPK ile NF- κ B sinyal yolağını aktive ederek testise nötrofil infiltrasyonunu sağlar ve apoptotik etki artar (2).

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

TNF- α üretimi, çeşitli otoimmün bozukluklar gibi birtakım patolojik durumlarda çoğalır. TNF- α ; 1990'lı yıllarda, romatoid artrit (RA) ve inflamatuvar barsak hastalığı gibi durumların tedavisinde geçerli bir terapötik hedef haline gelmiş ve TNF- α 'yı hedef alan biyolojik ilaçlar geliştirilmeye başlanmıştır (66). Günümüzde İNF, etanersept, adalimumab, golimumab, sertolizumab pegol olmak üzere Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve Türkiye'de klinikte kullanılan 5 (beş) adet TNF- α inhibitörü bulunmaktadır (Tablo 1).

- Adalimumab, sadece insan peptid sekansları içeren rekombinant IgG1 monoklonal antikorudur. TNF- α 'nın reseptörlerine bağlanmasını engeller.
- Etanersept, TNF p75 reseptörü ve bir insan IgG1'in Fc fraksiyonu arasındaki rekombinant bir füzyon proteinidir. TNF- α 'nın hücre yüzeyindeki TNFR'lere bağlanmasını inhibe eder.
- Golimumab, IgG1 κ monoklonal antikorudur. İnsanda TNF- α 'nın biyoaktif formlarına yüksek afinite ile bağlanarak stabil kompleksler oluşturur ve TNF- α 'nın reseptörlerine bağlanmasını önler.
- Sertolizumab Pegol TNF- α 'yı yüksek afiniteyle inhibe eder. Sertolizumab *Escherichia coli* hücre kültürü ile üretilmiş, daha sonra polietilen glikole kimyasal olarak bağlanmış insan IgG4 Fab parçasıdır (66) ve normal/tam bir antikorda bulunan kristalize (Fc) fragment bölgesine sahip olmadığından sitotoksik etkilere neden olmamaktadır (67).

TNF- α inhibitörleri gastroenterolojide Crohn hastalığı gibi iltihaplı hastalıkların, romatolojide RA, psoriatik artrit ve spondiloartropatilerin ve dermatolojide psöriyazisin tedavisi gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (68). İnflamasyonu azaltırlar, özellikle inflamatuvar hastalıklarda doku iyileştirici etki sağlarlar ve remisyonu başlatırlar (7). TNF- α inhibitörlerinin kullanımının etkinlik ve güvenlik bakımından olumlu sonuçlar göstermesi ve pek çok hastalığın patogeneğinde TNF- α 'nın etkisinin varlığının kanıtlanması TNF- α inhibitörlerinin kullanımlarını teşvik etmektedir.

TNF- α inhibitörlerinin en yaygın yan etkileri, enfeksiyonlar (üst solunum yolu enfeksiyonları) ile ağrı, kaşınma, kızarıklık ve enjeksiyon bölgesinde kanama gibi enjeksiyon yeri reaksiyonlarıdır. Bu inhibitörler immün sistemi etkilemekte ve kullanımları, vücudun enfeksiyona ve kansere karşı olan savunmasını etkileyebilmektedir. Ayrıca, ciddi hematolojik, nörolojik ve otoimmün yan etkiler de bildirilmiştir (67).

Tablo 1. TNF- α İnhibitörleri ve Genel Özellikleri

	İnfiliksımab	Adalimumab	Etanersept	Golimumab	Sertolizumab pegol
<u>Ticari isim</u>	Remicade [®] , Remsima [®]	Humira [®]	Enbrel [®]	Simponi [®]	Cimzia [®]
<u>Hedef</u>	mTNF- α , sTNF- α	mTNF- α , sTNF- α	sTNF- α , LT- α	mTNF- α , sTNF- α	mTNF- α , sTNF- α
<u>Kaynak</u>	İnsan ve fare	İnsan	İnsan	İnsan	İnsan
<u>Uygulama Şekli</u>	i.v.	s.c.	s.c.	s.c.	s.c.
<u>Endikasyon</u>					
Romatooid artrit	X	X	X	X	X
Psöriyatik artrit	X	X	X	X	X
Psoriyazis	X	X	X		X
Ankilozan spondilit	X	X	X	X	
Crohn hastalığı	X	X			
Ülseratif kolit	X	X		X	
Hidradenitis suppurativa		X			
Poliartriküler idiyopatik juvenil artrit		X			
Üveit		X			

2.4.2. İnfliksimab (İNF)

İnfliksimab (İNF) TNF- α 'ya karşı; kimerik insan-mürin IgG1 monoklonal antikorudur (7). İNF, çeşitli romatolojik, gastrointestinal, dermatolojik ve kronik oküler hastalıkların tedavisinde kullanılır. İnflamasyonu hafifletir ve bölgedeki SOR'u temizler (69). İNF, İ/R hasarlarında TNF- α inhibisyonu yaparak TNF- α 'nın aktive ettiği yolları bloke eder ve iyileşmeyi sağlar (7). TNF- α 'nın çözünebilen ve transmembranöz formlarına yüksek afinite ile bağlanır (70). Son zamanlarda İNF'ın ince barsak, akciğerler, karaciğer ve renal İ/R hasarı üzerine koruyucu etkisi çeşitli deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (5-6, 71).

İNF'in ilk orijinal ticari formu Remicade® 1990'lı yılların sonunda, ikinci ürün Remsima® 10 yıl sonra onaylandı (72). Her iki ürün de Crohn hastalığı, Romatoid artrit, Psöriyatik artrit, Psoriasis, Ankilozan spondilit ve Ülseratif kolit için onay almıştır. Ürünlerin endikasyonları ve uygulama şekli Tablo 1'de gösterilmiştir. İNF'ın; Behçet hastalığı, enfeksiyöz olmayan üveit ve diğer oküler inflamatuvar bozuklukların tedavisinde de etkinliği klinik çalışmalarla desteklenmektedir. Çalışmalar bu ajanların etkili olduğunu göstermekle birlikte konu ile ilgili karar verebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (70).

İNF tedavisi sırasında hastalarda yan etkiler ortaya çıkabilir. İnfüzyona bağlı olarak anafilaksi, konvülsiyonlar, eritemli döküntü ve hipotansiyon gibi akut ve ciddi reaksiyonlar görülebilir. Tedavi sırasında, Multipl skleroz, Guillain-Barré sendromu ve demiyelinizan nöropati gibi nörolojik bozuklukların başladığı ya da şiddetlendiği, hepatit ve kolestatik hastalıklara neden olabileceği bildirilmektedir. İNF dahil TNF- α blokörü alan hastalarda non Hodgkin lenfoma, akciğer kanseri, deri kanseri gibi malignite vakaları artabilir (73). İNF ve diğer TNF- α blokörü ilaçlarla tedavi olan hastalarda ciddi enfeksiyon riski artmaktadır. Tedavi sırasında hastalarda tüberküloz meydana gelebilir. Tedaviye başlanmadan önce hastalar tüberküloz açısından değerlendirilmeli ve tüberküloz tanısı konan hastalarda İNF tedavisine başlanmamalıdır (74).

2.5. Nükleer Faktör Kappa-B (NF-κB)

Nükleer faktör kappa B (NF-κB) ilk kez 1986 yılında Baltimore ve ark. tarafından tanımlanmıştır (75). NF-κB, önceleri B hücrelerinde Ig kappa hafif zincirinin üretimini kolaylaştıran bir faktör olarak tanımlanmıştır, daha sonraları birçok organizmada ve her hücre tipinde bulunan, organizmanın kendini savunmada kullandığı ana faktörlerden birisi olarak kabul edilmiştir (76).

NF-κB ailesi homo ve heterodimerik NF-κB/Rel proteinlerinden oluşan 5 üyeden meydana gelir. Bu üyeler; NF-κB 1 (p50/p105), NF-κB 2 (p52/p100), RelA (p65), RelB ve c-Rel olup her biri çeşitli transkripsiyonel aktivasyon özelliklerine sahiptir. NF-κB hücrede bir uyarı olmadığı sürece sitoplazmada yer almaktadır. Burada bir inhibitör protein olan IκB ile IκK kompleksini oluşturur ve bu halde inaktif formdadır. İndükleyici uyarılar IκK aktivasyonunu başlatarak fosforilasyon, ubiquitinasyon ve IκB proteinlerinin degradasyonuna yol açar. NF-κB ile IκB ayrılır ve NF-κB aktif hale geçer (45).

NF-κB çeşitli dokulardaki normal gelişimde ve homeostazda fizyolojik açıdan önemli aktivitelere sahiptir. NF-κB sitokinler, IL-1, TNF, serbest radikaller, virüsler, çift sarmallı RNA, endotoksinler, forbol esterler, UV ışığı, iyonlaştırıcı radyasyon ve stres gibi birçok faktör tarafından aktive olur (77). Aktif NF-κB, immüno-inflamatuvar yanıtlar, hücre siklusu, apoptoz, hücre adezyonu, anjiyogenez gibi olaylarda rol oynayan pek çok genin transkripsiyonunu kontrol ederek (37), viral enfeksiyonlar, immüno-inflamatuvar hastalıklar, kanser ve lösemiler gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde karşımıza çıkmaktadır (78).

NF-κB, proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, lökosit adezyon molekülleri ve inflamatuvar enzimler arasında hem doğuştan hem de adaptif immüniteye dahil genleri düzenler (79) ve TNF-α, IL-1, IL-2, IL-12, IL-16, IL-18 ve interferon-gama (IFN-γ) gibi sitokinlerin transkripsiyonunu artırarak inflamasyonda önemli bir görev alır. Ekspresyonu artan sitokinlerin NF-κB aktivasyonunu uyarmaları ile inflamasyon kronik bir hal alır ve şiddeti artar (80). NF-κB'nin; inflamatuvar bağırsak hastalığı, otoimmün artrit, glomerülonefrit, astım, akciğer fibrozu, septik şok, karsinogenezis ve AIDS'de patolojinin başlatılması ve ilerlemesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (79).

İnflamasyon ve immünite üzerindeki rolüne ek olarak, NF-κB alt birimleri apoptozun, hücresel proliferasyonun ve onkogenesinin önemli bir düzenleyicisidir.

Kanser hücrelerinin yaşam süresini uzatır, tümör oluşumuna neden olur ve tümörün progresyonunu hızlandırır. Bu duruma karşılık kanser hücrelerinde onkogenezdaki aşırı hücre proliferasyonu güçlü bir apoptotik sinyali de aktive eder. Bu nedenle, kanser hücrelerinde bu etkiye karşı koyan NF- κ B aktivasyonu artar ve antiapoptotik sinyal sağlanır (81). Apoptozu başlatan birçok sinyalin de, apoptozu baskılayan NF- κ B'yi aktive ettiği görülmektedir (77). NF- κ B transkripsiyon faktörleri hem anti-apoptotik hem de proapoptotik etkilere sahip olabilir. NF- κ B'nin apoptozu teşvik ya da inhibe edip etmediği spesifik hücre tipine ve indükleyicinin türüne bağlı olarak gözlemlenebilir (36).

NF- κ B, hücrel stres ile aktive olur ve tepki verir, bu nedenle daha genel olarak strese yanıtın arabulucusu olarak düşünülebilir (77). İskemi reperfüzyon hasarının reperfüzyon aşamasında hızla artan ROS, NF- κ B'yi aktive eder ve dokuda reperfüzyon hasarını artırır, dolayısıyla birçok organın işlev bozukluğunda rol oynayabilir (82). Burma ve ark. kalpte yaptıkları İ/R modelinde, NF- κ B düzeyleri anlamlı olarak artmış ve NF- κ B aktivasyonu bastırıldığında reperfüzyon hasarının inhibe edilebileceği gösterilmiştir (83). Bir başka çalışmada, akciğer İ/R modelinde NF- κ B'nin hücre hasarına katkıda bulunduğu ve NF- κ B aktivasyonunun engellenerek hasarın azaldığı ve akciğer fonksiyonlarının düzeldiği bildirilmektedir (84). TNF, iyonlaştırıcı radyasyon ve kemoterapötik bileşikler gibi bazı uyarılardan sonra, bazı hücrelerde NF- κ B'nin antiapoptotik etkinlikleri gözlemlenmiştir (36). Erl ve ark., insan ve sıçan düz kas hücrelerinde NF- κ B inhibisyonunun apoptozu indüklediğini, NF- κ B'nin düz kas hücrelerinin çoğalmasını teşvik ettiğini göstermiştir (85).

Delfino ve Walker'ın yaptıkları çalışmada NF- κ B alt birimleri p50 ve p65 proteinlerinin, sıçan testisinden kültürlenmiş Sertoli hücrelerinin nükleusunda yapısal olarak aktif şekilde var olduğu bulunmuştur (86). Liliensbaum ve ark. sıçanlarda yaptıkları çalışmada NF- κ B'nin spermatozoidlerde aktifleştiğini ve testiste modüle edici bir rol oynadığını göstermiştir. NF- κ B mayoz bölünmenin pakiten evresinde bulunur ve germ hücresi farklılaşması ve olgunlaşması aşamalarında aktif kalır. NF- κ B spermatogenez sırasında aşamalı olarak gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynar (87). Delfino ve ark. 1999'da memeli spermatogenezinde NF- κ B'nin rolü olduğunu ileri sürmüştür (88).

Diğer organ hasarlarında olduğu gibi testis İ/R hasarında da NF-κB hayati bir rol oynamaktadır. Testis torsiyonu oluştuğunda NF-κB aktive edilmiştir. Torsiyon sonrasında, özellikle nükleer NF-κB protein seviyeleri artmış ve daha sonra spermatogenik hücrelerin apoptozunda artışlara neden olmuştur (89). Testis İ/R hasarında NF-κB'nin aktivasyonu, hem MAPK yolağı hem de inflamatuvar sitokinler TNF-α ve IL-6 ekspresyonu ile inflamatuvar yanıtı yayarak hasarın gelişimine katkıda bulunmuştur (42). Pentikainen ve ark.'nın yaptığı çalışmada sıçan testisinde NF-κB alt birimlerinden RelA ve p50 proteinlerinin Sertoli hücrelerinin çekirdeklerinde, spermatogenezin tüm evrelerinde eksprese edildiği gözlenmiştir. Sıçan Sertoli hücrelerinde NF-κB'nin DNA bağlanma aktivitesinin artışını TNF-α'nın indüklediği gözlenmiştir. İnsan erkek germ hücrelerinin in vitro olarak indüklenen apoptozu sırasında Sertoli hücrelerinde nükleer NF-κB ekspresyonunun ve DNA bağlanmasının hızla arttığı ortaya koyulmuştur. Testis NF-κB aktivasyonunun inhibisyonu ile germ hücresi ölümünün etkili bir şekilde bastırıldığı belirtilmiştir. Sıçan testisinde apoptoz durumunda Sertoli hücrelerinde spermatogenezin her aşamasında nükleer NF-κB'nin ekspresyonu gözlenirken, insan testisinde sadece seminifer tübüllerin bir kısmında nükleer NF-κB ekspresyonu görülmüştür (36). Delfino ve ark. (86) sıçan testisinde geç mayotik ve post mayotik germ hücrelerinde gözlemediği nükleer NF-κB ekspresyonuna karşın Pentikain ve ark.'nın çalışmasında sıçan testis germ hücrelerinde nükleer NF-κB uyarımı gözlenmemiştir. Germ hücrelerinde nükleer NF-κB uyarımı gözlemeyen Pentikain ve ark. geç mayotik ve post mayotik germ hücrelerinde apoptozun indüklendiği, buna karşın Sertoli hücrelerinin hayatta kaldıklarını ortaya koymuştur. Pentikainen ve ark. testiküler stres sırasında Sertoli hücresindeki NF-κB proteinlerinin, germ hücreleri üzerinde proapoptotik etkiler uyguladığını, NF-κB'nin farmakolojik olarak inhibisyonunun, aşırı germ hücresi ölümünü içeren geçici stres durumlarında terapötik bir hedef olabileceği ihtimalini arttırmaktadır (36). Budde ve ark. germ hücrelerinde apoptozun indüksiyonu, destekleyici Sertoli hücreleri tarafından kontrol edilen aktif bir süreç olabileceğini, Sertoli ve germ hücrelerinde Fas ligandının farklı uyarımlar yoluyla ortaya çıkan nükleer NF-κB'nin bu hücreler içinde ekspresyonunun, hayatta kalma sinyali görevi görebileceğini ifade etmiştir. NF-κB muhtemelen hücrelerde sağ kalım için gerekli genlerin ifadesini düzenler ve

gelişmekte olan germ hücrelerinin daha da farklılaşmasını teşvik eden genlerin sentezlenmesine neden olabilir (90).

TNF- α , iltihaplanma, bağışıklık, apoptoz ve farklılaşmada önemli bir rol oynar ve muhtemelen NF- κ B'nin en güçlü indükleyicisidir (9). TNF- α apoptoza neden olur ve bu durum NF- κ B aktivasyonu ile paraleldir. NF- κ B aktivasyonunun, TNF- α sinyalizasyonu kaynaklı bir negatif geri bildirim mekanizması ile hücre ölümlerini baskıladığı ortaya koyulmuştur (91). Bu, NF- κ B'nin aslında bir hayatta kalma faktörü olarak hizmet edebileceğini önermektedir. TNF- α , TNFR-1 aracılı sinyali hücre içinde TRADD aracılığıyla iletir. TRADD, transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin aktivasyon sinyali için TRAF-2 ile etkileşime girer. TRAF-2, reseptör ilişkili protein (RIP) yolağını indükleyerek NF- κ B'nin inaktif haldeki I κ K kompleksinden ayrılıp aktif hale geçmesine neden olur (59). Yapılan çalışmalarda T hücrelerinin TNF- α kaynaklı apoptoza artmış duyarlılığı NF- κ B aktivasyonunun azalması ile ilişkilendirilmiştir. TNF- α ile indüklenen apoptozun NF- κ B tarafından bastırılması organizmanın hayatta kalması ve hasara tepkisi için çok önemlidir (9). Erişkin karaciğerinde TNF- α kaynaklı apoptoza karşı NF- κ B'nin direnç gösterdiği gözlenmiştir (92). TNFR ile uyarılan apoptozun NF- κ B aracılı inhibisyonu kronik inflamatuvar hastalıklarda rol almaktadır (9). NF- κ B'nin özellikle RelA (p65) alt birimi eksik farelerde yapılan bir çalışmada, bu alt birimlerin TNF- α bağımlı genlerin indüksiyonu için gerekli olduğu görülmüştür. RelA (p65) geninden yoksun olan farelerin hücrelerinin TNF- α ile tedavisi yaşama kabiliyetinde belirgin bir azalmaya neden olurken, RelA (p65) eksikliği olmayanlar tedaviden etkilenmemiştir. RelA (p65)'nin farelere yeniden verilmesi, hücrelerde sağ kalımı artırmış ve TNF- α tarafından indüklenen apoptozdan korunmak için RelA (p65) varlığının gerekli olduğunu göstermiştir (93).

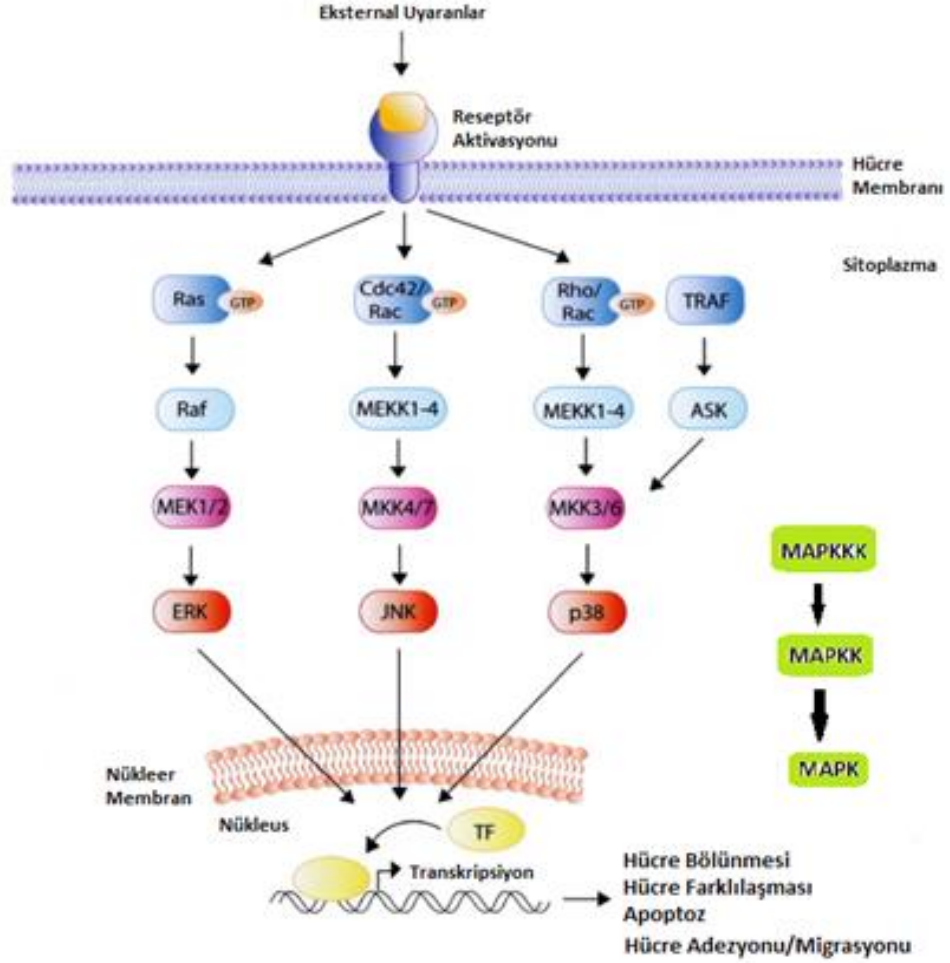
2.6. Mitojenle Aktive Protein Kinaz (MAPK) Yolağı

Mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) sinyal yolağı ökaryotik hücrelerdeki gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Hücre dışı sinyallerin hücrede iletimini sağlayarak büyüme, çoğalma, farklılaşma, göç ve apoptoz gibi temel hücresel süreçleri kontrol eder. MAPK'lar sitokinler, büyüme faktörleri, antijenler, toksinler, farmakolojik ilaçlar ve ultraviyole (UV) ışınına maruz kalma gibi çeşitli uyaranlarla aktive edilir. MAPK yolağı yukarıdan aşağıya doğru mitojenle

aktive protein kinaz kinaz kinaz (MAPKKK), mitojenle aktive protein kinaz kinaz (MAPKK) ve MAPK'dan oluşur (94).

İnsanlarda belirgin şekilde düzenlenmiş ERK1/2, JNK ve p38 MAPK olmak üzere 3 ana MAPK grubu tanımlanmıştır (Şekil 1). MAPK'ların aktivasyonu üzerine, sitoplazmada veya çekirdekte bulunan transkripsiyon faktörleri fosforilasyon sonrası aktive edilir ve hedef genlerin sentezlenmesine dolayısıyla biyolojik tepkiye neden olur (3).

ERK1/2, JNK ve p38 MAPK hücre apoptozu ve sağ kalımda önemli rol oynamaktadırlar. MAPK yolları ile ilgili yapılan çalışmaların çoğunda ERK1/2'nin antiapoptotik rolü ve p38 MAPK ve JNK'nin sürekli aktivasyonu için proapoptotik bir rolü olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte, bu yolların her birinin fonksiyonu, hücrelerin tipine ve fizyolojik/patolojik olaylara oldukça bağımlıdır (95). MAPK'lar memeli testislerinde, hücre bölünmesine, farklılaşmasına, hayatta kalma ve ölümün kontrol edilmesine katılırlar ve spermatogenez için kritik önem taşırlar. Normal spermatogenezi sürdürmede rol oynarlar ve germ hücresi gelişiminin birçok aşamasında yer alırlar (96-97). Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalara göre, MAPK yolağının aktivasyonu spermatogenezi ve germ hücrelerinin veya Sertoli hücrelerinin diğer işlevlerini sıklıkla bozmaktadır. Bunun sonucunda, sperm kalitesinde ve doğurganlıkta düşüş gözlenir. MAPK yolağı üyelerinin sperm fonksiyonlarının bozulması veya testiküler hasardan sonra sperm kalitesindeki ve doğurganlıktaki gerilemeyi tersine çevirmek için terapötik hedef olabileceği belirtilmiştir (97).



Şekil 1. MAPK yolları (ASK: Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz, TRAF: TNF reseptör ilişkili faktör, ERK: Ekstraselüler sinyalle ilişkili kinaz, JNK: c-Jun NH₂-terminal kinaz, MKK4/7: MAPK kinaz 4/7, MKK3/6: MAPK kinaz 3/6, MEK1/2: MAPK kinaz 1/2) (96).

2.6.1. Ekstraselüler sinyalle ilişkili kinazlar (ERK)

ERK'ler MAPK ailesinin 3 ana üyesinden biridir ve ERK1-2-3-4-5-6-7 ve 8 olmak üzere 8 alt gruba sahiptir. ERK yolu, büyüme faktörleri, sitokinler, mitojenler, hormonlar ve oksidatif ya da sıcak stres gibi çeşitli ekstraselüler uyarılarla aktive edilebilir (95). ERK1 ve ERK2, sırasıyla 44 ve 42 kDa ağırlığında, iyi karakterize edilmiş MAPK'lardır (96). ERK1/2 yolu, hücre proliferasyonunda önemli rol oynar. Büyüme, çoğalma, göç, farklılaşma, apoptoz ve otofaji gibi geniş hücre davranışlarını düzenler ve inflamatuvar yanıtlara aracılık eder (95). ERK yolağının aktivasyonu patogenez, progresyon ve onkogenik olaylarda etkinliğini göstermektedir (94).

Memeli hücrelerinde ilk olarak ERK yolağının rolünü belirleme çalışmaları Ras proteinleri ile yapılmıştır. Ras sıçanlarda sarkomalara neden olan tümör virüslerinin onkojenik proteinleridir. Ras aktivasyonu Raf¹ aktive eder ve plazma zarından sitozole taşınmasına neden olur. Aktive olmuş olan Raf sitozolde ikinci protein kinaz olan mitojenle aktive protein kinazkinazı (MEK) fosforilleyerek ERK yolağının aktivasyonunu sağlayan protein kinaz yolağının çalışmasına neden olur (98).

ERK1/2 yolağının İ/R hasarlı hücrenin sağ kalımında rol oynadığı görülmüştür; beyin, böbrek ve karaciğer dokularına ait İ/R hasarında apoptoz ile ilişkilendirilmiştir ve hücrenin sağ kalımına katkı sağladığı bildirilmiştir (99). Testiküler hücrelerde ERK1/2 yolakları, hücre bölünmesi, büyüme, farklılaşma ve sağ kalım gibi çeşitli büyüme faktörü tarafından uyarılan süreçlere aracılık eder. Bu yolaklar, spermatogenezis ve sperm fonksiyonlarında kritik rol oynar ve germ hücrelerinin hayatta kalması için de önemlidir (96). ERK1/2, testiküler iskeminin patogeneğinde de temel bir rol oynar (3) ve sıçan testislerinde oluşturulan İ/R yaralanmasından sonra reperfüzyonun erken evresinde aktive olmuş ve hücrelerin sağ kalımını sağlamıştır (99).

ERK1/2, TNF- α mRNA'nın sitoplazmaya geçişini, stabilitesini, translasyonun başlamasını ve TNF- α 'nın TACE fosforilasyonu ile dökülmesini düzenler. ERK1/2 yolağının inhibisyonunun TNF- α üretimini azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda TNF- α , ERK1/2 ve diğer MAPK'ların aktivasyonunu da sağlayabilir (100).

2.6.2. c-Jun NH₂-terminal kinaz (JNK)

JNK; TNF- α , inflamatuvar sitokinler, oksidatif stres, ozmolarite veya metabolizma değişiklikleri, DNA hasarı, UV ışınlanması, iskemi ve ısı şoku gibi çeşitli hücrel ve çevresel uyarılara yanıt olarak aktive olur (95-96). JNK, özellikle IL-1 β ve TNF- α dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinler ve reaktif oksijen türleri gibi hücrel stresler tarafından uyarılır, stresle aktive protein kinaz olarak adlandırılır (2). JNK'lar JNK-1, JNK-2 ve JNK-3 olmak üzere 3 izoforma sahiptir. JNK transkripsiyon faktörlerini aktive eder; gen ekspresyonundaki değişiklikler, hücre ölümü veya değiştirilmiş hücre proliferasyonu gibi önemli hücrel sonuçları etkileyebilirler (95).

JNK yolu kaspazları aktive ederken; p53, Bcl-2 ve Bax da dahil olmak üzere apoptoz düzenlenmesiyle ilgili proteinleri regüle eder. Mitokondriyal ölüm yolunu etkiler (94). JNK aktivasyonu ile uyarılan en yaygın biyolojik yanıt apoptozdur ve germ hücresi apoptozunun da JNK aktivasyonunu içerdiği gösterilmiştir (96). JNK apoptozu iki ayrı mekanizma ile tetikleyebilir:

- Aktivatör Protein-1 (AP-1)'in aktivasyonu ile c-Jun ve Aktive Edici Transkripsiyon Faktör-2 (ATF-2)'nin fosforilasyonunu teşvik edebilir veya
- Fas/FasL sinyal yolağı ile ilgili proteinlerin sentezlenmesini sağlayarak kaspaz 8'in ve kaspaz 3'ün aktivasyonunu teşvik edebilir (101).

Uehara ve ark. JNK'nın karaciğer İ/R hasarında aktive olduğunu ve JNK baskılanmasının İ/R hasarını azalttığını belirtmiştir. JNK inhibitörleri hem nekroz hem de apoptozu azaltmıştır (102). JNK'nın üç izoformu da testiste bulunur ve JNK1 ve 2'nin Sertoli ve germ hücrelerinde varlıkları tanımlanmıştır (96). Minutoli ve ark. yaptıkları bir çalışmada JNK'nın testiküler iskeminin patogenezinde rolü olduğunu ileri sürmüştür (3). JNK'lar iskemi sırasında aktif değildir, daha çok reperfüzyon sırasında aktiftir (103). JNK aktivasyonu, testisin reperfüzyonundan sonra TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin üretimi ile korelasyon gösterir. TNF- α , TNFR1 ile JNK aktivasyonuna yol açar (2).

2.6.3. p38 mitojenle aktive protein kinaz (p38 MAPK)

İlk olarak 1994 yılında tanımlanan p38 MAPK, 38 kDa'luk bir polipeptiddir (104). p38 MAPK'ların α , β , γ ve δ olmak üzere 4 izoformu bulunur. p38 MAPK, ozmolarite veya metabolizma değişiklikleri, DNA hasarı, ısı şoku, iskemi, inflamatuvar sitokinler, UV ışınlanması ve oksidatif stres gibi çeşitli hücrel ve çevresel streslere karşı eş zamanlı olarak aktive edilir (95). p38 MAPK aktivasyonu genellikle inflamasyon veya apoptoz ile sonuçlanır, fakat aynı zamanda hücre çoğalması, farklılaşması, adezyonu ve göçü dahil olmak üzere diğer hücrel fonksiyonları da düzenler (96). p38 MAPK'nın hücredeki rolü, hücre tipine ve uyarana bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Hücre büyümesini ve sağ kalımı arttırdığı gibi hücre ölümünü de teşvik ettiği gösterilmiştir (94).

p38 MAPK iskemi sırasında aktiflenir ve reperfüzyon boyunca aktif kalır (103). p38 MAPK'nın iskemi sonrası karaciğer hasarında inflamatuvar sitokin ekspresyonunu indükleyerek önemli rol oynadığı gösterilmiştir (105). İ/R hasarı

modellerinde artan TNF- α düzeylerinin, p38 MAPK aktivasyonuna neden olduğu ve bu durumu takiben hasara uğrayan organda apoptoz artışı görüldüğü bildirilmektedir (2). Böbreklerde İ/R hasarında p38 MAPK'nın SOR tarafından aktivasyonu TNF- α indüksiyonuna yol açar (106). Buna ek olarak, p38 MAPK inhibisyonunun İ/R hasarını azalttığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (107). Minutoli ve ark.p38 MAPK'm testis İ/R hasarında da önemli rol oynayabileceğini bildirmektedirler (108).

Ranawat ve ark. testiste yaptıkları çalışmada p38 MAPK'nın tüm spermatogenik evrelerde yer aldığını ve spermatogenezin düzgün ilerlemesi için önemli olduğunu göstermiştir. Çalışmalarında p38 MAPK'nın oksidatif stres altında ekspresyonunun modüle olduğunu ve kaspaz-8'in aktive olması ile testis hücrelerinde apoptoz meydana geldiğini belirtmişlerdir (109).

2.7. Isı Şok Protein 70 (HSP70)

Isı şok proteinleri (HSP), ilk kez İtalyan bilim adamı Ritossa ve ark.'nın 1962 yılında yaptığı çalışmada ısı artışı ile meyve sineği *Drosophila Melanogaster*'ın tükürük bezi kromozomlarında aşırı transkripsiyonel aktivite ile kromozomal yapılar gözlemlenmesi sonucu ortaya çıkmıştır (110). HSP, Ritossa ve ark.'nın çalışmasından 12 yıl sonra Tissieres ve ark. "ısı şoku ile artan gen ürünü" şeklinde adlandırmıştır (111). Birçok çalışma, HSP'lerin stres koşulları altında hücrelerin hayatta kalması için önemli olduğunu göstermiştir (112-114).

Protein denatürasyonuna yol açan koşullar, biyolojik sistemlerin bütünlüğünü ve hayatta kalmasını sürekli olarak tehdit eder. Protein denatürasyonuna karşı koymak için hücreler, hücrel stres tepkisi gibi güçlü savunma mekanizmaları ile donatılmıştır (115). Yüksek ısı, anoksi, oksitleyici ajanlar, viral enfeksiyonlarla hücrenin enfekte olması, ağır metaller, IFN- γ uyarımı, glikoz yokluğu HSP'lerin sentezine, oluşan HSP'ler de çevresel faktörler değıştikçe hücrede farklı adaptasyonların oluşmasına neden olur. Bu da HSP'nin sadece ısı şoku ile değil hücrede stres oluşturan değışik ajanlarla da uyarıldığını gösterir ve "stres proteinleri" olarak da adlandırılmasını sağlar, bakterive tüm ökaryotların hücrelerinde bulunur (10). HSP'ler moleköl ağırlıkları, yapılarına ve fonksiyonlarına göre beş sınıfa ayrılır. Bunlar HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 ve küçük ısı şok proteinleridir. Farklı sınıf HSP'lerin uygun protein montajı, katlanma ve yer değıştirmeyi içeren farklı görevleri

vardır. HSP70, HSP60 ve küçük ısı şok proteinleri protein agregasyonunu önler ve protein katlanmasına yardımcı olur. HSP100 agregasyona uğramış proteinlerin yeniden dağılımını sağlar. HSP90 proteinlerin olgunlaşması ve aktivasyonunda temel bir rol oynamaktadır (116). HSP70, geniş doku dağılımı, birçok molekül ile etkileşime girme kabiliyeti ve potansiyel antiinflamatuvar özellikleri nedeniyle en sık çalışılan ısı şok proteindir (117).

HSP70 insan vücudunda iyi tanımlanmış, neredeyse tüm hücre içi kompartmanlarında bulunan bir şaperon proteindir ve 70kDa molekül ağırlığına sahiptir (118). HSP70 proteinleri, 45 kDa'lık bir N-terminal ATPaz alanından ve yaklaşık olarak 25 kDa'lık bir C-terminal substrat bağlama alanından oluşur. C-terminal substrat bağlama alanı da 15 kDa'lık korunan bir substrat bağlama alanı ve 10 kDa'lık daha az korunumlu bir C-terminal alt alanından oluşur (119).

HSP70, organellar ve sekretuar proteinlerin membran translokasyonu ve düzenleyici proteinlerin aktivitesinin kontrolü dahil olmak üzere yeni sentezlenen proteinlerin birleştirilmesi ve katlanması, yanlış katlanmış ve toplanmış proteinlerin yeniden katlanması sürecine yardımcı olur (119). HSP70 hücre döngüsünün farklı fazları boyunca hücre büyüme ve farklılaşmasında fonksiyon gösterir (120). Anormal şekilde katlanan proteinleri bağlamakla kalmaz, aynı zamanda apoptozda rol oynayan artan sayıda proteini bağlar ve fonksiyonlarını düzenler. HSP70 sinyal transdüksiyon yollarında çok genel bir rol oynar; hücrelerin ve organizmaların stresli koşullara adaptasyonu sağlar (121).

HSP70 şaperonları sinyal iletimi, hücre döngüsü düzenlemesi, farklılaşma ve programlanmış hücre ölümüne katılırlar; bu nedenle onkogeneze, nörodejeneratif ve otoimmün hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve yaşlanma gibi gelişimsel ve patolojik süreçler için önemli faktörlerdir (119). Hipertermi, kanama, epilepsi, iskemi ve çeşitli nörotoksik uyarılarda HSP70 ekspresyonu farklı cevaplar gösterir (10). Birçok malign tümör hücresinde bol miktarda HSP70 ekspresyonu edilir ve bu durum artmış malignite ve tedaviye direnç ile korelasyon gösterir. Kanser hücrelerinde HSP70 seviyelerinin down-regülasyonu tümör hücresinin ölümünü tetikler (122). Aşırı apoptoz ile karakterize Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı ve spinoserebellar ataksi gibi nörodejeneratif hastalıklarda HSP70 aşırı ekspresyona uğradığı ve bu hastalıklara bağlı nörodejeneratif semptomların üstesinden gelebileceği bildirilmiştir (119). Borges ve ark. çeşitli yollar üzerinden HSP70'in antiinflamatuvar etkisini gösterirken (117), başka bir araştırmacı grubu potansiyel

olarak pro-inflamatuvar etkilerinin olduğunu (13) ve HSP70'in TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını artırabileceğini bildirmişlerdir (11).

HSP70, moleküler koruyucu olarak ısı şoku, iskemi ve inflamasyon gibi çeşitli streslere cevap verebilir (123). Yapılan çalışmalar, HSP70'in stres dönemleri boyunca iskeminin patogeneze ve hücre koruyuculuğuna katkıda bulunduğunu gösterir (11). Yao ve ark. yaptıkları bir çalışmada miyokard İ/R hasarında düşük doz lipopolisakkarit ön tedavisi ile HSP70 seviyelerinin önemli ölçüde yükseldiğini ve bunun da NF- κ B translokasyonunu dramatik olarak inhibe ettiğini bildirmektedir (124). NF- κ B'nin inhibisyonu, inflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) salınmasını zayıflatmış ve İ/R hasarını takiben miyokard ve infarkt alanının apoptozu azalmıştır. HSP70'in, İ/R ile uyarılan oksidatif stresi düzelttiği belirtilmiştir (124). HSP70 serebral iskemide nöroprotektif etkiye sahiptir (11). Soriano ve ark. 10 dakika fokal iskeminin, orta serebral arter bölgesi boyunca artmış HSP70 ekspresyonu ile sonuçlandığını bildirmektedir (125). Zhan ve ark. sıçanlarda geçici iskemik ataklar modelinde damar oklüzyonunu takiben, HSP70'in tüm orta serebral arter bölgesi boyunca nöronlarda indüklendiğini göstermiştir (126). Serebral iskemi modelinde HSP70 infüzyonunun erken safhada proinflamatuvar moleküllerin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) üretimini daha da arttırdığı, buna karşın aynı enjeksiyonun sonraki aşamasında devam eden antiinflamatuvar sitokin (IL-10 ve IL-1 reseptör antagonisti) üretimini artırdığı gözlenmiştir (11). Bu hipotezin lehine, HSP70'in antiinflamatuvar aktivitesini destekleyen daha güçlü verilere sahip çalışmalar da bulunmaktadır (12). Böbrek İ/R hasarında HSP70 seviyeleri artmıştır, sitoprotektif etki göstererek normal hücresel fonksiyonları yerine getirmeye çalıştığı belirlenmiştir (13). HSP70 böbrek nakli sonrası iskeminin geri dönüşümüne katkı sağlayarak iyileşme sürecini hızlandırmıştır (118). Sakai ve ark. stres kaynaklı karaciğer İ/R hasarında HSP70'in hem JNK yolağını hem de kaspaz-3 yolağını etkileyerek apoptozu önlediğini göstermiştir. HSP70 aracılı sitoprotektif fonksiyon, kaspaz aktivasyonunun inhibisyonunu içermiştir. HSP70 karaciğer İ/R hasarında hücre sağ kalımını sağlamıştır. Mesane ve prostat İ/R hasarında HSP70 ekspresyonu artmış ve doku hasarının iyileşmesine katkı sağlamıştır (14-15). HSP70'in koruyucu etkisinin yanında apoptozu doğrudan antagonize ettiği de bildirilmiştir (11).

HSP70 pek çok dokuda olduğu gibi testis doku hücrelerinde de eksprese edilir. HSP70, spermatozoidler ve spermatidlerde üretilir. Testiste HSP70 geninin aktivitesi, embriyo gelişiminin erken döneminde, yani morfogenez başladığında

görülmektedir (127). Testis germ ve Sertoli hücrelerinin detorsiyondan sonra HSP70 ürettiği görülmüştür (128). Tamamura ve ark. sıçan testis İ/R hasarında HSP70 aşırı ekspresyonunu gözlemiştir (15). Tsounapi ve ark. da testiküler İ/R hasarında hem ipsilateral hem de kontraateral testiste HSP70 ekspresyonunda artış olduğunu belirtmiştir. Fakat testiküler İ/R hasarında HSP70'in görev ve etkileri henüz aydınlatılamamıştır (16).

HSP70'in aşırı üretimi, TNF- α gibi apoptozu indükleyen ajanlara karşı artan direnç yolu açarken, HSP70 seviyelerinin düşmesi bu ajanlara karşı duyarlılığı artırmaktadır (119). Yapılan pek çok çalışmada, HSP70'in TNF- α kaynaklı apoptozu karşı hücreleri koruduğu görülmüştür (17, 129). HSP70'in indüksiyonu TNF- α üretimini etkili bir şekilde inhibe eder (130), bu inhibisyon protein denatürasyonunu önler, İ/R sırasında hücre canlılığı korur ve İ/R hasarı sonrası hücre iyileşmeyi destekler (18). TNF- α 'nın da HSP70 üretimini artırdığı bildirilmektedir (52). Dokladny ve ark. HSP70 upregülasyonu ile proinflamatuvar sitokin ekspresyonu baskılanmasının, İkB degradasyonu inhibisyonu ve NF- κ B nükleer translokasyonu ile ilişkili olduğunu göstermiştir (131). Bir dizi çalışma ısı şokunun veya yüksek HSP70 varlığının NF- κ B aktivitesini baskıladığını göstermiştir (51). HSP70, TNF- α üretimini inhibe ederek hücre sağ kalımını desteklerken; TNF- α kaynaklı NF- κ B aktivasyonunu inhibe eder ve NF- κ B'nin antiapoptotik etkisini engeller. HSP70, İKK aktivasyonunu inhibe ederek İkB'nin fosforilasyonunu ve degradasyonunu ve bunu takiben de NF- κ B aktivasyonunu ve NF- κ B'ye bağlı olarak proinflamatuvar sitokin ekspresyonunu inhibe eder (132). NF- κ B aktivitesinin HSP70 aracılığıyla azaltılması TNF- α stimülasyonuna bağlı hücre ölümü ve sağ kalımı arasındaki dengenin hücre ölümü lehine kaymasına yol açmıştır (51). İn vitro olarak yapılan bir çalışmada, HSP70'in MAPK inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir. HSP70 üretimi stres kaynaklı artan JNK ve p38 MAPK aktivasyonunu inhibe eder ve böylece apoptozu baskılar (121). Hücre ölümünü JNK sinyal yolundan aktive eden tüm streslerden sonra ortaya çıkan apoptoz HSP70 tarafından bastırılabilir. Bu veriler, JNK'nin veya JNK aktivitesi regülatörlerinin apoptoz yolağındaki aktiviteleri üzerinde HSP70'in önleyici etkilerinin olduğunu göstermektedir (133). HSP70, p38 MAPK aktivasyonunu önleyerek hücrelerin ve organizmaların stresli koşullara adaptasyonuna neden olur (121). Gabai ve ark. HSP70'in İ/R hasarındaki koruyucu etkisinin, JNK ve p38 MAPK'nın inhibisyonuyla ilişkili olduğunu ifade etmiştir (133). HSP70, apoptozda ERK1/2 fosforilasyonu üzerinde düzenleyici fonksiyonlar

sergiler. HSP70 aktivasyonu ERK1/2'nin aktivasyonuna neden olur. TNF ve HSP70 proteinlerinin, proapoptotik ve antiapoptotik proteinleri ve ERK1/2 sinyalini düzenleyerek protektif etkiler sağlayabildiđi gösterilmiştir (134).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar

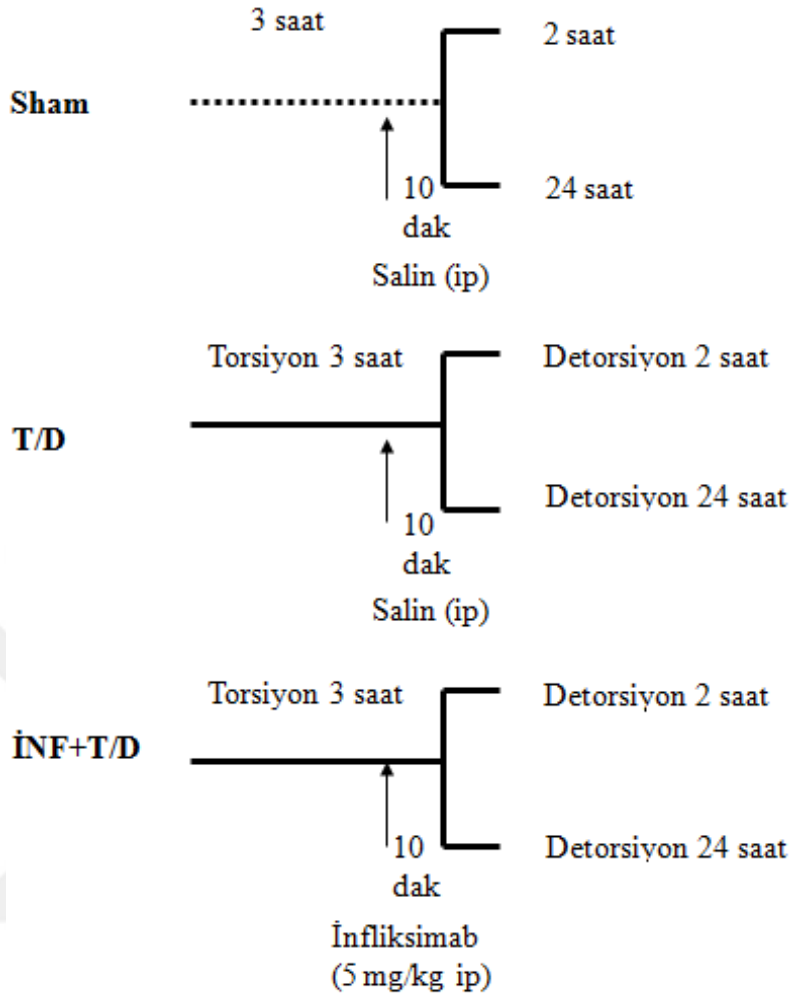
Deneyleerde, Bülent Ecevit Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde üretilen Wistar cinsi 250-350 gram (g) ağırlığında 42 adet (n=7)erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 12 saat gün ışığı ve 12 saat karanlık olan 21 ± 2 C° sıcaklıkta, % 60 ± 5 nem oranındaki odalarda barındırıldılar. Hayvanlar pellet yem ve çeşme suyu verilerek beslendiler. Hayvanlar üzerinde yapılan uygulamalar ve protokoller için, "Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'ndan" onay alındı (Ek:1.).

3.2. Kimyasallar

Deneyleerde infiliksımab (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.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Sıçanlar rastgele olarak SHAM, torsiyon/detorsiyon (T/D) ve infiliksımab+T/D (İNF+T/D) olmak üzere 3 ana gruba ayrıldı. Her grup kendi içinde 2 saat süre ve 24 saat süre ile detorsiyon uygulanacak şekilde tekrar ikiye ayrıldı (Şekil 2). Testis ağırlıkları ve testis dokularında HSP70 düzeylerini ölçmek için sıçanların bir kısmına 2 saat süre ile detorsiyon uygulandı. Testis ağırlıkları, testis dokularının histopatolojik olarak değerlendirilmesi ve immünohistokimyasal boyama yöntemi ile değerlendirilmesi için ise 24 saat süre ile detorsiyon uygulandı.



Şekil 2. Deney grupları.

3.4. Testiküler Torsiyon Detorsiyon (T/D) İşlemi

Sıçanlara 50 mg/kg tiyopental sodyum intraperitoneal (i.p.) verilerek anestezi edildi. Sıçanlara abdominal insizyon uygulanarak sağ testisleri dışarı çıkarılıp spermatik kord saat yönünde 720⁰ döndürülüp batına sabitlenildi. Torsiyon 3 saat sürdürüldükten sonra spermatik korda detorsiyon uygulanarak testisler skrotuma yerleştirildi. Tedavi edilecek gruba infliximab (5 mg/kg), detorsiyondan 10 dak önce tek doz i.p. olarak uygulandı. Detorsiyon sürelerinin bitiminde sıçanlar tekrar anestezi edilerek, torsiyone edilen taraftaki (ipsilateral) testis dokuları çıkarıldı. SHAM grubundaki sıçanlara spermatik kordun T/D'si hariç aynı işlemler uygulandı.

3.5. Testis Ağırlıklarının Ölçümü

Detorsiyon işleminin 2. ve 24. saatinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testislerin ağırlıkları hassas terazi ile ölçüldü.

3.6. Testis Dokularında HSP70 Düzeylerinin Ölçülmesi

Detorsiyonun 2. saatinde çıkarılan testislerde HSP70 düzeyleri ticari firmanın (Cusabio, Wuhan, China) talimat ve kılavuzlarına göre ELISA kiti kullanılarak değerlendirildi. Ölçüm 62.5-4000 pikogram/mililitre (pg/ml) kalibrasyon aralığı ve 15.6 pg/ml analitik hassasiyetle yapıldı. Kendi içinde ve totalde varyasyon katsayısının değerleri sırasıyla <math>< 8\%</math> ve <math>< 10\%</math> idi. Sonuçlar tablolarda nanogram/miligram (ng/mg) protein olarak ifade edildi.

3.7. Testis Dokularının Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan ipsilateral testis dokularının her biri makroskopik olarak tariflenip, %10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonuna alınarak 24 saat fikse edildi. Testis dokuları transvers olarak iki eşit parçaya ayrıldı. Tüm örnekler histopatolojik inceleme için rutin doku takibi işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü. Parafin bloklardan elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler hematoksilin-eozin (H&E) boyası ile boyandı.

Histopatolojik değerlendirmeler Zeiss marka Axiolab A1 model ışık mikroskobu (Carl Zeiss, Almanya) altında, H&E boyalı preparatlar üzerinde gerçekleştirildi. Ön 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 tübüllerdeki histolojik bulgular Cosentino ve ark. (1986)'nın yapmış olduğu skorlama sistemine uygun olarak 1-4 arasında değişen bir skalada skorlandı (135) (Tablo 2). Dörtüç büyütmede 10 ardışık alanda görüntülenen seminifer tübüller ve interstisyel bağ dokusu skorlanarak ortalamaları alındı.

Tablo 2. Testis Hasarını Değerlendirmede Temel Alınan Histopatolojik Kriterler (A) ve Skorlama Sistemi (B) (135).

A)	Seminifer Tübüller	İnterstisyum
	Spermatozoa ve spermatidlerin kaybı	Leydig hücre proliferasyonu
	Germ hücre tabakalarının yokluğu	Ödem
	Germ hücre tabakalarının dejenerasyonu	Hemoraji
	Germ hücre tabakalarının düzensizleşmesi	Granüloma
	Tübüllerin parçalanması	Fibrozis
	Parçalanmış tübüllerde Leydig hücre reaksiyonları	
	Miyoid hücre tabakasının kalınlaşması	

B) Skor	Histolojik bulgular
1	Germ hücrelerin normal dizilimi ile karakterli normal testis parankimi
2	Germ hücrelerin diziliminde hafif derecede bozulma ve hücrelerde kohezyon kaybı ile karakterli testis parankimi
3	Germ hücre nükleusları piknotik ve büzülmüş görünümde; hücreler seminifer tubül lümenlerine dökülmüş, seminifer tubül sınırları belirginliğini kaybetmeye başlamış
4	Germ hücrelerinde koagülasyon nekrozu ile karakterli testis parankimi

*Cosentino et al. (135)

3.8. Testis Dokularında NF- κ B ve MAPK Yolaklarının İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi ile Değerlendirilmesi

Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan testis dokularında NF- κ B ve MAPKK aktivasyonuna bağlı olarak oluşan JNK, p38 MAPK ve ERK yolakları immünohistokimyasal boyama yapılarak değerlendirildi. Testis dokusundan 4 μ m 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 fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde 3 defa çalkalandıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesini önlemek amacıyla 15 dak süreyle %3'lük hidrojenperoksit ile muamele edildi. Nonspesifik bağlanmayı önlemek amacıyla 5 dak'lık Ultra V block (LabVision, TA-015-UB) uygulamasını takiben 1/100 dilüsyonlarda hazırlanan NF- κ B (p65), JNK, p38 MAPK ve ERK primer antikörleri kesitlere nemli bir ortamda 1 saat oda sıcaklığında 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) uygulandı, zıt boyama Mayer's hematoksilen ile yapıldı. Kesitler alkol serilerinden geçirilip, ksilen ile muamale edildikten sonra entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Zeiss marka Axiolab A1 model ışık mikroskobu (Carl Zeiss, Almanya) altında değerlendirilerek bulgular fotoğraflandı.

3.9. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Veriler aritmetik ortalama \pm standart sapma olarak sunuldu. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Shapiro Wilk testi ile bakıldı. Veriler normal dağılım göstermediği için gruplar arası sayısal ölçümlerde farklılık olup olmadığı Kruskal-Wallis varyans analizi kullanılarak değerlendirildikten sonra, ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U Testi ile yapıldı. Sağ ve sol testislerin parametrik olmayan değerlerinin karşılaştırılmasında ise Wilcoxon testi kullanıldı. P <0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Testis Ağırlıkları

Deney hayvanlarından detorsiyonun 2. ve 24. saatinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testis ağırlıkları ölçülmüştür (Tablo 3).

Tablo 3. Detorsiyonun 2. ve 24. Saatinde İpsilateral ve Kontralateral Testislerin Ağırlıkları.

Gruplar	Ağırlık (g)			
	2 saat		24 saat	
	İpsilateral Testis	Kontralateral testis	İpsilateral testis	Kontralateral testis
SHAM	1.49±0.065	1.52±0.070	1.36±0.367	1.21±0.468
T/D	1.67±0.082 ^{a*}	1.48±0.086	1.48±0.200	1.43±0.530
İNF+T/D	1.77±0.208 ^{a*}	1.55±0.154	1.55±0.280	1.52±0.089

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

Detorsiyonun 2. saatinde, grupların ipsilateral taraftaki testis ağırlıkları ortalamaları karşılaştırıldığında, T/D ve İNF+T/D gruplarının ortalamaları SHAM grubuna göre yüksek bulunmuştur (sırasıyla p=0.002 ve p=0.003). Ancak, grupların kontralateral taraftaki testis ağırlıkları ortalamaları arasında istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. İpsilateral ve kontralateral testis ağırlıkları ortalamaları karşılaştırıldığında, SHAM grubunun ortalamaları arasında istatistiksel fark bulunmazken; T/D (p=0.018) ve İNF+T/D (p=0.018) gruplarının ortalamaları ipsilateral tarafta daha yüksek bulunmuştur.

Detorsiyonun 24. saatinde, grupların testis ağırlıklarının ortalamaları hem gruplar arasında hem de ipsilateral ve kontralateral testisler arasında herhangi bir istatistiksel farklılık göstermemiştir.

4.2. Testis Dokularında HSP70 Düzeyleri

Detorsiyonun 2. saatinde çıkarılan ipsilateral ve kontralateral testis dokularında HSP70 düzeyleri ölçülmüştür (Tablo 4).

HSP70 düzeyleri değerlendirildiğinde, hem SHAM, T/D ve İNF+T/D gruplarının düzeyleri arasında hem de bu grupların ipsilateral ve kontralateral testis dokularının düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Tablo 4. Detorsiyonun 2. Saatinde Testis Dokularındaki HSP70 Düzeyleri.

Gruplar	HSP70 proteini (ng/mg)	
	İpsilateral testis	Kontralateral testis
SHAM	3.47 ± 0.728	3.63 ± 1.128
T/D	3.07 ± 0.365	2.86 ± 0.568
İNF+ T/D	3.71 ± 0.755	2.96 ± 0.632

Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak sunuldu.

4.3. Testis Dokularındaki Histopatolojik Bulgular

Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan testis dokuları Cosentino skorlaması doğrultusunda değerlendirilmiştir (Tablo 5).

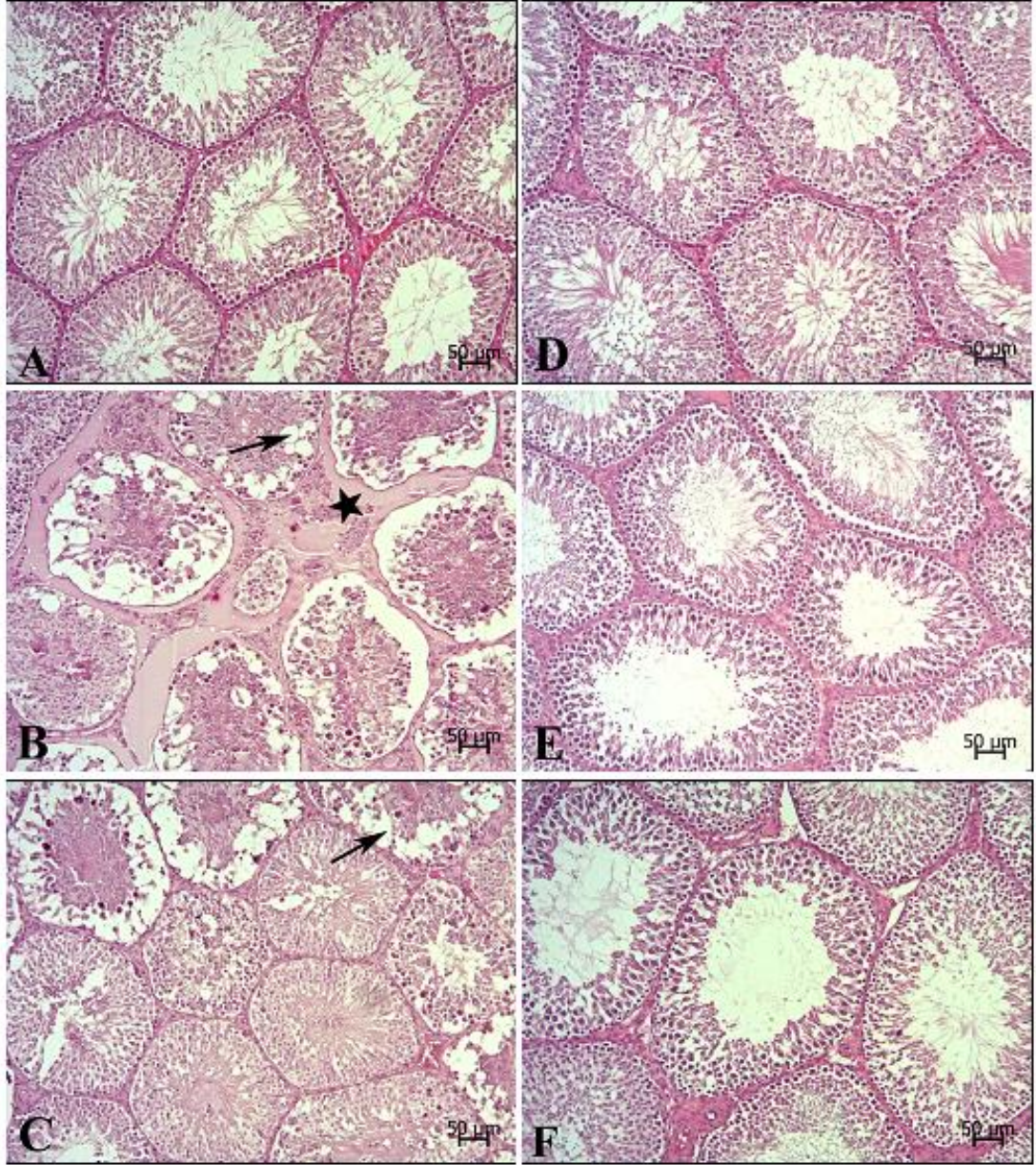
Tablo 5. Detorsiyonun 24. Saatinde İpsilateral Testis Dokularının Histopatolojik Skorlaması.

Gruplar	Skor
SHAM	2.00 ± 1.414
T/D	18.57 ± 5.318 ^a
İNF+ T/D	9.29 ± 6.264 ^a

Veriler aritmetik ortalama ± standart sapma olarak sunuldu. ^a: p<0.05 SHAM'den gösterir.

İpsilateral Testis

Kontralateral Testis



Şekil 3. Detorsiyonun 24. saatindeki; SHAM, T/D ve İNF+ T/D gruplarına ait ipsilateral ve kontralateral testislerin morfolojisi. **A.** SHAM grubu, ipsilateral testis dokusunda normal morfoloji izlenmekte. **B.** T/D grubu, 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. İNF tedavisine bağlı olarak tübüllerin bir kısmının korunduğu izlenmekte. **D** (SHAM kontralateral), **E** (T/D kontralateral) ve **F** (İNF+ T/D) kontralateral testislerinde normal morfolojik yapı izlenmekte. H-E, scale bar: 50 µm.

İpsilateral testis dokuları histopatolojik olarak incelendiğinde; SHAM grubunun testis dokularında normal morfoloji ve matür spermatogenez izlenmiştir (Şekil 3A). T/D grubunun Cosentino skor ortalaması SHAM grubuna göre yüksek bulunmuştur ($p=0.002$) ve interstisyel bağ dokusunda peritübüler hyalinizasyon ve yoğunluk artışı, seminifer tübüllerde yer alan hücrelerde disorganizasyon ile birlikte vakuolizasyon ve spermatogonya matürasyonunda belirgin azalma gözlenmiştir (Şekil 3B). İnfliksımab ile tedavi edilen T/D grubunun Cosentino skor ortalaması (T/D grubu gibi) SHAM grubunun ortalamasına göre yüksek bulunmuştur ($p=0.006$). Bu değer T/D grubunun skor ortalamasına göre düşük olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı değildir. İNF+T/D grubunda interstisyel bağ dokusu normal yapıda izlenmesine rağmen, tübüllerin bazılarında dejeneratif değişiklikler ve vakuolizasyonlar gözlenirken, bir kısmının ise korunduğu izlenmiştir (Şekil 3C).

Kontralateral testis dokularında (Şekil 3D-E-F) normal morfolojik yapı ve matür spermatogenez izlendiği için skorlama yapılmamıştır.

4.4. Testis Dokularında NF- κ B ve MAPK Yolaklarının İmmünohistokimyasal Boyanma Bulguları

Detorsiyonun 24. saatinde çıkarılan testis dokularında NF- κ B ve MAPKK aktivasyonuna bağlı oluşan JNK, p38 MAPK ve ERK yolakları immünohistokimyasal boyama ile değerlendirilmiştir.

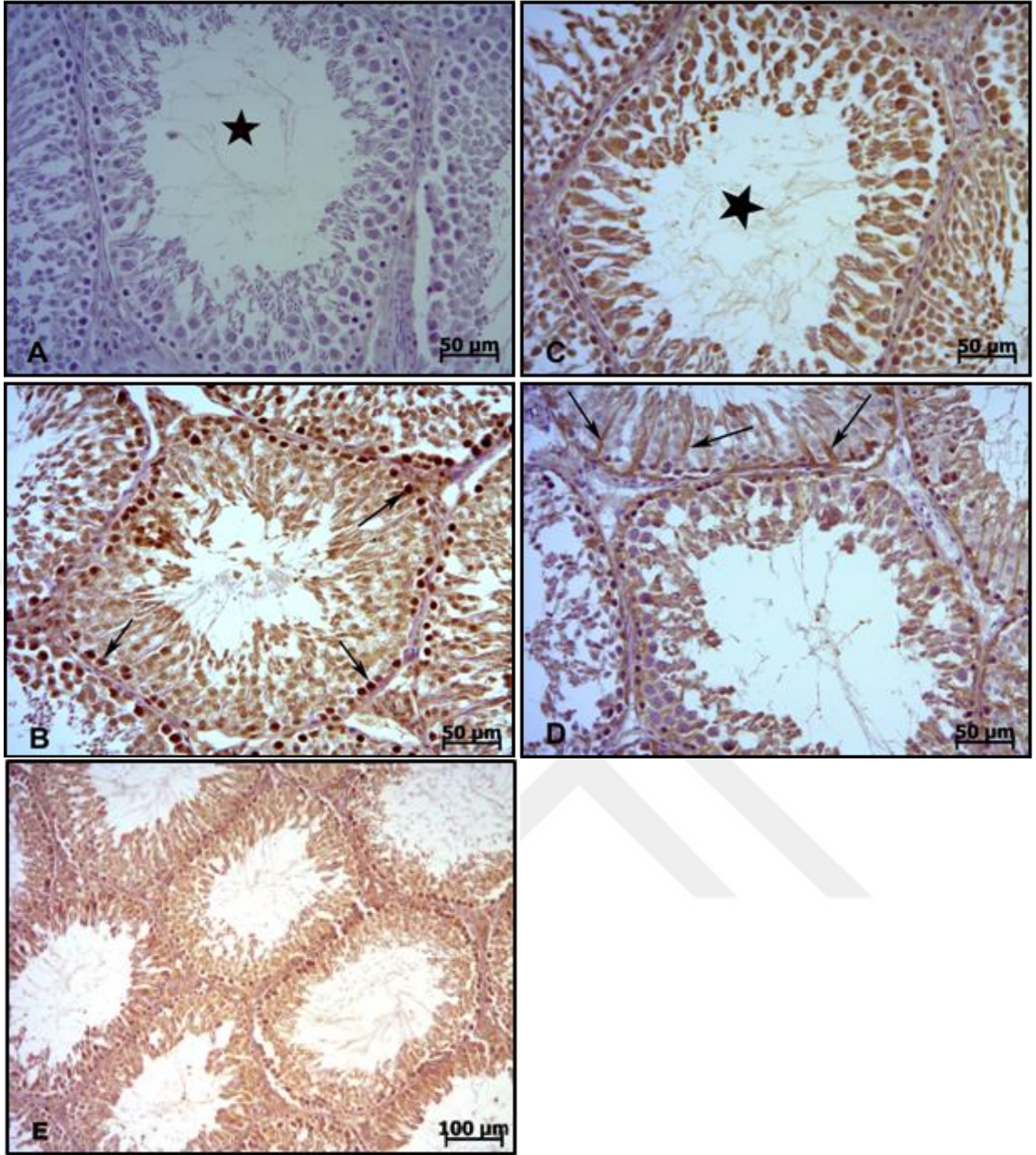
SHAM grubuna ait testis dokuları JNK antikoruna ile boyandığında, özellikle spermatogonyumlarda (oklar) şiddetli immün reaktivite izlenmiştir (Şekil 4B). p38 MAPK antikoruna ile seminifer tübüldeki spermatogenik seriye ait hücreleri pozitif boyanmıştır (Şekil 4C). ERK antikoruna ile seminifer tübüldeki Sertoli hücreleri (oklar) pozitif immün reaktivite göstermiştir (Şekil 4D). NF- κ B (p65) antikoruna ile spermatogonyumlarda kuvvetli boyanma izlenmiştir (Şekil 4E).

T/D grubuna ait testis dokularında JNK ile özellikle seminifer tübüllere yakın spermatidlerde şiddetli immünboyanma izlenmiştir (Şekil 5A). p38 MAPK ile seminifer tübül lümenindeki sperm kümesi (yıldız) ve lümene yakın spermatositlerde (oklar) şiddetli boyanmalar gözlenmişken spermatidlerde herhangi bir reaksiyon izlenmemiştir (Şekil 5B). ERK antikoruna ile seminifer tübül lümenine yakın spermatogenik seriye ait hücrelerde orta şiddette boyanma görülmüş, interstisyel alanda ise herhangi bir reaksiyon izlenmemiştir (Şekil 5D). NF- κ B (p65) antikoruna ile

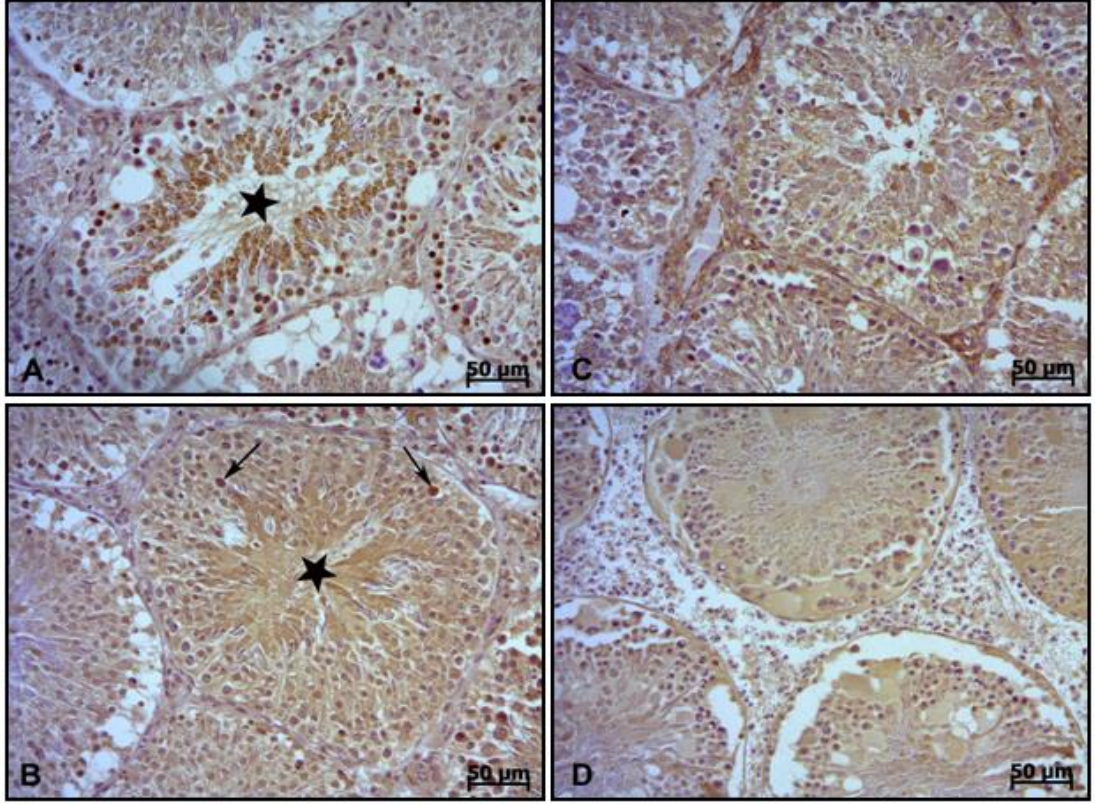
immünboyanma seminifer tübül lümenine yakın spermatogenik seriye ait hücrelerde lokalizedir (Şekil 5C).

İnfiliksimab ile tedavi edilen T/D grubuna ait testis dokularında JNK ile seminifer tübüldeki spermatogenik seriye ait hücrelerde ve interstisyel alanda pozitif reaksiyon görülmüştür (Şekil 6B). p38 MAPK ile seminifer tübüldeki primer spermatositlerde (oklar) kuvvetli ekspresyon izlenmiştir (Şekil 6C). ERK ile seminifer tübül lümeninde ve interstisyel alanda orta şiddette immün reaktivite görülmüştür (Şekil 6E). NF-κB (p65) ile seminifer tübülde spermatogenik seriye ait olan hücrelerde pozitif reaksiyon tespit edilmiştir (Şekil 6D).

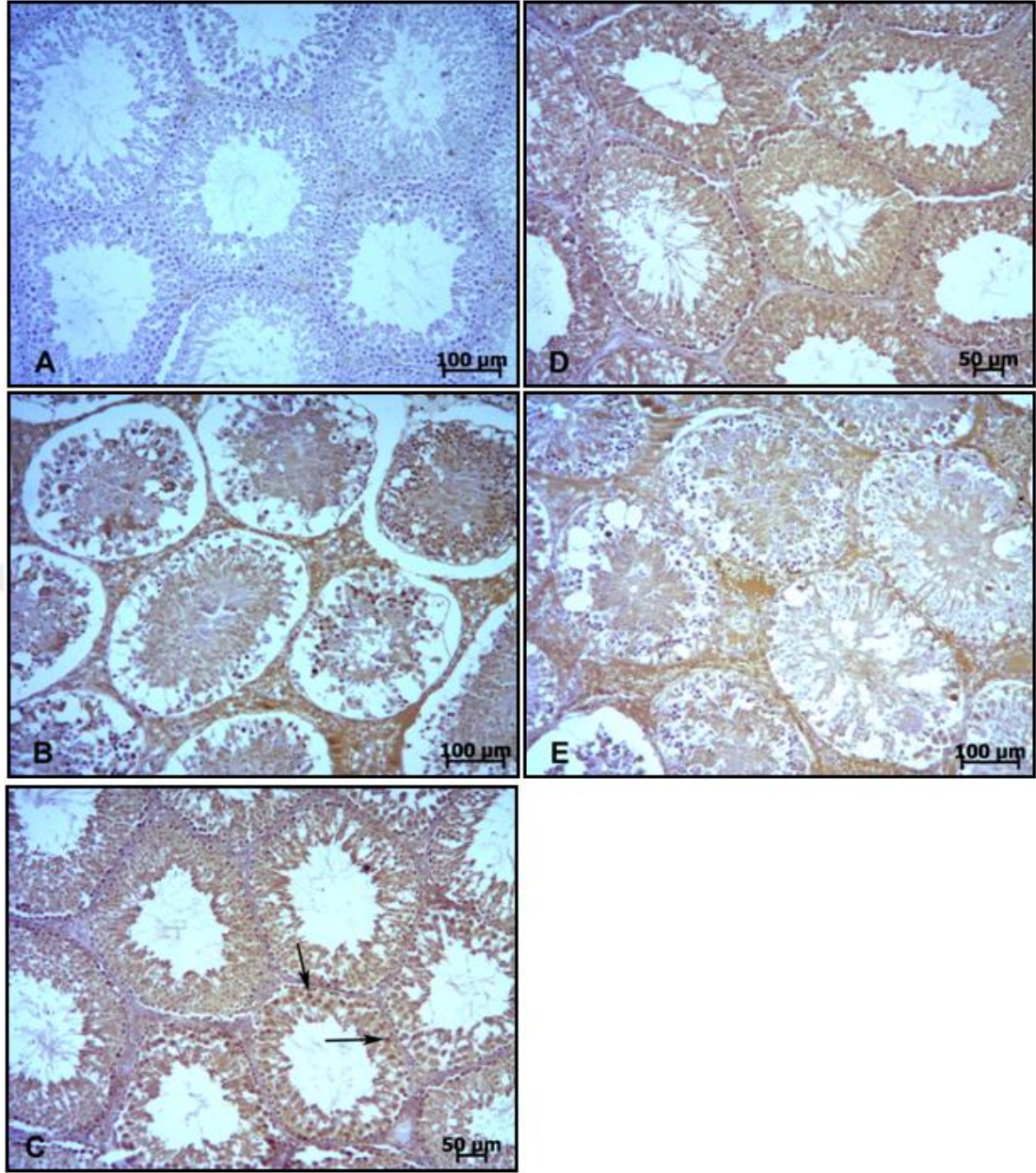




Şekil 4. SHAM grubuna ait detorsiyonun 24. saatindeki testis dokularının immünohistokimyasal boyama ile değerlendirilmeleri. **A.** Negatif kontrol olarak boyanan testis dokusunda bir seminifer tübüle ait (yıldız) görüntü: Spermatogenez serisine ait hücrelerin hiçbirinde pozitif boyanma izlenmemektedir, **B.** JNK boyaması yapılan bu kesitte özellikle spermatogonyumlarda (oklar) şiddetli immün reaktivite izlenmektedir, **C.** p38 MAPK antikoru ile boyanmış seminifer tübüldeki spermatogenez serisine ait hücrelerin pozitif boyandığı izlenmektedir, **D.** ERK antikoru ile boyanmış seminifer tübülde ilginç olarak Sertoli hücreleri (oklar) pozitif immün reaktivite göstermektedir. **E.** NF- κ B (p65) antikoru ile boyanmış testis dokusunda spermatogonyumlarda kuvvetli boyanma izlenmektedir.



Şekil 5. T/D grubuna ait detorsiyonun 24. saatindeki testis dokularının immünohistokimyasal boyama ile değerlendirilmeleri. **A.** JNK boyaması yapılan bu kesitte özellikle seminifer tübülüne yakın spermatidlerde şiddetli boyanma görülmektedir, **B.** p38 MAPK boyaması yapılan bu kesitte özellikle seminifer tübül lümenindeki sperm kümesi (yıldız) ve lümeneye yakın spermatositlerde (oklar) şiddetli boyanma izlenmektedir, burada spermatidlerde herhangi bir reaksiyon görülmemektedir, **C.** NF- κ B (p65) boyaması yapılan bu kesitte seminifer tübül lümenine yakın spermatogenik seriye ait hücrelerde orta şiddette boyanma görülmektedir, **D.** ERK boyaması yapılan bu kesitte seminifer tübül lümenine yakın spermatogenik seriye ait hücrelerde orta şiddette boyanma görülmekte, interstisyel alanda herhangi bir reaksiyon görülmemektedir.



Şekil 6. İNF+T/D grubuna ait detorsiyonun 24. saatindeki testis dokularının immünohistokimyasal boyama ile değerlendirilmeleri. **A.** Negatif kontrol olarak boyanan testis dokusunda birkaç seminifer tübüle ait görüntü izlenmekte, spermatogenik seriye ait hücrelerin hiçbirinde pozitif boyanma izlenmemektedir, **B.** JNK boyaması yapılan bu kesitte seminifer tübülde spermatogenik seriye ait hücrelerde ve interstisyel alanda pozitif reaksiyon görülmektedir, **C.** p38 MAPK boyaması yapılan bu kesitte seminifer tübülde primer spermatositlerde (oklar) kuvvetli ekspresyon izlenmektedir, **D.** NF- κ B (p65) boyaması yapılan bu kesitte seminifer tübülde spermatogenik seriye ait hücrelerde pozitif reaksiyon görülmektedir, **E.** ERK boyaması yapılan bu kesitte seminifer tübül lümeninde ve interstisyel alanda orta şiddette immün reaktivite görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada testis T/D hasarı patogenezisinde rol oynadığı düşünülen TNF- α aracılı NF- κ B, MAPK yolları immünohistokimyasal boyama ile gösterilirken HSP70 düzeyleri ELISA yöntemi ile ölçüldü. TNF- α aracılı etkiyi değerlendirebilmek için TNF- α inhibitörü İNF kullanıldı. T/D'nin uygulandığı ipsilateral testislerde detorsiyonun 2. saatinde ödeme bağlı ağırlık artışı, detorsiyonun 24. saatinde ise histopatolojik hasarı gösteren Cosentino skorlamasında artış gözlemlendi. Detorsiyonun 2. saatinde testis dokusundaki HSP70 düzeyleri SHAM grubunun düzeylerinden farklı bulunmadı. İNF tedavisi Cosentino skorlaması ve HSP70 düzeyleri üzerinde bir etki göstermedi. Çalışmamızda, T/D uygulanan grupta, detorsiyonun 24. saatinde spermatogenik seriye ait hücrelerde NF- κ B ve ERK ile orta şiddette, seminifer tübül lümenine yakın spermatidlerde JNK ile şiddetli ve lümendeki sperm ve lümeneye yakın spermatositlerde p38 MAPK ile şiddetli immünboyanmalar izlenmiştir, ancak İNF tedavisinin bu immün boyanmanın şiddetini azaltmadığı gözlemlenmiştir.

TNF- α birçok fonksiyonu olan bir sitokindir. TNF- α testiste, Sertoli hücreleri, pakiten spermatositler, yuvarlak spermatidler ve interstisyel alanda bulunan makrofajlar tarafından üretilmektedir. TNF- α 'nın etkilerinin çoğuna aracılık eden TNFR1'in Sertoli ve Leydig hücrelerinde bulunduğu gösterilmiştir (136). TNF- α tarafından TNFR1'in uyarılması kaspaz aktivasyonuna, NF- κ B, Janus kinaz/Sinyal transducer ve transkripsiyon aktivatörü3 (JAK/STAT3) ile JNK ve p38 MAPK gibi yolların aktivasyonuna neden olabilir (136-137). TNF- α hücrelerde aktive ettiği yolağa göre ya hücre ölümüne ya da hücrenin sağ kalımına neden olabilir. TNF- α 'nın düşük düzeylerinin normal testiküler homeostazisi sağladığı, yüksek düzeylerinin patolojik durumlara neden olabileceği bildirilmektedir (39, 138).

Testiküler T/D hasarında TNF- α , IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerinin ve gen ekspresyonlarının arttığını gösteren birçok çalışma vardır; Lysiak ve ark. mürin testislerine uygulanan 2 saatlik torsiyon işlemi sonrası, TNF- α ve IL-1 β ekspresyonlarının detorsiyonun 30. dk.'sında, fosforile JNK gen ekspresyonunun ise hem 30. dk. hem de 2. saatte anlamlı bir şekilde arttığını bildirmişlerdir (2). Minutoli ve ark. sıçanlara uygulanan 1 saat iskemi sonrasında reperfüzyonun 1. saatinde başlayan TNF- α ekspresyonundaki artışın reperfüzyonun 3. saatine kadar sürdüğünü ve 5. saatte bazal değerlere indiğini ve ERK1/2

düzeylerinin reperfüzyonun 10. ve 60. dk.'ları arasında yüksek seyrettiğini rapor etmişlerdir(3). Maghrebi ve ark. sıçanlara 1 saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon uygulama sonrasında, ipsilateral testislerinde TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın düzeylerinin yüksek olduğunu ve aynı zamanda proapoptik olan p53 ve BAX ile inflamasyonun belirleyicisi kabul edilen monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve iNOS genlerinin ekspresyonlarının arttığını da bildirmişlerdir (139). Zhang ve ark. 2 saatlik testis torsiyonu sonrası, detorsiyonun 24. saatinde TNF- α ve IL-1 β genlerinin ekspresyonları ile NF- κ B ekspresyonu, JNK ve p38 MAPK'ların fosforile formlarının arttığını rapor etmişlerdir (140). Yukarıda bahsedilen çalışmalarda araştırmacılar, testiküler T/D hasarında TNF- α ve beraberinde aktive olan yolakların ve proteinlerin rol oynadığını belirtmişlerdir. Biz bu çalışmada, diğer çalışmalardan farklı olarak, testiküler T/D hasarında TNF- α 'nın rolünü belirlemek için TNF- α inhibitörü olan İNF kullandık. Ayrıca, T/D hasarında TNF- α tarafından etkilenen ya da TNF- α 'yı etkilediği ileri sürülen NF- κ B ile ERK1/2, JNK ve p38 MAPK gibi MAPK'ların testis T/D hasarındaki yerini ve TNF- α inhibitörü olan İNF'in bu proteinler, yolaklar üzerindeki etkisini değerlendirmek istedik.

NF- κ B, İ/R ve inflamatuvar süreçlerde önemli bir transkripsiyon faktörüdür. ROS, TNF- α ve IL-1 β ; NF- κ B'yi inaktif halde sitoplazmada tutan I κ B'nin fosforilasyonuna neden olarak I κ B'nin degradasyonuna ve böylece NF- κ B'nin aktivasyonuna ve nukleusa translokasyonuna neden olurlar (40, 141-143). NF- κ B'nin aktivasyonu ile İ/R hasarında da rol oynadığı düşünülen intraselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler selüler adezyon molekül 1 (VCAM-1), E-selektin, iNOS, siklooksijenaz-2, TNF- α , IL-1 β ve IL-6 gibi proinflamatuvar birçok molekülün üretimi gerçekleşir (143-148). NF- κ B hem TNF- α , IL-1 β ekspresyonunu artırır, hem de bu sitokinler tarafından kendi ekspresyonu artırılır.

Testiküler İ/R hasarındaki NF- κ B'nin rolü ile ilgili birçok çalışma literatürde yer almaktadır. Lysiak ve ark. T/D uygulanan mürin testislerinde detorsiyonun 2. saatinde NF- κ B aktivasyonunun olduğunu ve özellikle Sertoli hücrelerinde immün boyanma gözlendiğini ve birçok gen ekspresyonunun etkilendiğini (bazılarının azalıp bazılarının arttığı) bildirmişler ve bu nedenle NF- κ B ile ekspresyonu değiştirilen proteinlerin İ/R patofizyolojisinde rol alabileceklerini ileri sürmüşlerdir (149). Zhao ve ark. 2 saat torsiyon ve 72 saat detorsiyon sonrasında nükleer ve sitoplazmik NF- κ B'lerin arttığını, NF- κ B immün boyanma ile spermatogonyumların ve spermatositlerin tamamının, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve endotelial

hücrelerin az kısmının lokalize bir şekilde boyandığını ve germ hücrelerinde apoptozisin gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (89). Ayrıca, I κ B'nin fosforilasyonunu inhibe ederek, NF- κ B'nin inaktivasyonuna neden olan sülfasalazinin, T/D' ye bağlı gelişen bu etkileri anlamlı olarak azalttığını da bildirmişlerdir. Zhou XL ve ark 2 saat torsiyon 4 saat detorsiyon sonrasında NF- κ B ekspresyonu ile birlikte TNF- α , IL-2, IL-4, IL-10 düzeylerinin ve lipid peroksidasyonunun arttığını, süperoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin azaldığını göstermişlerdir (150). Kabay ve ark. 2 saatlik torsiyon 4 saatlik detorsiyon sonrasında gelişen lipid peroksidasyonundaki artışın, SOD ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzimlerdeki azalmanın ve ortaya çıkan histolojik hasarın NF- κ B inhibitörü pirolidin ditiyokarbamat tarafından geri döndürüldüğünü rapor etmişlerdir (151). Bizim çalışmamızda, İNF ile tedavi edilen ve edilmeyen T/D uygulanan gruplarda birbirine benzer şekilde seminifer tübül lümenine yakın spermatogenik seriye ait hücrelerde NF- κ B ile lokalize ve orta şiddette immün boyanmalar gözlemlendi. Çalışmamızda İNF tedavisinin immün boyanmada azalma yapmamasını, İ/R hasarında NF- κ B'nin ekspresyonunu artıran farklı moleküllerin olmasından kaynaklandığını düşünebiliriz.

MAPK'lar çeşitli ekstraselüler sinyallerin önemli mediyatörlerinin fonksiyonlarına neden olan serin/treonin kinazların bir ailesidir (152). Memelilerde ERK1/2, JNK ve p38 MAPK en iyi bilinen üç majör MAPK yolaklarıdır. ERK1/2 yolağı büyüme faktörlerine cevap olarak, hücre proliferasyonuna aracılık ederken (153), JNK ile p38 MAPK yolakları inflamasyon ve strese cevap olarak apoptozise neden olurlar (154-155). Bununla birlikte MAPK yolaklarının fonksiyonları, fizyolojik ya da patolojik durumlarda etkilenen hücre tiplerine göre değişmektedir (153-155). ERK1/2, JNK ve p38 MAPK'nın izoformlarının çoğu, memeli testisinde seminifer epitelyumdaki hem Sertoli hem de germ hücrelerinde bulunur ve spermatogenezin her bir basamağında önemli rol oynar (96). Ayrıca, bu izoformlar spermatogonyal kök hücrelerin mitozisi, germ hücre siklusu ve mayozisi, spermiyogenezis ve spermiyasyon, sperm maturasyonu ve motilitesi ve spermin fertilizasyon öncesi kadın üreme yollarında ovuma karşı hiperaktivasyonu, kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonunda da rol alırlar (97, 156).

Bizim çalışmamızda ERK1/2, JNK ve p38 MAPK'nın hem SHAM hem de T/D uygulanan grubun testislerinde immünohistokimyasal olarak varlığı gösterilmiştir. Fizyolojik durumu yansıttığı düşünülen SHAM grubunda özellikle Sertoli hücrelerinde ERK1/2'ye ait immün boyanma yoğunlukta gözlenirken;

JNK'nın spermatogonyum hücrelerinde, p38 MAPK'nın ise spermatogenetik seriye ait hücrelerin hepsinde yaygın bir şekilde boyandığı gözlemlendi. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin gelişmesi için mekanik ve nütrisyonel destek sağlayan hücrelerdir. Aynı zamanda, Sertoli hücreleri kan-testis bariyerini oluşturur ve olgun spermatozoanın gelişmesinde ona zarar verebilecek maddelerin geçişini engellerler (96); bu anlamda Sertoli hücreleri germ hücreleri için çok önemlidir ve fizyolojik durumlarda, ERK1/2 yolağının bu hücrelerin proliferasyonuna neden olması muhtemeldir. Moon ve ark. çalışmalarında, testiküler T/D uyguladıkları grubun testis dokularında, ERK1/2 immün boyanmasının Sertoli hücrelerinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir (99). Spermatogenetik serinin ilk hücreleri olan spermatogonyum hücrelerinin bir kısmı kaynak hücre olarak kalırken bir kısım spermatogonyumlar ise bazal membrandan seminifer tübül lümenine hareket eder ve mitoz ile bölünerek primer spermatositleri oluştururlar. Sertoli hücrelerinin destekleyeceğinden fazla sayıda olan spermatogonyum hücrelerinin apoptozise gittiği bilinmektedir (157). Bizim çalışmamızda, testis dokularında özellikle spermatogonyal hücrelerde JNK ile yoğun immün boyanmanın olması ve spermatogenetik seriye ait hücrelerin p38 MAPK ile immün boyanma göstermesi, testisteki germ hücrelerinin üretimi sırasında fizyolojik apoptotik süreçte JNK ve p38 MAPK'nın rol alabileceğini düşündürmektedir.

MAPK'ların testiste fizyolojik olaylara katkısı dışında İ/R hasarında da rol aldığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Zhang ve ark. testis İ/R'sinde TNF- α mRNA'sının arttığını ve bu durumun JNK ve p38 MAPK'nın forforilasyonunda ve NF- κ B'nin ekspresyonunda artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (140). Minutoli ve ark. testis torsiyonunun patogenezesinde MAPK'ların kısa süreli testiküler reperfüzyon hasarında erken mediyatörler olduklarını ve inflamasyonu tetikleyerek sonuçta organ hasarına neden olabileceklerini ileri sürmüşlerdir (3). Minutoli ve ark.'nın diğer bir çalışmalarında ise 1 saat iskemi 24 saat reperfüzyon uygulanan NF- κ B "knockout" fareler vahşi-tip farelerle karşılaştırıldıklarında; ERK1/2'nin fosforilasyonunun yani aktivasyonlarının arttığını, JNK ve p38 MAPK'nın fosforilasyonunun tamamen yok olduğunu ve TNF- α ekspresyonunun azaldığını rapor etmişlerdir (8). Çalışmamızda, T/D grubuna ait testis dokularında detorsiyonun 24. saatinde, özellikle seminifer tübül lümenine yakın spermatidlerde JNK ile, seminifer tübül lümenindeki spermelerde ve lümene yakın spermatositlerde p38 MAPK ile şiddetli ve seminifer tübül lümenine yakın spermatogenik seriye ait hücrelerde ERK ile orta şiddette immün boyanmalar gözlenmiştir. Bu sonuçlar, T/D

işleminin germ hücrelerinde JNK ve p38 MAPK gibi MAPK'lar üzerinde belirgin etkilerinin olduğunu ve proliferasyon/apoptozis dengesini apoptozis yönünde etkilediğini göstermektedir. Lysiak ve ark. testis İ/R'sinde artan TNF- α ve IL-1 β 'nin JNK fosforilasyonundan sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir (2). Testis dokusuna TNF- α , IL-1 β ya da her ikisinin beraber enjeksiyonu sonrası, JNK fosforilasyonu gözlemlendiğinde; tek başına IL-1 β 'nin enjeksiyonu sonrası JNK fosforilasyonunda anlamlı artış olurken, tek başına TNF- α uygulaması sonrası artış olmamıştır, her ikisi beraber uygulandığında ise (IL-1 β 'nin tek başına uygulanmasına göre) JNK fosforilasyonunda daha fazla artış olmuştur ve bu durumu JNK fosforilasyonunda IL-1 β 'nin biyolojik olarak daha aktif olduğunu ileri sürerek açıklamışlardır (2). TNF- α inhibitörü İNF uyguladığımız çalışmamızda, T/D uygulaması ile artan JNK ve p38 MAPK immün boyanmaları azalmamıştır; İNF'in T/D uygulaması ile gözlenen sonuçları değiştirmemesi, Lysiak ve ark. çalışmalarında da bildirildiği gibi MAPK'ların aktivasyonunda TNF- α dışında IL-1 β gibi başka faktörlerinde etkisinin olabileceğini düşündürmektedir.

HSP ailesi sitoplazma, mitokondri ve endoplazmik retikulumdaki proteinlerin katlanması, transportu ve montajında yardımcı olan şaperon proteinlerdir (158). Bu proteinlerden memeli hücrelerinde en yaygın bulunan HSP70 ısı şoku, iskemi ve inflamasyon gibi çeşitli streslere yanıt olarak artar (123). Dokladyn ve ark. HSP70'in aşırı üretiminin NF- κ B'nin translokasyonunu inhibe edebileceğini, inflamatuvar faktörlerin salınımını azaltabileceğini ve miyokardiyumun apoptozisini azaltabileceğini bildirmişlerdir (131). HSP70'in koruyucu mekanizmalarından biri olarak, NF- κ B aracılı inflamatuvar reaksiyon üzerindeki inhibitör etkisi ileri sürülmektedir (131, 159). HSP70, I κ B kinaz aktivasyonu ve bunun sonucunda I κ B proteinlerinin fosforilasyonu ve degradasyonunu engelleyerek, iskemi ile indüklenen NF- κ B aktivasyonunu önler (160-163). Tamamura ve ark. HSP70 ekspresyonunun testiküler torsiyon sonrasında testislerde arttığını rapor etmişlerdir (15). Tsounapi ve ark. 90 dak iskemi sonrası reperfüzyonun 2. ve 48. saatlerinde ipsilateral ve kontralateral sıçan testislerinde HSP70 düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (16). Sönmez ve ark. HSP70 immün reaktivitesinin SHAM grubundaki testislerde Leydig ve vasküler endotelial hücrelerinde, T/D uygulanan testislerde ise germinal hücrelerde lokalize olduğunu bildirmişlerdir (164). Literatürde, HSP70 ile proinflamatuvar sitokinlerin deneysel testiküler İ/R hasarında birlikte çalışıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak,

2016 yılında Nagata ve ark.'nın deneysel olarak oluşturdukları renal İ/R hasarında HSP70 düzeylerinin arttığını ve İNF tedavisi ile HSP70 düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir; böbrek dokusunda, renal reperfüzyonunun 1. saatinde TNF- α , IL-1 β ve IL-6 protein düzeylerinin, reperfüzyonun 3. saatinde ise HSP70 proteininin anlamlı olarak yükseldiğini göstermişlerdir (71). Muhtemelen, İ/R hasarında reperfüzyon işleminden hemen sonra proinflamatuvar sitokinler, ilerleyen süre içinde ise HSP70 proteini düzeyinde artışlar olmaktadır. Bu bilgiler ışığında, HSP70 düzeylerinin artmasının, NF- κ B'yi inhibe ederek, proinflamatuvar sitokinlerin seviyesini düşürdüğünü ve böylece dokuda inflamasyonu sınırlayıcı bir mekanizma oluşturabileceğini düşünebiliriz. Ayrıca, bazı çalışmalarda HSP70'in İ/R ile indüklenen böbrek, kalp hasarında koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (165-166). Ancak, bizim çalışmamızda T/D uygulanan testis dokularında HSP70 düzeylerinde anlamlı bir artış bulunmamıştır. HSP70 düzeyinde değişiklik bulmamış olmamız; deneylerde kullanılan hayvanların türü ve cinsinin, çalışılan organların, İ/R ya da T/D süresinin, HSP70'i göstermek için deneylerde kullanılan yöntemlerin ve bakılma zamanlarının farklı olması ile ilgili olabilir. Çalışmamızda HSP70 düzeyi, ELISA yöntemi ile 3 saat torsiyon sonrası detorsiyonun 2. saatinde değerlendirildi. Sönmez ve ark. 2 saat torsiyon sonrası detorsiyonun 10. gününde HSP70'i immün boyama ile göstermişlerdir (164). Tsounapi ve ark. ise çalışmalarında reperfüzyonun 2. saatinde HSP70 düzeyinin arttığını belirtmişlerdir, ancak bu çalışmada iskemi süresi 90 dak olarak belirlenmiştir (16).

Sonuç olarak; bu çalışma ile testiküler T/D hasarında NF- κ B ile MAPK yollarından özellikle JNK ve p38'in germinal hücrelerde aktive olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız TNF- α inhibitörü İNF tarafından T/D sonrası gözlenen hasarın azaltılamaması; TNF- α 'nın İ/R hasarında yer alan bu proteinlerin aktivasyonunda tek başına rol almadığını göstermektedir.

6. SONUÇLAR

Tez çalışmamızda sıçanların sağ testisleri 3 saat boyunca torsiyone edidi ve ardından detorsiyon işlemi uygulandı. Detorsiyonun 2. saatinde testis ağırlıkları ve HSP70 düzeyleri ölçüldü. 24 saat sonra testisler çıkarılıp testis ağırlıkları ölçüldü, histopatolojik olarak incelendi ve immünohistokimyasal boyama yapılarak testislerde NF- κ B ve MAPKK aktivasyonuna bağlı oluşan JNK, p38 MAPK ve ERK yolları değerlendirildi. Bu şekilde tek taraflı uygulanan testiküler İ/R hasarında; TNF- α 'nın rolü olup olmadığı ve TNF- α 'nın olası etkisinde NF- κ B, MAPK yolları ve HSP70' in katkısının olup olmadığı TNF- α inhibitörü olan İNF kullanılarak araştırıldı.

-Testis ağırlıkları yönünden değerlendirildiğinde, detorsiyonun 2. saatinde, ipsilateral taraftaki testis ağırlıkları hem T/D hem de İNF+T/D gruplarında yüksek bulunmuş, kontralateral taraftaki testis ağırlıkları arasında farklılık gözlenmemiştir. Detorsiyonun 24. saatinde ipsilateral ve kontralateral taraftaki testis ağırlıklarının ortalamaları birbirlerinden ve gruplar açısından da farklı bulunmamıştır.

-Detorsiyonun 2. saatinde HSP70 düzeyleri açısından, hem gruplar arasında hem de o grubun ipsilateral ve kontralateral testisleri karşılaştırıldığında anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

- Testis dokuları histopatolojik olarak değerlendirildiğinde, detorsiyonun 24. saatinde ipsilateral testislerin Cosentino skorlamasında artış gözlemlendi. İnfliksimab ile tedavi edilen grubun ipsilateral testislerinde testiküler hasar T/D grubuna göre daha azdır, ancak bu azalma anlamlı değildir. Kontralateral testislerde normal morfolojik yapı izlendi.

- Detorsiyonun 24. saatinde, SHAM grubuna ait testis dokuları JNK antikoru ile özellikle spermatogonyumlarda, p38MAPK ile seminifer tübül spermatogenik seriye ait hücrelerde, ERK ile seminifer tübül Sertoli hücrelerinde ve NF- κ B (p65) ile spermatogonyumlarda boyanmalar izlenmiştir.

- Detorsiyonun 24. saatinde, T/D grubunda, JNK ile seminifer tübüllere yakın spermatidlerde ve p38MAPK ile seminifer tübüldeki sperm kümesi ve lümenine yakın spermatositlerde şiddetli, ERK ile seminifer tübül lümenine yakın spermatogenik seriye ait hücrelerde orta şiddette ve NF- κ B (p65) ile seminifer tübül lümenine yakın spermatogenik seriye ait hücrelerde boyanmalar gözlenmiştir.

- Detorsiyonun 24. saatinde, İNF grubunda, JNK ile seminifer tübüldeki spermatogenik seriye ait hücrelerde ve interstisyel alanda, p38MAPK ile seminifer tübüldeki primer spermatositlerde, ERK ile seminifer tübül lümeninde ve interstisyel alanda ve NF-κB (p65) ile seminifer tübülde spermatogenik seriye ait olan hücrelerde boyanmalar tespit edilmiştir.

- Testiküler T/D hasarında NF-κB ve MAPK yolaklarının rolü olduğu fakat bu yolakların rolü üzerinde TNF-α' nın tek başına etkili olmadığı düşünülmektedir.



7. KAYNAKLAR

1. Ringdahl E, Teague L. Testicular torsion. *American Family Physician* 74(10): 1739-43, 2006.
2. 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: 202–10, 2003.
3. 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/mitogen-activated protein kinase in the development of testicular ischemia-reperfusion injury. *Biol Reprod* 73(4): 730-6, 2005.
4. 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.
5. Pergel A, Kanter M, Yucel AF, Aydin I, Erboga 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.
6. Guzel A, Kanter M, Guzel A, Pergel A, Erboga 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. .
7. Akdogan RA, Kalkan Y, Tmkaya L, Rakici H, Akdogan E. The Effects of Infliximab on Laminin, NF κ B and Anti-TNF Expression through Its Effect on Ischemic Liver Tissue. *Gastroenterol Res Pract* 1738430, 2016.
8. Minutoli L, Antonuccio P, Polito F, Bitto A, Fiumara T, Squadrito F, Nicotina PA, Arena S, Marini H, Romeo C, Altavilla D. Involvement of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) during testicular ischemia reperfusion injury in nuclear factor-kappaB knock-out mice. *Life Sci* 81(5): 413–422, 2007.
9. Papa S, Zazzeroni F, Pham CG, Bubici C, Franzoso G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: A key to survival. *J Cell Sci* 117(22): 5197-208, 2004.

10. Baykal Y, Gök F, Kocabalkan F. Isı Şok Proteinleri ve Hastalıklardaki Rolü. *T Klin J Med Sci* 20, 2000.
11. Shevtsov MA, Nikolaev BP, Yakovleva LY, Dobrodumov AV, Dayneko AS⁴, Shmonin AA, Vlasov TD, Melnikova EV, Vilisov AD, Guzhova IV, Ischenko AM, Mikhrina AL, Galibin OV, Yakovenko IV, Margulis BA. Neurotherapeutic activity of the recombinant heat shock protein Hsp70 in a model of focal cerebral ischemia in rats. *Drug Des Devel Ther* 8: 639-50, 2014.
12. Kariko K, Weissman D, Welsh FA. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling-a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 1288-1304, 2004.
13. O'Neill S, Harrison EM, Ross JA, Wigmore SJ, Hughes J. Heat-shock proteins and acute ischaemic kidney injury. *Nephron Exp Nephrol* 126(4): 167-74, 2014.
14. Sakai T, Takaya S, Fukuda A, Harada O, Kobayashi M. Evaluation of warm ischemia-reperfusion injury using heat shock protein in the rat liver. *Transpl Int* 16(2): 88-99, 2003.
15. Tamamura M, Saito M, Kinoshita Y, Shimizu S, Satoh I, Shomori K, Dimitriadis F, Satoh K. Protective effect of edaravone, a free-radical scavenger, on ischaemia-reperfusion injury in the rat testis. *BJU Int* 105(6): 870-6, 2010.
16. Tsounapi P, Saito M, Dimitriadis F, Shimizu S, Kinoshita Y, Shomori K, Satoh I, Satoh K. Protective effect of sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, on ipsilateral and contralateral testes after unilateral testicular ischaemia-reperfusion injury in rats. *BJU Int* 107(2): 329-36, 2011.
17. Klosterhalfen B, Hauptmann S, Offner F-A, Amo-Takyi B, Tons C, Winkeltau G, Affify M, Kupper W, Kirkpatrick CJ, Mittermayer C. Induction of heat shock protein 70 by zinc-bis-(DL-hydrogenaspartate) reduces cytokine liberation, apoptosis, and mortality rate in a rat model of LD100 endotoxemia. *Shock* 7: 254–262, 1997.
18. Meng X, Harken AH. The interaction between Hsp70 and TNF-alpha expression: a novel mechanism for protection of the myocardium against post-injury depression. *Shock* 17(5): 345-53, 2002.

19. Leape LL. Testicular torsion. Ed: Ashcraft KW. Pediatric Urology. 1st edition, pp. 429-436, Saunders, Philadelphia, USA, 1990.
20. Bloom DA, Wan J, Key D. Disorders of the male external genitalia and inguinal canal. Ed: Kelalis P, King L, Belman B. Clinical Pediatric Urology. 3rd edition, pp. 1015-1049, Saunders, Philadelphia, USA, 1992.
21. Shukla RB, Kelly DG, Daly L, Guiney EJ. Association of cold weather with testicular torsion. Br Med J 285(6353): 1459-60, 1982.
22. Damjanov I. Physical, chemical, İmmüne and iatrogenic causes of infertility. 1 st edition, pp. 125-143, Pathology of Infertility, Mosby-Year Book, St Louis, 1993.
23. Prater JM, Overdrof BS. Testicular torsion: A surgical emergency. American Family Physician 44(3): 834-40, 1991.
24. Hutson JM. Undescended testis, torsion and varicocele. Ed: O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL, Fonkalsrud EW, Coran AG. Pediatric Surgery. 5th edition, pp. 1099-101 Mosby-Year Book Inc, St. Louis, 1998.
25. Noseworthy J. Testicular torsion. Ed: Ashcraft KW. Pediatric Surgery 3rd edition, pp. 674-80, W.B.Saunders Co, Philadelphia, 2000.
26. Özdemir K, Savaş Ç. Çocuklarda akut skrotal bulguların değerlendirilmesi. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi 7(4): 50-60, 2000.
27. Çağlayan O, Çağlayan F, Günel E. İntestinal iskemi-reperfüzyonun doku çinko düzeyine etkisi. Genel Tıp Dergisi 8: 9, 1998.
28. Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: Strategies to inhibit complement. Fundam Clin Pharmacol 15(5): 293-306, 2001.
29. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. J Urol 157: 340-5, 1997.
30. Granger DN. Ischemia-reperfusion: Mechanism of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. Microcirculation 6(3): 167-78, 1999.
31. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull 70: 71-86, 2004.

32. Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure. *Am J Med* 109(8): 665-78, 2000.
33. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 22: 5-8, 2009.
34. Korkmaz ME, Kart H, Müderrisoğlu H. Tümör Nekroz Faktörü: Miyokard İskemi Sendromlarının Patogenezinde Yeni Bir Mediator. *Türk Kardiyol Dern Arş* 23: 380-383, 1995.
35. Popa C, Netea MG, Van Riel PL, Van der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 48(4): 751-62, 2007.
36. Pentikainen V, Suomalainen L, Erkkilä K, Martelin E, Parvinen M, Pentikäinen MO, Dunkel L. Nuclear factor-kappa B activation in human testicular apoptosis. *Am J Pathol* 160(1): 205-18, 2002.
37. Maeda S, Omata M. Inflammation and cancer: Role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Sci* 99(5): 836-42, 2008.
38. Palmer JS, Cronie WJ, Plzak LF, Leff AR. A Platelet activating factor antagonist attenuates the effects of testicular ischemia. *J Urol* 158(3 Pt 2): 1186-90, 1997.
39. Lysiak JJ. The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmüne orchitis. *Reprod Biol Endocrinol* 2: 9, 2004.
40. Read MA, Whitley MZ, Gupta S, Pierce JW, Best J, Davis RJ, Collins T. Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272(5): 2753-61, 1997.
41. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. *Physiol Rev* 92(2): 689-737, 2012.

42. Minutoli L, Irrera N, Squadrito F, Marini H, Nicotina PA, Arena S, Romeo C, Antonuccio P, Altavilla D. Effects of ischaemic post-conditioning on the early and late testicular damage after experimental testis ischaemia-reperfusion. *Andrology* 2(1): 76-82, 2014.
43. Silver JT, Noble EG, Regulation of survival gene hsp70. *Cell Stress Chaperones* 17(1): 1-9, 2012.
44. Lysiak JJ, Turner SD, Nguyen QA, 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.
45. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132(3): 344-62, 2008.
46. Ozturk H, Ozturk H, Terzi EH, Bugdayci G, Duran A. Interleukin 10 reduces testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Urology* 83(2): 508, 2014.
47. 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(2): 141-7, 2009.
48. Kelly S, Yenari MA. Neuroprotection: heat shock proteins. *Curr Med Res Opin* 18: 55-60, 2002.
49. Hu BR, Janelidze S, Ginsberg MD, Busto R, Perez-Pinzon M, Sick TJ, Siesjö BK, Liu CL. Protein aggregation after focal brain ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 21(7): 865-875, 2001.
50. Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann N Y Acad Sci* 1053: 74-83, 2005.
51. Ran R, Lu A, Zhang L, Tang Y, Zhu H, Xu H, Feng Y, Han C, Zhou G, Rigby AC, Sharp FR. Hsp 70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev* 18(12): 1466-81, 2004.
52. Sasi BK, Sonawane PJ, Gupta V, Sahu BS, Mahapatra NR. Coordinated transcriptional regulation of Hspa1a gene by multiple transcription factors: Crucial roles for HSF-1, NF-Y, NF-κB, and CREB. *J Mol Biol* 426(1): 116-35, 2014.

53. Lee JS, Lee JJ, Seo JS. HSP70 deficiency results in activation of c-Jun N-terminal Kinase, extracellular signal-regulated kinase, and caspase-3 in hyperosmolarity-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280(8): 6634-41, 2005.
54. Gong X, Luo T, Deng P, Liu Z, Xiu J, Shi H, Jiang Y. Stress-induced interaction between p38 MAPK and HSP70. *Biochem Biophys Res Commun* 425(2): 357-62, 2012.
55. 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.
56. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119(3): 651-65, 2012.
57. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology* 214(2): 149-60, 2008.
58. Ozmen D, Boydak B, Mutaf I, Zoghi M, Kumanlioglu K, Güner I, Bayindir O. The state of lipid peroxidation and antioxidants following thrombolytic therapy with rt-PA and streptokinase in acute myocardial infarction. *Jpn Heart J* 40(3): 267-73, 1999.
59. Van Horssen R, Ten Hagen TL, Eggermont AM. TNF-alpha in cancer treatment: Molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist* 11(4): 397-408, 2006.
60. Bourguiba S, Chater S, Delalande C, Benahmed M, Carreau S. Regulation of aromatase gene expression in purified germ cells of adult male rats: Effects of transforming growth factor beta, tumor necrosis factor alpha, and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Biol Reprod* 69(2): 592-601, 2003.
61. Maury CP, Teppo AM. Circulating tumour necrosis factor-alpha (cachectin) in myocardial infarction. *J Intern Med* 225(5): 333-6, 1989.
62. Colletti LM, Burtch GD, Remick DG, Kunkel SL, Strieter RM, Guice KS, Oldham KT, Campbell DA Jr. The production of tumor necrosis factor alpha and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation* 49(2): 268-72, 1990.

63. Canale P, Squadrito F, Zingarelli B, Altavilla D, Iocolano M, Campo GM, Caputi AP. Splanchnic artery occlusion shock: Vinblastine-induced leukopenia reduces tumour necrosis factor and thromboxane A2 formation, and increases survival rate. *Pharmacol Res* 27(1): 61-71, 1993.
64. K ksoy C, Kuzu MA, Kuzu I, Erg n H, G rhan I. Role of tumour necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischaemia-reperfusion. *Br J Surg* 88(3): 464-8, 2001.
65. Beutler B. TNF,  mm nity, and inflammatory disease: Lessons of the past decade. *J Invest Med* 43: 227-235, 1995.
66. Willrich MA, Murray DL, Snyder MR. Tumor necrosis factor inhibitors: Clinical utility in auto mm ne diseases. *Transl Res* 165(2): 270-82, 2015.
67.  st nes L (2017). RxMediaPharma  nteraktif İla Bilgi Kaynağı. S r m 17.0.12,  zmir.
68. Yoo IK, Choung RS, Hyun JJ, Kim SY, Jung SW, Koo JS, Lee SW, Choi JH, Kim H, Lee HS, Keum B, Kim ES, Jeon YT. Incidences of serious infections and tuberculosis among patients receiving anti-tumor necrosis factor-  therapy. *Yonsei Med J* 55(2): 442-8, 2014.
69. Yucel AF, Pergel A, Aydin I, Alacam H, Karabicak 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.
70. S nchez-Cano D, Callejas-Rubio JL, Ruiz-Villaverde R, R os-Fern ndez R, Ortego-Centeno N. Off-label uses of anti-TNF therapy in three frequent disorders: Behçet's disease, sarcoidosis, and noninfectious uveitis. *Mediators Inflamm* 2013, 2013.
71. Nagata Y, Fujimoto M, Nakamura K, Isoyama N, Matsumura M, Fujikawa K, Uchiyama K, Takaki E, Takii R, Nakai A, Matsuyama H. Anti-TNF-  Agent Infliximab and Splenectomy Are Protective Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *Transplantation* 100(8): 1675-82, 2016.

72. Ogrič M, Žigon P, Drobne D, Štabuc B, Sodin-Semrl S, Čučnik S, Praprotnik S. Routinely utilized in-house assays for infliximab, adalimumab and their anti-drug antibody levels. *Immunol Res* 2018.
73. Nielsen OH, Ainsworth MA. Tumor necrosis factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 369(8): 754-62, 2013.
74. Doğan C, Kırıl N, Cömert S Ş, Fidan A, Çağlayan B, Salepçi B. Anti TNF-Alfa Kullanan Hastalarda Tüberküloz Sıklığı. *Türk Toraks Dergisi* 13: 93-8, 2012.
75. Weinberger J, Baltimore D, Sharp PA. Distinct factors bind to apparently homologous sequences in the $\text{I}\mu\text{m}$ immunoglobulin heavy-chain enhancer. *Nature* 322(6082): 846-8, 1986.
76. Brasier AR. The NF-kappaB regulatory network. *Cardiovascular Toxicology* 6(2): 111-30, 2006.
77. Li X, Stark GR. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30(4): 285-96, 2002.
78. Horie R. NF-kappaB in pathogenesis and treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *International Reviews of Immunology* 26(5-6): 269-81, 2007.
79. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of disease. *Clin Chem* 45: 7-17, 1999.
80. Atreya I, Atreya R, Neurath MF. NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine* 263(6): 591-6, 2008.
81. Rayet B, Gelinas C. Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18: 6938–6947, 1999.
82. Abraham E. NF-kappa B activation. *Crit Care Med* 28: 100-104, 2000.
83. Burma O, Onat E, Uysal A, Ilhan N, Erol D, Ozcan M, Sahna E. Effects of rosuvastatin on ADMA, rhokinase, NADPH oxidase, caveolin-1, hsp 90 and NFkB levels in a rat model of myocardial ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc J Afr* 25(5): 212-6, 2014.

84. Ross SD, Kron IL, Gangemi JJ, Shockey KS, Stoler M, Kern JA, Tribble CG, Laubach VE. Attenuation of lung reperfusion injury after transplantation using an inhibitor of nuclear factor- κ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279(3): L528-36, 2000.
85. Erl W, Hansson GK, de Martin R, Draude G, Weber KS, Weber C. Nuclear factor- κ B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 84(6): 668-77, 1999.
86. Delfino F, Walker WH. Stage-specific nuclear expression of NF- κ B in mammalian testis. *Mol Endocrinol* 12(11): 1696-707, 1998.
87. Lilienbaum A, Sage J, Memet S, Rassoulzadegan M, Cuzin F, Israel A. NF- κ B is developmentally regulated during spermatogenesis in mice. *Developmental Dynamics* 219: 333-340, 2000.
88. Delfino F, Walker WH: Hormonal regulation of the NF- κ B signaling pathway. *Mol Cell Endocrinol* 157: 1-9, 1999.
89. Zhao YG, Zheng XM, Zhou J, Liu XL, Hu XM, Chen DH, Zhang XJ, Men XW, Shi HB, Yu ZY. Sulfasalazine prevents apoptosis in spermatogenic cells after experimental testicular torsion/detorsion. *Acta Pharmacol Sin* 27(5): 603-8, 2006.
90. Budde LM, Wu C, Tilman C, Douglas I, Ghosh S. Regulation of IkappaBbeta expression in testis. *Mol Biol Cell* 13(12): 4179-94, 2002.
91. Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- α induced apoptosis by NF- κ B. *Science* 274: 787-789, 1996.
92. Chaisson ML, Brooling JT, Ladiges W, Tsai S, Fausto N. Hepatocyte-specific inhibition of NF- κ B leads to apoptosis after TNF treatment, but not after partial hepatectomy. *J Clin Invest* 110(2): 193-202, 2002.
93. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* 274: 782-784, 1996.
94. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes Cancer* 4(9-10): 401-8, 2013.
95. Wada T, Penninger JM. Mitogenactivated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23: 2838-49, 2004.

96. Wong CH, Cheng CY. Mitogen-activated protein kinases, adherens junction dynamics, and spermatogenesis: A review of recent data. *Dev Biol* 286(1): 1-15, 2005.
97. Li MW, Mruk DD, Cheng CY. Mitogen-activated protein kinases in male reproductive function. *Trends Mol Med* 15(4): 159-68, 2009.
98. Cooper Geoffrey M, Hausman Robert E. "The Cell: A Molecular Approach", 3rd Edition. ASM Press 2006.
99. Moon C, Kim JS, Jang H, Lee HJ, Kim SH, Kang SS, Bae CS, Kim JC, Kim S, Lee Y, Shin T. Activation of Akt/protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase in rats with acute experimental testicular torsion. *J Vet Med Sci* 70(4): 337-41, 2008.
100. Sabio G, Davis RJ. TNF and MAP kinase signalling pathways. *Semin Immunol* 26(3): 237-45, 2014.
101. Tang RX, Kong FY, Fan BF, Liu XM, You HJ, Zhang P, Zheng KY. HBx activates FasL and mediates HepG2 cell apoptosis through MLK3-MKK7-JNKs signal module. *World J Gastroenterol* 18(13): 1485-95, 2012.
102. Uehara T, Bennett B, Sakata ST, Satoh Y, Bilter GK, Westwick JK, Brenner DA. JNK mediates hepatic ischemia reperfusion injury. *J Hepatol* 42(6): 850-9, 2005.
103. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81(2): 807-69, 2001.
104. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265(5173): 808-11, 1994.
105. Ocuin LM, Zeng S, Cavnar MJ, Sorenson EC, Bamboat ZM, Greer JB, Kim TS, Popow R, DeMatteo RP. Nilotinib protects the murine liver from ischemia/reperfusion injury. *J Hepatol* 57(4): 766-73, 2012.
106. Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: The role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol* 162(1): 196-203, 1999.

107. Kobayashi M, Takeyoshi I, Yoshinari D, Matsumoto K, Morishita Y. P38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Surgery* 131(3): 344-9, 2002.
108. 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.
109. Ranawat P, Bansal MP. Apoptosis induced by modulation in selenium status involves p38 MAPK and ROS: Implications in spermatogenesis. *Mol Cell Biochem* 330(1-2): 83-95, 2009.
110. Ritossa FA. A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573, 1962.
111. Tissiere A, Mitchell HK, Tracy U. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosomal puffs. *J Molec Biol* 84: 389-398, 1974.
112. Bao XQ, Liu GT. Bicyclol: A novel antihepatitis drug with hepatic heat shock protein 27/70-inducing activity and cytoprotective effects in mice. *Cell Stress Chaperones* 13(3): 347-355, 2008.
113. Shinohara T, Takahashi N, Kohno H, Yamanaka K, Ooie T, Wakisaka O, Murozono Y, Taniguchi Y, Torigoe Y, Hara M, Shimada T, Saikawa T, Yoshimatsu H. Mitochondria are targets for geranylgeranylacetone-induced cardioprotection against ischemia-reperfusion in the rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3): H1892-9, 2007.
114. Beere HM. "The stress of dying": The role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci* 117(Pt 13): 2641-51, 2004.
115. Henle KJ, Jethmalani SM, Nagle WA. Stress proteins and glycoproteins. *Int J Mol Med* 1(1): 25-32, 1998.
116. Lu RC, Tan MS, Wang H, Xie AM, Yu JT, Tan L. Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 435203, 2014.

117. Borges TJ, Wieten L, van Herwijnen MJ, Broere F, van der Zee R, Bonorino C, van Eden W. The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70. *Front Immunol* 3: 95, 2012.
118. Aufricht C. Heat-shock protein 70: Molecular supertool? *Pediatr Nephrol* 20: 707-13, 2005.
119. Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62(6): 670-84, 2005.
120. Kaczmarek L, Calabretta B, Kao HT, Heintz N, Nevins J, Baserga R. Control of hsp70 RNA levels in human lymphocytes. *J Cell Biol* 104(2): 183-7, 1987.
121. Gabai VL, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY. Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance. *J Biol Chem* 272(29): 18033-7, 1997.
122. Nylandsted J, Rohde M, Brand K, Bastholm L, Elling F, Jaattela M. Selective depletion of heat shock protein 70 (Hsp70) activates a tumor-specific death program that is independent of caspases and bypasses Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7871-7876, 2000.
123. Zhang K, Zhao T, Huang X, Liu ZH, Xiong L, Li MM, Wu LY, Zhao YQ, Zhu LL, Fan M. Preinduction of HSP70 promotes hypoxic tolerance and facilitates acclimatization to acute hypobaric hypoxia in mouse brain. *Cell Stress Chaperones* 14(4): 407-415, 2009.
124. Yao YW, Zhang GH, Zhang YY, Li WD, Wang CH, Yin CY, Zhang FM. Lipopolysaccharide pretreatment protects against ischemia/reperfusion injury via increase of HSP70 and inhibition of NF- κ B. *Cell Stress Chaperones* 16(3): 287-96, 2011.
125. Soriano MA, Ferrer I, Rodríguez-Farré E, Planas AM. Expression of c-fos and inducible hsp-70 mRNA following a transient episode of focal ischemia that had non-lethal effects on the rat brain. *Brain Res* 670(2): 317-20, 1995.
126. Zhan X, Kim C, Sharp FR. Very brief focal ischemia simulating transient ischemic attacks (TIAs) can injure brain and induce Hsp70 protein. *Brain Res* 1234: 183-197, 2008.

127. Rupik W, Stawierej A, Stolarczyk I, Widłak W. Promoter of the heat shock testis-specific Hsp70.2/Hst70 gene is active in nervous system during embryonic development of mice. *Anat Embryol (Berl)* 211(6): 631-8, 2006.
128. Turner TT, Miller DW. On the synthesis and secretion of rat seminiferous tubule proteins in vivo after ischemia and germ cell loss. *Biol Reprod* 57(6): 1275-84, 1997.
129. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B: The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20: 7146–7159, 2000.
130. Fouqueray B, Philippe C, Amrani A, Perez J, Baud L: Heat shock prevents lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- synthesis by rat mononuclear phagocytes. *Eur J Immunol* 22: 2983-2987, 1992.
131. Dokladny K, Lobb R, Wharton W, Ma TY, Moseley PL. LPS-induced cytokine levels are repressed by elevated expression of HSP70 in rats: Possible role of NF-kappaB. *Cell Stress Chaperones* 5(2): 153-63, 2010.
132. Shi Y, Tu Z, Tang D, Zhang H, Liu M, Wang K, Calderwood SK, Xiao X. The inhibition of LPS-induced production of inflammatory cytokines by HSP70 involves inactivation of the NF-kappaB pathway but not the MAPK pathways. *Shock* 26(3): 277-84, 2006.
133. Gabai VL, Meriin AB, Yaglom JA, Volloch VZ, Sherman MY. Role of Hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: Implications in apoptosis and aging. *FEBS Lett* 438(1-2): 1-4, 1998.
134. Goel G, Guo M, Ding J, Dornbos D 3rd, Ali A, Shenaq M, Guthikonda M, Ding Y. Combined effect of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and heat shock protein (HSP)-70 in reducing apoptotic injury in hypoxia: A cell culture study. *Neurosci Lett* 483(3): 162-6, 2010.
135. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett ATK. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *J Androl* 7: 23–31, 1986.

136. De SK, Chen HL, Pace JL, Hunt JS, Terranova PF, Enders GC. Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells. *Endocrinology* 133(1): 389-96, 1993.
137. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, Opie LH. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* 112(25): 3911-8, 2005.
138. Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis Res 4 Suppl 3*: 243-52, 2002.
139. Al-Maghrebi M, Renno WM, Al-Ajmi N. Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 420(2): 434-9, 2012.
140. 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.e15, 2013.
141. Beg AA, Baldwin AS Jr. The I κ B proteins: Multifunctional regulator of Rel/NF- κ B transcription factors. *Genes Dev* 7: 2064-70, 1993.
142. Stancovski I, Baltimore D. NF-kappaB activation: The I κ B kinase revealed? *Cell* 91: 299-302, 1997.
143. Baldwin AS Jr. The NF- κ B and I κ B proteins: New discoveries and insights. *Ann Rev Immunol* 14: 649-83, 1996.
144. Tosa Y, Kollias N, Lee WP, May JW Jr. Reduction of ischemiareperfusion injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1. *Transplant Proc* 28: 1210-1, 1996.
145. Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor- κ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 3-9, 1997.
146. Zhu Z, Tang W, Gwaltney JM Jr, Wu Y, Elias JA. Rhinovirus stimulation of interleukin-8 in vivo and in vitro: Role of NFkappaB. *Am J Physiol* 273: 814-24, 1997.

147. Feeley BT, Park AK, Hoyt EG, Robbins RC. Sulfasalazine inhibits reperfusion injury and prolongs allograft survival in rat cardiactransplants. *J Heart Lung Transplant* 18: 1088–95, 1999.
148. Won JH, Im HT, Kim YH, Yun KJ, Park HJ, Choi JW, Lee KT. Anti-inflammatory effect of buddlejasaponin IV through the inhibition of iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophages via the NF-kappaB inactivation. *Br J Pharmacol* 148: 216-25, 2006.
149. Lysiak JJ, Bang HJ, Nguyen QA, Turner TT. Activation of the nuclearfactor-kappa B pathway following ischemia-reperfusion of the murine testis. *J Androl* 26(1): 129-35, 2005.
150. Zhou XL, Yang QS, Ni SZ, Tu XP, Zhao Y, Xu B, Pan ZQ, Shen J. Protective effects of lipoxin A4 in testis injury following testicular torsion and detorsion in rats. *Mediators Inflamm* 898056, 2014.
151. Kabay S, Ozden H, Guven G, Burukoglu D, Ustuner MC, Topal F, Gunes HV, Ustuner D, Ozbayer C. Protective effects of the nuclear factor kappa B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate on experimental testicular torsion and detorsion injury. *Korean J Physiol Pharmacol* 18(4): 321-6, 2014.
152. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298: 1911–1912, 2002.
153. Wilkinson MG, Millar JB. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 14(14): 2147-57, 2000.
154. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410(6824): 37-40, 2001.
155. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12(1): 9-18, 2002.
156. Sun QY, Breitbart H, Schatten H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod Fertil Dev* 11(7-8): 443-50, 1999.
157. 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, Jun 2003.

158. Nollen EA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: Molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *J Cell Sci* 115(Pt 14): 2809-16, 2002.
159. Sun D, Chen D, Du B, Pan J. Heat shock response inhibits NF- κ B activation and cytokine production in murine Kupffer cells. *J Surg Res* 129(1): 114-121, 2005.
160. Wong HR, Ryan M, Wispe JR. The heat shock response inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression by blocking I κ -B degradation and NF- κ B nuclear translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 231: 257-263, 1997.
161. Feinstein DL, Galea E, Aquino DA, Li GC, Xu H, Reis DJ. Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric oxide synthase expression by decreasing NF κ B activation. *J Biol Chem* 271: 17724-17732, 1996.
162. Feinstein DL, Galea E, Reis DJ. Suppression of glial nitric oxide synthase induction by heat shock: Effects on proteolytic degradation of I κ B. *Nitric Oxide* 1: 167-176, 1997.
163. Malhotra V, Wong HR. Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-kappa B signaling pathway. *Crit Care Med* 30(1 Suppl): 89-95, 2002.
164. Sönmez MF, Ozdemir Ş, Guzel M, Kaymak E. The ameliorative effects of vinpocetine on apoptosis and HSP-70 expression in testicular torsion in rats. *Biotech Histochem* 92(2): 92-99, 2017.
165. Meldrum KK, Burnett AL, Meng X, Misseri R, Shaw MB, Gearhart JP, Meldrum DR. Liposomal delivery of heat shock protein 72 into renal tubular cells blocks nuclear factor-kappaB activation, tumor necrosis factor-alpha production, and subsequent ischemia-induced apoptosis. *Circ Res* 92(3): 293-9, 2003.
166. Rani N, Bharti S, Manchanda M, Nag TC, Ray R, Chauhan SS, Kumari S, Arya DS. Regulation of heat shock proteins 27 and 70, p-Akt/p-eNOS and MAPKs by Naringin Dampens myocardial injury and dysfunction in vivo after ischemia/reperfusion. *PLoS One* 8(12): e82577, 2013.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



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



TOPLANTI TARİHİ : 05.02.2014
TOPLANTI NO : 2014/02

- 9- B.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2014-08-05/02 Protokol no'lu "İnfiliksımabın Sıçanlarda Testiküler Torsiyon Detorsiyon Hasarında NF-κB, MAP Kinazlar ve HSP70 Üzerine Etkileri" konulu çalışmanın Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Rafet KOCA

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı

9. ÖZGEÇMİŞ

Ebru KOCAKAYA, 1988 yılında Karabük'te doğdu. İlk ve ortaöğretimini Kilimli Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulunda, lise eğitimini ise Zonguldak Atatürk Anadolu Lisesi'nde tamamladı. Üniversite eğitimine 2007 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde başladı ve 2012 yılında mezun oldu. Meslek hayatına 2013 yılında Zonguldak Atatürk Devlet Hastanesi'nde başladı. 2015-2019 yılları arasında Zonguldak İl Sağlık Müdürlüğü'nde uzman olarak görev yaptı. 2019 yılı itibari ile yeniden çalışmaya başladığı Zonguldak Atatürk Devlet Hastanesi'nde görevini yürütmektedir. Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine 2013 yılında başladı.