



Araştırma Makalesi

Jnk İnhibisyonunun Diyabetik Testis Dokusundaki Fas/FasL Sinyal Yolağına Etkileri

Gülnur Kızılay^a, Şinasi Bayram^a, Onur Ersoy^a, Yeliz Dönmez Bozdemir^b

^a Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye,

^b Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye

**MAKALE
BİLGİSİ**

Gönderilme Tarihi:
06.10.2017

Revizyon:
20.12.2017

Kabul:
21.12.2017

Sorumlu Yazar:
Gülnur Kızılay
gulnurkizilay@trakya.edu.tr

Anahtar Kelimeler:
Diabetes mellitus, Testis,
SP600125, Fas, FasL, Kaspaz 8

ÖZET

Çalışmamızın amacı, diyabetik erkek sıçanlarda c-Jun N-terminal kinaz (JNK) inhibisyonunun, apoptotik bir yolak olan Fas/FasL sinyal yolağına olası etkilerini ortaya koymaktır. Otuz adet Sprague Dawley erkek sıçandan rastgele beş grup oluşturuldu. Birinci grup: Kontrol grubu (sadece çözücü verilen grup, n=6), 2. grup: Tek doz 60 mg/kg streptozotosin (STZ) i.p., 15 gün (n=6), 3. grup: 60 mg/kg STZ, 30 gün (n=6), 4. grup: 60 mg/kg STZ + 15 mg/kg SP600125 (JNK inhibitörü) i.p., 15 gün (n=6), 5. grup: 60 mg/kg (STZ) + 15 mg/kg SP600125, 30 gün (n=6). Deney sonunda, deneklerden alınan testis doku örnekleri rutin takibe alındı ve parafine gömüldü. Fas, FasL ve kaspaz 8 proteinleri immünohistokimyal olarak değerlendirildi. Fas ve kaspaz 8 immünpozitif hücre sayısı tüm deney gruplarında kontrol grubuna göre, FasL immünpozitif hücre sayısının ise 4. grup hariç, diğer tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır. Ayrıca Fas, FasL ve kaspaz 8 immünpozitif hücre sayılarının 2. gruba kıyasla 4. grupta, 3. gruba kıyasla da 5. grupta anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir. Sonuçta; diyabetik testis dokusunda meydana gelen apoptoziste, Fas/FasL sinyal yolağının önemli etkilerinin olduğu ve JNK inhibitörü olan SP600125'in, JNK ile birlikte Fas/FasL sinyal yolağı üzerinden de, diyabetik testiküler apoptozisi önlemede önemli bir rol üstlenebileceği kanısındayız.



Research Article

The Role of Fas/FasL Signaling Pathway In Diabetic Testicular Tissue by Administered Jnk Inhibition

Gülnur Kızılay^a, Şinasi Bayram^a, Onur Ersoy^a, Yeliz Dönmez Bozdemir^b

^a Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Trakya University, Edirne, Turkey

^b Center for Technology Research and Application, Trakya University, Edirne, Turkey.

**ARTICLE
INFORMATION**

Date of Submission

06.10.2017

Revision:

20.12.2017

Accepted:

21.12.2017

Correspondence Author:

Gülnur Kızılay

gulnurkizilay@trakya.edu.tr

Key Words:

Diabetes mellitus, Testis,

SP600125, Fas, FasL, Caspase 8

ABSTRACT

We investigated the possible role of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibition on Fas/FasL signaling pathway in diabetes-induced testicular apoptosis. Thirty Sprague-Dawley male rats, weighing 250–350 g, were randomly divided into five groups. First group: Control (animals received only vehicle, n=6), II. group: single dose 60 mg/kg streptozotocin (STZ) i.p., 15 days (n=6), III. group: 60 mg/kg (STZ), 30 days (n=6), IV. group: 60 mg/kg (STZ) + 15mg/kg SP600125 (JNK inhibitor) i.p., 15 days (n=6), V. group: 60 mg/kg (STZ) + 15 mg/kg SP600125, 30 days (n=6). At the end of the experiments, rats were sacrificed, testis tissue samples were harvested and there were routinely processed for light microscopy. Fas, FasL and caspase 8 expressions were evaluated immunohistochemically. Fas and caspase 8 immunopositive cells count was significantly increased in all experiment groups compared with control group. FasL immunopositive cells count was significantly increased, compared with control, in all groups except for the fifth group. On the other hand; Fas, FasL and caspase 8 immunopositive cells count was significantly decreased in the fourth group compared with the second group. Fas, FasL and caspase 8 immunopositive cells count was significantly decreased in the fifth group compared with the third group. We conclude that Fas / FasL signaling pathway has significant effects on apoptosis in diabetic testis and SP600125 may play an important role in preventing diabetic testicular apoptosis via JNK and Fas / FasL.

Giriş

Diabetes mellitus (DM); insülinin yetersiz salınımı ya da var olan insülinin etkin şekilde kullanılmaması sonucu ortaya çıkan önemli bir sistemik hastalıktır. Son yıllarda yapılan pek çok araştırma, diyabetin erkek infertilitesi gibi dramatik bir sonuç doğurabileceğini vurgulamıştır (1, 2). DM sebebiyle erkeklerde seksüel fonksiyon bozuklukları, testosteron ve libido azalması, anormal spermatogenez, sperm sayısı ve hareketliliğinde değişiklikler, semen kalitesinde bozulma ve testis dokusunda histopatolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Diyabetin neden olduğu hiperglisemiyle artan reaktif oksijen türevleri (ROS) ve bunların aşırı üretimi sonucunda oluşan oksidatif stresin, testis dokusunda apoptozisi indüklediği bilinmektedir. Testiküler apoptozisin önlenememesi durumunda, erkeklerde subfertilite ya da infertilite gibi tabloların oluşabileceği pek çok çalışmada ifade edilmiştir (3-6).

Fas/Fas Ligand (FasL) sinyal yolağı, apoptozisi ekstresek olarak tetikleyen bir yoldur. Fas, tümör nekroz faktör (TNF) ailesine ait, tip 1 membran proteinidir. FasL ise tümör nekroz faktör reseptör ailesine ait, tip 2 membran proteinidir. Fas/FasL etkileşimi; Fas'ın, Fas ile ilişkili ölüm domainine (FADD) bağlanmasına neden olur. Daha sonra FADD, öldürücü efektör domain (DED)'in dimerizasyonu, prokaspaz 8 ile birleşir. Prokaspaz 8, proteolitik olan kaspaz 8'i aktifleştirir ve ardından efektör kaspazlardan olan kaspaz 3 aktifleşerek, yapısal proteinlerin parçalanmasına sebep olur ve apoptozis gerçekleşir (7).

c-Jun N-terminal kinaz (JNK); mitojenlerin aktive ettiği protein kinaz (MAPK) ailesine ait bir protein kinaz olup sinyalin, reseptörler vasıtasıyla hücre nükleusuna iletiminden sorumludur. DNA hasarı, inflamatuvar sitokinler, radyasyon, stres, oksidatif stres, hücre proliferasyonu ve apoptozis gibi çeşitli hücresel ve çevresel streslere yanıt olarak aktifleşmektedir (8).

Yapılan pek çok çalışmada, diyabetin neden olduğu oksidatif stresin, JNK ifadelerinde artışlara neden olduğu ileri sürülmüştür (3, 9). Oksidatif strese bağlı olarak oluşan JNK ifadesindeki artışlar, hücrenin apoptozise sürüklenmesine neden olmaktadır (3). Apoptozis intrinsek ve ekstresek olmak üzere iki yolak üzerinden gerçekleşir (10). Yapılan çalışmalarda, yüksek JNK ifadeleri ile intrinsek sinyal yolağında bulunan proapoptotik proteinler arasında, sıkı bir korelasyon olduğu sıklıkla vurgulanmıştır (3, 9). Ancak literatürde,

diyabete bağlı olarak gelişen testiküler apoptoziste, Fas/FasL sinyal yolağı ile JNK arasındaki olası ilişkiyi ortaya koyan herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

JNK'nın fonksiyonlarını araştırmak amacıyla JNK inhibitörlerinin kullanımı oldukça yaygındır (11-15). JNK'nın inhibisyonu; JNK genlerinin seçici olarak tahrip edilmesiyle yapılabileceği gibi, mikst lineage kinaz (MLK) protein kinazların yarı sentetik bir inhibitörü olan CEP-1347, SP600125 veya peptid inhibitörler kullanılarak da yapılabilmektedir. Yapı taşı antrapirazolonun oluşturduğu SP600125 (anthra[1,9]pyrazol-6(2H)-one); JNK ile katalitik aktivite gösteren bir maddedir (11, 12). SP600125; JNK'nın ATP-kompetitif alanlarına yüksek afinite gösterir ve spesifik etkileşime girerek, inhibitör etki yaratır (12, 16).

Bu çalışmada; diyabetik erkek sıçanlarda gerçekleştirilen JNK inhibisyonunun, apoptotik bir yolak olan Fas/FasL sinyal yolağına olası etkilerini ortaya koyarak, subfertilite ve infertilite tedavisine yönelik yeni bir bakış açısı ve olası tedavi protokollerini gündeme getirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamız Trakya Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından (TÜHADYEK-2015/20) onaylanmıştır. Trakya Üniversitesi Deneysel Hayvanları Biriminden alınan 250-350 gr ağırlığındaki otuz adet Sprague-Dawley erkek sıçan kullanılarak sırayla; 1. grup: Kontrol grubu, sadece pH'sı 4,2 olan 0,1M'lık sitrat tamponu intraperitoneal (i.p.) yolla verilen grup (n=6), 2. grup: Tek doz 60 mg/kg streptozotosin (STZ, Sigma Aldrich, Canada, ABD), i.p. (pH'sı 4,2 olan; 0,1M'lık sitrat tamponunda çözülerek) verildikten sonra, 15.gün sakrifiye edilen grup (n=6), 3. grup: Tek doz 60 mg/kg STZ, i.p. verildikten sonra, 30. gün sakrifiye edilen grup (n=6), 4. grup: Tek doz 60 mg/kg STZ, i.p. verilerek diyabet oluşturulup, SP600125'in (Tocris bioscience, Philadelphia, ABD) zeytinyağında çözülerek, i.p. yolla 15mg/kg, 4 gün boyunca günde 1 kez verildikten sonra, 15.gün sakrifiye edilen grup (n=6), 5. grup: Tek doz 60 mg/kg STZ i.p. verilerek diyabet oluşturulup, SP600125'in i.p. 15 mg/kg, 4 gün boyunca, günde 1 kez verildikten sonra, 30. gün sakrifiye edilen grup (n=6) oluşturulmuştur.

İmmünohistokimya prosedürü

İmmünohistokimyasal incelemeler için parafine gömülen testis doku örneklerinden 5 µm'lik kesitler

alınmış ve bir gece 56°C'lik etüvde bekletilmiştir. Ardından deparafinizasyon ve düşen alkol serilerinden (%100-%70) geçirilen preparatlar, antijen geri kazanımı için sitrat tamponunda (pH 6; Invitrogen, Frederick, ABD) mikrodalga fırın kullanılarak, kaynatılmıştır. Sonrasında kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini durdurmak için H₂O₂ (Abcam, Cambridge, ABD)'ye maruz bırakılmışlardır. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla, sekonder antikorun üretildiği türe uygun bloklama solüsyonunda (Invitrogen) 10 dk. inkübe edilen kesitler, oda sıcaklığında, antikor dilüe etme solüsyonuyla (Invitrogen) hazırlanan tavşan poliklonal Fas antikoruna (1/300 dilüsyonda; Novus Biologicals, Kolorado, ABD), tavşan poliklonal anti-FasL antikorunda (1/300 dilüsyonda; Abcam, Cambridge, İngiltere) ve tavşan poliklonal kaspaz 8 antikorunda (1/1000 dilüsyonda; Novus Biologicals) oda ısısında bir saat süreyle, nemli çemberde bekletilmişlerdir. Ardından kesitler, primer antikorun üretildiği türe karşı olan biyotinlenmiş sekonder antikorda (Invitrogen) 10 dk. oda ısısında tutulmuşlar ve son olarak HRP-streptavidin (Invitrogen) ile 10 dk muamele edilmişlerdir. 3,3'diaminobenzidine (DAB-Invitrogen) ile kromojenize edilen kesitlere, hematoksilin ile zıt boyama yapılmış ve entellan ile kapatılmışlardır. Hazırlanan preparatlar, BX-51 Olympus marka araştırma mikroskopunda incelenerek, fotoğrafları çekilmiştir.

Hücre Sayımı ve İstatistiksel Analiz

Fas, FasL ve kaspaz 8 immünreaktivite skorları; kesitlerin hangi grup deneğe ait olduğunu bilen ve bilmeyen birer araştırmacı tarafından, x200 büyütme kullanılarak, her preparatta 5 farklı alandaki, 1000 hücre içinde bulunan immünpozitif hücreler sayılarak yapılmıştır (10). İstatistiksel analizler için; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda SPSS 20.0 programı (Lisans no: 10240642) kullanılmış, değerler ortalama ± standart sapma (SD) olarak alınmıştır. P<0.05 değeri anlamlı kabul edilmiştir. Fas, FasL ve kaspaz 8 immünpozitif hücre sayıları, Mann-Whitney U testi uygulanarak değerlendirilmiştir.

Bulgular

Fas ve kaspaz 8 immünpozitif hücre sayılarının 2., 3., 4. ve 5. gruplarda 1. gruba göre (Fas için sırasıyla p=0.001, p=0.004, p=0.004, p=0.006; Kaspaz 8 için sırasıyla p=0.001, p=0.004, p=0.004, p=0.013), FasL immünpozitif hücre sayısının ise 4. grup hariç (p=0.950), diğer tüm gruplarda (sırasıyla;

p=0.004, p=0.004, p=0.013), 1. gruba göre anlamlı şekilde arttığı saptanmıştır (Tablo 1). Ayrıca Fas, FasL ve kaspaz 8 immünpozitif hücre sayıları; 2. gruba kıyasla, 4. grupta (Fas için p=0.019, FasL için p=0.013, kaspaz 8 için p=0.004) ayrıca 3. gruba kıyasla da 5. grupta anlamlı şekilde azalmıştır (Fas için p=0.004, FasL için p=0.006, kaspaz 8 için p=0.004; Tablo 1).

Tablo 1. Fas, FasL ve kaspaz 8 immünreaktivite skorları

	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
Fas	7,67 ± 2,42	22,83 ± 3,60 ^a	39,83 ± 6,94 ^a	14,17 ± 2,71 ^{a,b}	12,33 ± 2,58 ^{a,c}
FasL	9,67 ± 2,73	23,33 ± 3,27 ^a	38,83 ± 3,92 ^a	11,17 ± 2,14 ^b	17,50 ± 2,59 ^c
Kaspaz 8	4,83 ± 1,47	26,17 ± 2,99 ^a	53,67 ± 6,89 ^a	17,83 ± 2,32 ^{a,b}	9,67 ± 1,63 ^{a,c}

^a: 1. grup ile kıyaslandığında, ^b: 2. grup ile kıyaslandığında, ^c: 3. grup ile kıyaslandığında, p<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.

Fas immünreaktivitesi; 1. grupta spermatogonyumlarda, 2. grupta spermatogonyum ve geç spermatidlerde ve 3. grupta ise diyabet sebebiyle bazı tübüllerin spermatogenik seri hücrelerinde izlenmiştir (Şekil 1). JNK inhibitörü uygulanan 4. ve 5. gruplarda; Fas immünreaktivitesinin daha çok spermatogonyum ve spermatidlerde olduğu saptanmıştır (Şekil 1).

FasL immünreaktivitesinin ise 1. grupta Sertoli hücrelerinde, 2. ve 3. grupta Sertoli hücrelerine ek olarak spermatogonyumlarda olduğu izlenmiştir (Şekil 1). Dördüncü ve 5. gruplarda ise büyük ölçüde Sertoli hücrelerinde görülse de, yer yer spermatogonyumlarda da FasL immünreaktivitesi tespit edilmiştir (Şekil 1).

Kaspaz 8 immünreaktivitesi; 1. grupta spermatogonyum ve spermatozoidlerde izlenirken, 2. ve 3. grupta spermatogenik seri hücrelerinin tümünde gözlenmiştir (Şekil 1). JNK inhibisyonu uygulanan 4. ve 5. gruplarda ise kaspaz 8 immünreaktivitesi 1. gruba benzer olarak, sadece spermatogonyum ve spermatozoidlerde olduğu belirlenmiştir (Şekil 1).

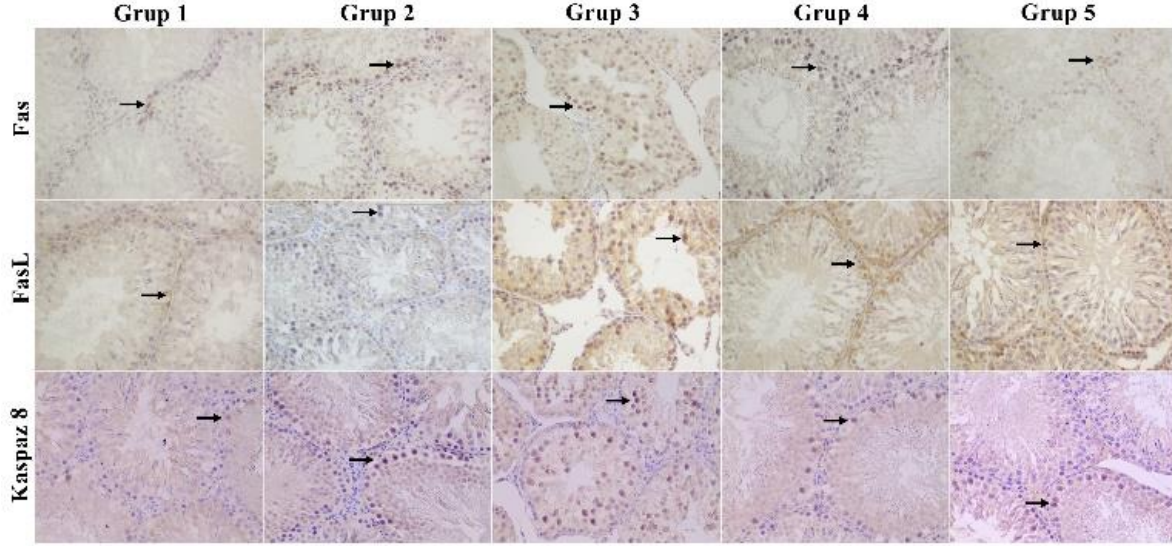
Tüm gruplarda Fas ve FasL immünreaktivitelerinin hücre membranı ve hücre sitoplazmasında, kaspaz 8 immünreaktivitesinin ise hücre sitoplazmasında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1).

Tartışma

Diyabetin önemli komplikasyonları arasında nefropati, retinopati, anjiyopati, kardiyovasküler

hastalıklar sıklıkla ifade edilirken, son dönemde yapılan çalışmalar, diyabete bağlı subfertilite ve infertilitenin de ciddi bir komplikasyon olduğu vurgulanmaktadır. Diyabete bağlı gerçekleşen subfertilite/infertilite komplikasyonlarında;

retrograd ejakülasyon, erektil disfonksiyon, hormonal bozukluklar ve sperm parametrelerindeki olumsuz değişikliklere ek olarak, oksidatif strese bağlı olarak artan ROS'un sebep olduğu apoptozisin de etkili olduğu bildirilmiştir (2, 17,18).



Şekil 1. Fas, FasL ve kaspaz 8 immün pozitif hücreler (→), X400 büyütme, hematoxilen zıt boyaması.

Apoptozis, intrinsek ve ekstrinsek sinyal yolları ile düzenlenmektedir. Fas, FasL ve kaspaz 8 proteinleri, apoptozisin ekstrinsek sinyal yolağında bulunan önemli proteinlerdir. FasL'in Fas ile etkileşimi, hücre içerisinde bulunan bir dizi ölüm proteinlerinin aktifleşmesini ve daha sonra efektör protein olan kaspaz 3 proteininin aktifleşmesini sağlayan kaspaz 8'i uyarır (10). Bu olaylar, hücre içinde bulunan çeşitli sinyallerin, reseptörler aracılığıyla, hücre nükleusuna iletilmesiyle gerçekleşir. MAPK'lar; embriyogenezis, gen ekspresyonu, proliferasyon ve apoptozis ile ilgili sinyallerin hücre nükleusuna iletilmesini sağlayan bir dizi protein kinazlardır (19).

Qi ve ark. (20) sıçanlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada; bisphenol-A uygulamasının, Sertoli hücrelerinde JNKs/p38 MAPK, Fas ve FasL proteinlerinin ifadelerinde artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Aggarwal ve ark. (21)'nin yaptıkları bir çalışmada ise sıçanlara, insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulanmasının, oksidatif strese neden olduğu ve buna bağlı olarak Leydig hücrelerinde apoptozisin arttığı ileri sürülmüştür. hCG uygulamasıyla, JNK/fosfo(f)JNK ifadesindeki artışa ek olarak, proapoptotik belirteçler olan Fas, FasL ve kaspaz 8 proteinlerinin ifadelerinin de arttığını vurgulamışlardır. Benzer şekilde, yapmış olduğumuz bu çalışmada, diyabete bağlı olarak ortaya çıkan oksidatif stresin apoptozisi tetiklediği

ve pro-apoptotik proteinler olan Fas, FasL ve kaspaz 8 ifadelerinin deneysel diyabet oluşturulan gruplarda arttığı görülmüştür.

Yaptığımız literatür taraması neticesinde pek çok araştırmacının üzerinde durduğu bir diğer konu ise; Fas aracılı testiküler apoptoziste bulunan Fas ve FasL proteinlerinin hangi hücrelerde ifade edildiği ve bu hücrelerdeki lokalizasyonu ile ilgilidir.

Lee ve ark. (22) kontrol grubu sıçanların testis dokularında Fas proteininin germ hücrelerinde ve spermatositlerde, FasL proteininin ise Sertoli hücrelerinde immünreaktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Mono-(-2etilhekzil) fitalat (MEHP) ile testis hasarı oluşturdukları grupta, Fas proteininin spermatositlerde belirgin bir artış gösterdiğini, FasL proteininin ise spermatositler etrafındaki Sertoli hücre sitoplazmasında yoğunlaştığını bildirmişlerdir. Kuinestrol ile testis hasarı oluşturan Li ve ark. (10) hem kontrol hem de deney gruplarında; Fas immünreaktivitesinin Leydig hücrelerinde, spermatosit I ve spermatidlerde, FasL immünreaktivitesinin ise Sertoli ve Leydig hücrelerinde gerçekleştiğini, ancak deney gruplarında immünpozitif hücrelerin sayıca daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Özenci ve ark. (23) deneysel varikosel oluşturdukları sıçanların testis dokularında, Fas ve FasL proteinlerini değerlendirmişlerdir. Fas immünreaktivitesinin

kontrol ve deney gruplarında, geç spermatidlerde ve Leydig hücrelerinde, FasL immünreaktivitesinin ise tüm gruplarda spermatogenik seri hücrelerinde, özellikle de erken ve geç spermatidlerde gözlemlendiğini, ancak deney gruplarında immünreaktivitenin daha yoğun olduğunu belirtmişlerdir.

Daha önceki çalışmamızda (24), kontrol grubu deneklerin testis dokularında Fas immünreaktivitesinin spermatogonyum, spermatid ve Leydig hücrelerinde, diyabet grubu testis dokularında ise Leydig hücrelerinde ve spermatogenik seriye ait hücrelerde olduğu görülmüştür. FasL immünreaktivitesi; kontrol grubunda Sertoli ve Leydig hücrelerinde izlenirken, diyabet grubunda Sertoli ve Leydig hücrelerinin yanı sıra, spermatogenik seriye ait hücrelerde de tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise Fas immünreaktivitesi; kontrol grubunda sadece spermatogonyumlarda, 2. grupta spermatogonyum ve geç spermatidlerde ve STZ uygulamasından 30 gün sonra sakrifiye edilen 3. grupta ise diyabetin etkisiyle hasarlanmış tübüllerde bulunan tüm spermatogenik seri hücrelerinde izlenmiştir. JNK inhibitörü uygulanan 4. ve 5. gruplarda Fas immünreaktivitesinin, spermatogonyum ve spermatidlerde olduğu görülmüştür. FasL immünreaktivitesinin 1. grupta Sertoli hücrelerinde, 2. ve 3. grupta Sertoli hücrelerine ek olarak spermatogonyumlarda olduğu tespit edilmiştir. 4. ve 5. gruplarda ise büyük ölçüde Sertoli hücrelerinde görülse de, yer yer spermatogonyumlarda da FasL immünreaktivitesi izlenmiştir.

JNK aktivasyonu; DNA hasarı, stres, ısı, radyasyon ve oksidatif stres gibi çeşitli hücrel ve çevresel streslere yanıt olarak gerçekleşmektedir (25, 26). JNK inhibisyonu, JNK genlerinin inaktivasyonu ile gerçekleşebildiği gibi, JNK ile katalitik etkileşime giren kimyasal maddelerle de gerçekleşebilmektedir. Bogoyevitch ve Arthur (11) karaciğer yetmezliği modelinde JNK inhibitörü olarak SP600125 kullanmış ve karaciğer hepatositlerindeki apoptoziste önemli bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bununla birlikte çeşitli in vivo ve in vitro çalışmalarda SP600125 kullanımının, apoptozisi önlemede etkili olduğu bildirilmiştir (27-30). Bu çalışmalarla paralel olarak, bizim çalışmamızda 2. ve 3. gruplarda yüksek bulunan pro-apoptotik Fas, FasL ve kaspaz 8 proteinlerinin ifadeleri, SP600125 uygulanan 4. ve 5. gruplarda azalmıştır.

Diyabetik testis dokularında görülen apoptoziste, Fas/ FasL sinyal yolağının önemli

etkilerinin olduğu ve JNK inhibitörü olan SP600125'in, JNK ile birlikte Fas/FasL sinyal yolağı üzerinden de, diyabetik testiküler apoptozisi önlemede önemli bir rol üstlenebileceği kanısındayız. Ancak yapmış olduğumuz bu çalışmanın, farklı kantitatif metodlarla da araştırılması ve özellikle diğer apoptotik yollarla karşılaştırılarak, öneminin vurgulanması gerektiği düşüncesindeyiz. Böylece diyabetik erkek hastalarda karşılaşılan subfertilite/infertilite olgularında, Fas/FasL sinyal yolağının inhibe edilmesiyle, yeni tedavi protokollerinin gündeme gelmesi mümkün olabilecektir.

Teşekkür

Çalışmamız, Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen TÜBAP-2013/25 no'lu projeden alınan hibe dokular kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

1. Donmez YB, Kizilay G, Topcu-Tarlacalisir Y. MAPK immunoreactivity in streptozotocin-induced diabetic rat testis. *Acta Cir Bras.* 2014; 29(10): 644-50.
2. Oridupa OA, Folasire OF, Owolabi AJ, Aina O. Effect of Traditional Treatment of Diabetes Mellitus with *Xanthosoma sagittifolium* on the Male Reproductive System of Alloxan-Induced Diabetic Wistar Rats. *Drug Res.* 2017; 67(6): 337-42.
3. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases apoptosis through JNK phosphorylation and Bax activation in rat testes. *J Vet Med Sci.* 2007; 69(9): 969-71.
4. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-XL and decreases the binding of pBad/14-3-3 in rat testis. *Life Sci.* 2007; 81(13): 1079-84.
5. Yigitturk G, Acara AC, Erbas O, Oltulu F, Yavasoglu NUK, Uysal A, et al. The antioxidant role of agomelatine and gallic acid on oxidative stress in STZ induced type I diabetic rat testes. *Biomed Pharmacother.* 2017; 87: 240-6.
6. Alves MG, Martins AD, Rato L, Moreira PI, Socorro S, Oliveira PF. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1832(5): 626-35.

7. Li CL, Chang L, Guo L, Zhao D, Liu HB, Wang QS, et al. β -elemene induces caspase-dependent apoptosis in human glioma cells in vitro through the upregulation of Bax and Fas/ FasL and downregulation of Bcl-2. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(23): 10407-12.
8. Sehgal V, Ram PT. Network Motifs in JNK Signaling. *Genes Cancer*. 2013; 4(9-10): 409-13.
9. Faid I, Al-Hussaini H, Kilarkaje N. Resveratrol alleviates diabetes-induced testicular dysfunction by inhibiting oxidative stress and c-Jun N-terminal kinase signaling in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015; 289(3): 482-94.
10. Li J, Chen F, Chen Y, Wang Z. Mitochondrial- and Fas-L-mediated pathways involved in quinestrone induced spermatogenic apoptosis in adult rat testes. *Toxicol Mech Methods*. 2014; 24(9): 609-15.
11. Bogoyevitch MA, Arthur PG. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JNK no more? *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1784(1): 76-93.
12. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O'Leary EC, Sakata ST, Xu W, et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(24): 13681-6.
13. Zhou L, Yang Z, Lu X, Li X, An X, Chai J, Yang Q, Yan S, Li Y. JNK inhibitor alleviates apoptosis of fetal neural stem cells induced by emulsified isoflurane. *Oncotarget*. 2017; 8(55): 94009-19.
14. Shen H, Wu N, Wang Y, Han X, Zheng Q, Cai X, Zhang H, Zhao M. JNK inhibitor SP600125 attenuates paraquat-induced acute lung injury: an in vivo and in vitro study. *Inflammation*. 2017; 40(4): 1319-30.
15. Hong Z, Hong Z, Wu D, Nie H. Specific MAPK inhibitors prevent hyperglycemia-induced renal diseases in type 1 diabetic mouse model. *Mol Cell Biochem*. 2016; 419(1-2): 1-9.
16. Mili D, Abid K, Rjiba I, Kenani A. Effect of SP600125 on the mitotic spindle in HeLa Cells, leading to mitotic arrest, endoreduplication and apoptosis. *Mol Cytogenet*. 2016; 9: 86.
17. Al-Roujeaie AS, Abuhashish HM, Ahmed MM, Alkhamees OA. Effect of rutin on diabetic-induced erectile dysfunction: Possible involvement of testicular biomarkers in male rats. *Andrologia*. 2016; doi: 10.1111/and.12737.
18. Amaral S, Oliveira PJ, Ramalho-Santos J. Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. *Curr Diabetes Rev* 2008;4(1):46-54.
19. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 2004; 23(16): 2838-49.
20. Qi S, Fu W, Wang C, Liu C, Quan C, Kourouma A, et al. BPA-induced apoptosis of rat Sertoli cells through Fas/FasL and JNKs/p38 MAPK pathways. *Reprod Toxicol*. 2014; 50: 108-16.
21. Aggarwal A, Misro MM, Maheshwari A, Sehgal N, Nandan D. N-acetylcysteine counteracts oxidative stress and prevents hCG-induced apoptosis in rat Leydig cells through down regulation of caspase-8 and JNK. *Mol Reprod Dev*. 2010; 77(10): 900-9.
22. Lee J, Richburg JH, Younkin SC, Boekelheide K. The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*. 1997; 138(5): 2081-8.
23. Celik-Ozenci C, Sahin Z, Ustunel I, Akkoyunlu G, Erdogru T, Korgun ET, et al. The Fas system may have a role in male reproduction. *Fertil Steril*. 2006; 85: 1168-78.
24. Bayram S, Kizilay G, Topcu-Tarladacalisir Y. Evaluation of the Fas/FasL signaling pathway in diabetic rat testis. *Biotech Histochem*. 2016; 91(3): 204-11.
25. Shi Y, Song Y, Wang Y, Wang Y, Liang X, Hu Y, et al. beta-Benzene hexachloride induces apoptosis of rat Sertoli cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNKs and FasL. *Environ Toxicol*. 2011; 26(2): 124-35.
26. Munshi A, Ramesh R. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response. *Genes Cancer*. 2013; 4(9-10): 401-8.
27. Li LM, Liu QH, Qiao JT, Zhang C. Abeta(31-35)-induced neuronal apoptosis is mediated by JNK-dependent extrinsic apoptosis pathway. *Neurosci Bull*. 2009; 25(6): 361-6.
28. Bai M, Liu Y, Yin D, Zhang M, Wang Y, Ma X, et al. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase signaling suppresses skin flap apoptosis in a rat ischemia and/or reperfusion model. *J Surg Res*. 2016; 206(2): 337-46.

29. Bao L, Zu J, He Q, Zhao H, Zhou S, Ye X, et al. Thrombin-induced apoptosis in neurons through activation of c-Jun-N-terminal kinase. *Toxicol Mech Methods*. 2017; 27(1): 18-23.

30. Moon DO, Kim MO, Kang CH, Lee JD, Choi YH, Kim GY. JNK inhibitor SP600125 promotes the formation of polymerized tubulin, leading to G2/M phase arrest, endoreduplication, and delayed apoptosis. *Exp Mol Med*.

