

**59350**

T.C.  
Marmara Üniversitesi  
Tıp Fakültesi  
Üroloji Anabilim Dalı

**KALSİYUM KANAL BLOKERLERİNİN BÖBREKTE İSKEMİYE  
BAĞLI OLUŞAN APOPTOZİSE ETKİLERİ**

T 59350

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hakan ÖZVERİ  
İstanbul, 1997

## İÇİNDEKİLER:

Giriş ve Amaç.....	3-4
Genel Bilgiler.....	5-9
Gereç ve Yöntem.....	9-11
Bulgular.....	12-20
Tartışma.....	21-23
Özet.....	23-24
Sonuç.....	25
Kaynaklar.....	26-29

## GİRİŞ VE AMAC:

Günümüzde Kronik Böbrek Yetmezliğinin en etkin tedavisinin böbrek transplantasyonu olduğu bilinmektedir. Dünyada böbrek transplantasyonunda kaynak olarak kadavra kullanılmakta, buna karşılık ülkemizde daha çok canlı vericiler tercih edilmektedir(1).

Transplante böbrekte görülen gecikmiş graft fonksiyonunun patofizyolojisi, üzerinde oldukça çalışılmış bir konudur. Gecikmiş graft fonksiyonu iskemik ve/veya immünolojik nedenlere bağlı olabileceği gibi, bu iki faktörün sinerjistik etkisi ile de ortaya çıkabilir(2).

Gecikmiş graft fonksiyonunu önlemede kullanılan ajanlardan birisi de kalsiyum kanal blokerleridir. Bazı araştırmacılar tarafından iskemi ile hücrede meydana gelen hasarda kalsiyum iyonu( $Ca^{+2}$ ) ana mediyatör olarak gösterilmiştir(3). Kalsiyum kanal blokerlerinin renal iskemiye bağlı olarak böbreğin glomerüler filtrasyon hızında görülen düşmeyi hangi mekanizma ile azalttığı tam olarak bilinmemektedir. Kalsiyumun mitokondriyal birikiminde azalma(4-7), reperfüzyona bağlı oluşan hasarın önlenmesi (4, 7, 8), artmış sempatik stimülasyon esnasında normal otoregülasyonun restorasyonu(9), böbrek kan akımında görülen artma (8, 10), afferent arteriyol ve preglomerüler damarlarda görülen selektif vazodilatasyon (11) kalsiyum kanal blokerlerinin renal iskemide ortaya çıkan hasarı önleme etkilerini açıklamak için öne sürülen mekanizmalardır.

Bu çalışmalar incelendiğinde iskemi ile böbrekte ortaya çıkan fizyopatolojik değişikliklerin ötesinde hücresel düzeyde ortaya çıkan histopatolojik değişikliklerin gecikmiş graft fonksiyonu üzerindeki etkisinin araştırılmadığı ve bu değişiklikler ile graft sağ kalım oranları ilişkisinin incelenmediği görülmektedir.

Bu noktada, bugüne kadar bilinen veriler ışığında canlı sistemlerde var olan iki tip hücre ölümünden birisi olan apoptozisin, iskemi ile hücrede ortaya çıkan morfolojik değişikliklerdeki rolünün de tam olarak anlaşılamadığı görülmektedir. Donör böbreklerinde oluşan sıcak iskemi sonrasında koruyucu amaçlı olarak uygulanan soğuk

iskemi ile hücrede histolojik olarak fonksiyon kaybını engelleyen mekanizma tam açıklığa kavuşmamıştır.

Apoptozis birbirinden farklı fizyolojik ve deneysel olaylarla indüklenebilirse de, çalışmaların çoğunda sitoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyon artışı programlanmış hücre ölümünü başlatan bir sinyal olarak değerlendirilmektedir(12-14). Aynı zamanda bazı tümör hücre kültürlerinde apoptozisin  $Ca^{+2}$  eksikliği olan durumlarda(15) azaldığı görülmüştür. Diğer yandan  $Ca^{+2}$  iyonoforları apoptozisi indüklemekte (16),  $Ca^{+2}$  şelatörleri ise önlemektedir.

Deneysel veriler incelendiğinde renal iskemi sonucu oluşan renal hücre ölümünün apoptozis yolu ile olduğunu düşündüren bulguların mevcudiyeti görülmektedir(17).

Bu bilgilerin ışığı altında  $Ca^{+2}$  kanal blokerlerinin kullanılması ile iskemik böbrekte görüldüğü bilinen apoptotik hücre değişikliklerinin önlenebildiğinin gösterilebilmesi iskemiye uğramış böbrekte fonksiyon kaybı ya da gecikmesinin patolojisini anlamak bakımından önem kazanmaktadır.

Bu çalışmanın amacı bir sıçan modelinde soğuk iskemiye bağlı olarak böbrekte oluşan apoptotik hücre ölümünde kalsiyum kanal blokerlerinin rolünün araştırılmasıdır.

## **GENEL BİLGİLER:**

### **GEÇİKMİŞ GRAFT FONKSİYONUNUN NEDENLERİ:**

İskemik nedenlere bağlı görülen graft fonksiyonu gecikmesinin en önemli nedeni akut tübüler nekrozdur(ATN). İskemi esnasında, böbrek dokusu oksijen ve nütrisyonel faktörlerin eksikliğine maruz kalmaktadır. ATN'a canlı vericiden yapılan böbrek transplantasyonlarından sonra çok sık rastlanmamakta buna karşılık kalp atımı olan kadavra böbreklerinden yapılan transplantasyonlardan sonra daha sıklıkla karşılaşılmaktadır.

İskemi esnasında hücrel metabolik olaylar çalışmaya devam etmektedir. Bunun sonucu olarak hücrede görülen olayların başında, Adenozin Trifosfat(ATP) düzeylerinde oluşacak azalma ve adenozin difosfatın mitokondri içerisine doğru olması gereken hareketinde ki azalma gelmektedir. Hücrenin anaerobik bir metabolizmaya doğru kayması, hücre içi laktik asid miktarının artmasına ve pH'nın azalmasına yol açar(18).

Hücre içinde enerjiye gereksinimin en fazla olduğu fonksiyonlardan birisi sodyum/potasyum pompası ile düzenlenen hücre içi sodyum ve su dengesidir. Bu pompanın çalışmasında meydana gelecek bir aksama, hücrel, mitokondriyal ve nükleer şişme meydana getirecek ve sonuçta hücre işlevini kaybedecektir. Artmış hücre dışı potasyum(K),  $Ca^{+2}$  iyon kanallarını aktive edecek ve bunun sonucunda sitozolik Ca iyon konsantrasyonu artacak, bu da fosfolipaz ve benzeri yıkıcı enzimlerin aktivasyonuna yol açacaktır(19,20)

Yukarıda sayılan olaylardan başka ATP'nin AMP'ye dönüşümü esnasında bir ara ürün olarak ortaya çıkan ve potansiyel olarak en tehlikeli yıkım ürünlerinden biri olan hipoksantin hücre içinde birikecektir. NAD indirgeyici ksantin dehidrogenazın, oksijen radikali üretimine neden olan ksantin oksidaza dönüşümünün tetiklenmesi sonucu adenozin trifosfat sentezi için gerekli pürinlerin geri dönüşümsüz olarak kaybı meydana gelecek ve reperfüzyon esnasında hipoksantinden serbest oksijen radikalleri oluşacaktır(21-22)

Böbrekte oluşan iskemi esnasında çeşitli hücrel koruyucu mekanizmalar da aktive olmaktadır. İskemiye yanıt olarak, hücrenin metabolik aktivitesi hızla azalır(23). Prostaglandinlerin ve nitrik oksidin (NO) lokal olarak ortama yayılması ile böbrek medüller kan akımı arttırılmaya çalışılır(24,25). Moleküler düzeyde hücre koruyucu maddelerin üretimine ya da rejenerasyonuna yardımcı olacak genlerin transkripsiyonunda artma görülür(26,27)

### **Reperfüzyon hasarı:**

Transplante edilen böbrekte kan akımının yeniden başlaması ile oluşan olayların hepsine genel olarak reperfüzyon hasarı adı verilmektedir. Bu tanımlama günümüzde artık serbest oksijen radikallerine bağlı hasar olarak tanımlanmakta ise de perfüzyon basıncında ani artma ile ortaya çıkan endotel hasarı ve oluşan inflamasyonda bu hasarda rol oynamaktadır(28).

Sunulan çalışmada böbrekler reperfüzyona maruz bırakılmadığından buna bağlı oluşabilecek gecikmiş graft fonksiyonunun etyopatogenezi bu çalışmanın konusu dışındadır.

### **ORGAN KORUMA YÖNTEMLERİ:**

Canlı bir organın korunması bir transplantasyonun başarısını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Transplante edilecek organın, operasyona kadar gerekli hazırlıkların tamamlanması(doku tiplmesi, uygunluğu ile ilgili testler gibi) için geçen sürede en ideal koşulda saklanabilmesi gerekmektedir. Burada en önemli sorun organın iskemiye bağlı hipoksidede kalması ve buna bağlı oksijenasyonunun bozulmasıdır. Bu sorunu çözmek için günümüzde kullanılan en önemli yaklaşımlar: 1-) Organın metabolik inhibisyonu 2-) Organa fizyolojik olarak gerekli minimum metabolik aktivitenin devamlılığının sağlanabilmesidir.

Metabolik inhibisyon ile koruma esnasında hücrede geri dönüşümsüz hasara neden olabilecek katabolik olayların önlenmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç en iyi hipotermi ile sağlanmaktadır(29). Hipotermi metabolik aktiviteyi yavaşlatmakta ve bu şekilde hücrenin oksijen ihtiyacını azaltmaktadır.

Hipoterminin oluşturulması amacı ile kullanılan temel metodlar protein baz bir solüsyonun pompa yardımı ile pulsatil tarzda perfüzyonu(30) veya hipotermik yıkama(flushing) sonrası basit olarak buz içinde korumadır(31). Her iki yöntem kullanılarak köpek böbrekleri üzerinde yapılan çalışmalarda koruyucu etki bakımından aynı sonuçların elde edilmesinden sonra (32) basit olarak soğuk koruma yapılması yaygın kabul görmüş bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir. Makina yardımı ile yapılan perfüzyonlar ile 48 saatten uzun süreli koruma sağlandığı bildirilmiştir(33). Haberal ve ark. tarafından bu yöntem ile 95 saate kadar böbreklerin korunabildiği bildirilmiştir(34). Günümüzde, özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde koruyucu amaçlı olarak değişik solüsyonlar kullanılmaktadır(University of Wisconsin solüsyonu(UW) ya da Euro-Collins solüsyonu gibi). Burada amaç bu solüsyonların içerdiği geçirgen olmayan eriyik maddeler yardımı ile hücre şişmesinin minimuma indirilebilmesidir.

## **APOPTOZİS:**

Apoptozis ilk olarak 1972 yılında Kerr tarafından hücre ölümünün fizyolojik bir formu olarak tanımlanmıştır(35). Kelime anlamı olarak apoptozis(apo-TOE-sis) eski Yunanca da sonbaharda yaprak dökümü anlamına gelmektedir. Bu kelimenin seçilmesindeki neden apoptozisin hücre yaşamının doğal bir seyri olduğunu belirtebilmek ve canlılığın yaşamını devam ettirebilmesi için hücre ölümünün gerekliliğini ifade edebilmektir(36). Apoptozis ile mitoz (mitosis) arasındaki kafiye uyumu da aslında normal fizyolojik olaylar çerçevesinde hücre doğumunun hücre ölümü tarafından dengelenen bir unsur olduğunu ifade edebilmek için isteyerek yaratılmıştır.(37-38).

Temel olarak apoptozis canlı sistemlerde var olan 2 temel hücre ölüm olayından bir tanesidir. Diğer tip hücre ölümü ise nekrozdur. Apoptozis transkripsiyon ve translasyon gibi hücre işlevlerin aktif olarak katılması ile gerçekleşen ve enerji harcanmasını gerektiren bir olaydır (11-13). Apoptozis sırasında ortaya çıkan ilk olaylardan bir tanesi genomik DNA' nın parçalanmasıdır(39). Bu parçalanma genomik DNA'nın nükleozomal oligomere (yani 180 nükleotid baz çifti ve katları uzunluğunda alt üniteler) yıkımını içerir. Parçalanmadan sorumlu olan,  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  iyonlarına bağımlı ve hücre

çekirdeğinde var olan bir endonükleazın, intrasellüler  $Ca^{+2}$  düzeylerinin artması ile aktif hale gelmesidir (40) .

Apoptozis varlığı aşağıdaki özelliklerle saptanmaktadır(41):

- 1-) Hücre çekirdeği ve sitoplazmik kondensasyon, 2-)Membranda düzensizlik,
- 3-) Apoptotik cisimcikler (hücre membranı ile sarılmış çekirdek parçacıkları).

Apoptozis birbirinden farklı fizyolojik ve deneysel olaylarla indüklenebilirse de, çalışmaların çoğunda sitoplazmik  $Ca^{+2}$  konsantrasyon artışı hücre ölümünün başlayışını indükleyen bir sinyal olarak değerlendirilmektedir(11-13 ). Aynı zamanda bazı tümör hücre kültürlerinde apoptozisin  $Ca^{+2}$  eksikliği olan durumlarda(14) azaldığı görülmüştür; diğer yandan  $Ca^{+2}$  iyonoforları apoptozisi indüklemekte (15),  $Ca^{+2}$  şelatörleri ise önlemektedir.

### **İSKEMİ ve APOPTOZİS:**

Böbrekte iskemi sonucu oluşan hücre ölümünün apoptozis yolu ile olduğunu düşündüren bulgular mevcuttur(17).

İskemi ile ortaya çıkan morfolojik değişiklikleri incelemek amacı ile Gobe ve ark. tarafından yapılan bir hayvan iskemi modelinde, böbrekte oluşturulan parsiyel iskemi sonrası oluşan patolojik değişiklikler değerlendirilmiştir(42). Bu çalışmada böbrek arteri üzerinde parsiyel olarak oluşturulan obstrüksiyon sonrası ilk 2-8 günde böbrek epitel hücrelerinde nekroz ve apoptozisin beraber görüldüğü tespit edilmiş, 10-28. günlerde böbrek epitel hücrelerinde azalmanın devam ettiği, böbrek kitlesinde önemli azalma olduğu, ancak yalnızca apoptozisin tespit edilebildiği saptanmıştır. Unilateral atrofi oluştuktan sonra kontralateral böbreğin çıkarılması ile atrofik böbrekte belirgin olarak geriye dönüşüm olduğu da görülmüştür. Daha sonra Schumer ve ark. tarafından yapılan bir diğer çalışmada sıçanlarda oluşturulan iskemi modelinde, değişik iskemi sürelerinde(5, 30, 45 dk.) perfüzyon yapıldıktan sonra belli sürelerde yapılan patolojik incelemelerde saptanan nekrotik ve apoptotik hücre ölümleri karşılaştırılmıştır(43). 5 dk. iskemi uygulanan grupta perfüzyon sonrası 24 ve 48 saat sonra yapılan incelemelerde hiç nekroz olmadığı ve çok az miktarda apoptozis olduğu, 30 ve 45 dk. komplet iskemiye maruz kalan grupta ise perfüzyon sonrası 12, 24 ve 48 saat sonra yapılan



değerlendirmelerde jel elektroforezinde apoptozisin saptandığı belirlenmiştir. Bu çalışmalardan başka yapılan diğer çalışmalarda böbrekte oluşan iskeminin yarattığı morfolojik değişikliklerde apoptozisin önemli bir yeri olduğu da ifade edilmektedir. Rosenberg ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada iskemik renal hasar sonrası reperfüzyon ile birlikte bazı gen ekspresyonlarında artma olduğu belirtilmiştir(44). Bu genlerden önemli bir tanesi "Sulfated Glycoprotein-2" olarak adlandırılan (Diğer adı ile Clusterin ya da TRPM-2) ve prostatta androjen ablasyonu sonrası görülen ve apoptoziste indüksiyonu arttığı bilinen gendir(45). Bunun dışında apoptozis post-transplant akut tübüler nekroz patolojisinde önemli yeri olan bir değişikliktir(46).

Sunulan çalışmada renal iskemi sırasında ortaya çıkan apoptozisi göstermek ve mümkünse engellemek amacı ile değişik  $Ca^{+2}$  kanalı blokleri solüsyonlarının kullanılması planlanmıştır.

## **GEREÇ VE YÖNTEM**

4 haftalık sağlıklı Sprague-Dawley cinsi sıçanlar(225-300 gr) standard ısı ve nem koşullarında ve limitsiz su ve gıda temini ile beslendiler. Toplam 18 sıçan (35 böbrek) aşağıda belirtilen gruplara ayrıldı:

A-Kontrol : Nefrektomi yapıldıktan sonra koruyucu amaçlı bir işlem yapılmayadan histolojik ve in-situ end labeling ile apoptozis değerlendirmesi yapılan sıçanlar. (Toplam 5 böbrek)

B- Grup 1 : Nefrektomi yapıp yüzey soğutması uygulanan ancak herhangi bir perfüzyon yapılmayan grup.( Toplam 5 böbrek )

C- Grup 2 : Nefrektomi sonrası Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve yüzey soğutma uygulanan grup.( Toplam 5 böbrek )

D- Grup 3 : Nefrektomi sonrası 0.5 mg/kg Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve yüzey soğutma uygulanan grup. (Toplam 5 böbrek )

E- Grup 4 : Nefrektomi sonrası 1.2 mg/kg dozunda Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve yüzey soğutma uygulanan grup. (Toplam 5 böbrek)

F- Grup 5 : Nefrektomi öncesi 0.5 mg/kg sistemik Verapamil infüzyonu, nefrektomi sonrası Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve yüzey soğutma uygulanan grup. (Toplam 5 böbrek)

G-Grup 6 : Nefrektomi öncesi 1.2 mg/kg dozunda sistemik Diltiazem infüzyonu, nefrektomi sonrası Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve yüzey soğutma uygulanan grup. (Toplam 5 böbrek)

Bu gruplandırmaya göre ayrılan sıçanlar 100 mg/kg Ketalar anestezisini takiben orta hat abdominal insizyon ile eksplore edildi ve her iki böbrek bulunup suprarenal ve infrarenal düzeyde aorta klempe edildikten sonra, böbrekler en-blok olarak çıkarıldı. Aorta kanüle edilerek bulunduğu gruba göre +4 C<sup>0</sup> Ringer solüsyonu ve uygun ajan ile perfüze edildi ve daha sonra buzlu Ringer solüsyonu (ice-slush) içine konuldu. Bu işlemden 1, 6, 12, 24 ve 48 saat sonra her gruptan belirlenen saatlerde birer böbrek çıkarılarak histolojik değerlendirme ve insitu end-labeling yöntemi için %10'luk nötral tamponlu formalin içerisine alındı.

### **Histolojik Değerlendirme:**

Daha önce %10'luk nötral tamponlu formalin içerisinde fikse edilen doku parçalarından parafin takip ve bloklama sonrası mikrotom ile 4 µm kalınlığında mikroskopik kesitler alındı ve histolojik inceleme için hematoksilin ve eozin (H+E) ile boyandı. Tüm örnekler ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Her grupta bulunan örnekler kontrol grubuna oranla korunma derecesine göre derecelendirildi. Buna göre örnekler:

1. İyi korunmuş örnekler
2. Hafif değişiklikler saptanan örnekler
3. Orta derecede değişiklikler saptanan örnekler
4. Şiddetli derecede değişiklikler saptanan örnekler
5. Çok şiddetli derecede değişiklikler saptanan örnekler olarak 5 gruba ayrıldı.

### **Apoptozisin saptanması: (In Situ End Labeling; ISEL)**

Parafin içerisine gömülen dokulardan 4 µm. kalınlığında histolojik kesitler elde edilerek silanli lam üzerinde fikse edilerek xylene ile yapılan deparafinizasyon ve derecelendirilmiş alkol serilerindeki rehidratasyonu takiben, endojen peroksidaz 20 dk. PBS içinde bulunan %0.5'lik hydrogen peroxide ile 20 dk. bloke edildi. Hazırlanan kesitler Proteinaz-K solüsyonu ile ( 20 µg/ml ) oda sıcaklığında 15 dk. süre ile inkübe edildi. Bunu takiben kesitler cacodylate buffer ile kaplanarak (140mM Sodyum Cacodylate, 30 mMTRIS-HCl (pH 7,2), 1 mM CoCl) 10 dakika inkübe edildi. Bu tampon daha sonra 5 ünite/ µl TdT ve 0.5 nmol/µl bio-11-dUTP eklenmiş cacodylate buffer ile değiştirilerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Post-hibridizasyon yıkamaları 0.3 M NaCl ve 0.03 M Sodium Citrate içeren son tamponda 30 dk. süre ile yapıldı. Bu işlemi avidin-biotin-horseradish peroxidase ve diaminobenzidine yöntemi ile apoptotik hücrelerin görünür hale getirilmesi aşaması izledi. Apoptotik hücre sayısı böbrek tübül hücrelerinde 400 adet hücre sayılarak oran olarak belirlendi (Apoptotik indeks).

Apoptotik İndeks (%) = 100 X ( Apoptotik Hücrelerin Sayısı/ Toplam Sayılan hücre)

Negatif kontrol olarak bazı kesitler TdT içermeyen cocodylate buffer ile inkübe edildi.

Oluşturulan 6 gruba uygulanan farklı metodlarla elde edilen veriler kontrol grubuna göre değerlendirildi.

## **BULGULAR:**

### **1. Histolojik Değerlendirme Bulguları:**

#### **A. İyi korunmuş örnekler: ( Histolojik korunma derecesi: 1 )**

Burada hücrelerde hafif ödem ve konjesyon ve distal tübül epitel hücrelerinde hafif incelleme dışında özellik saptanmadı. (Resim.1)

Aşağıda bildirilen örnekler bu özellikleri göstermekte idi:

- 1.Nefrektomi sonrası 1. saatte incelenen böbrek
- 2.Nefrektomi sonrası Yalnızca 1 saat yüzey soğutma uygulanan ancak herhangi bir perfüzyon uygulanmayan böbrek
- 3.Nefrektomi sonrası Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 1 saat yüzey soğutma uygulanan grup.
4. Nefrektomi öncesi 0.5 mg/kg sistemik Verapamil infüzyonu, nefrektomi sonrası Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 1 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.

#### **B. Hafif değişiklikler saptanan örnekler: ( Histolojik korunma derecesi : 2 )**

Bu grupta da hafif ödem ve konjesyona ek olarak hücrelerin boyutlarında hafif küçülme olduğu, birkaç intrasitoplazmik vakuol ve çekirdeklerde kondensasyon ile birlikte glomerüllerde konjesyon olduğu saptandı.(Resim.2)

Aşağıda bildirilen örnekler bu özellikleri göstermekte idi:

1. Nefrektomi yapıp 6. saatte incelenen böbrek.
2. Nefrektomi yapıp 6 saat yüzey soğutması uygulanan ancak herhangi bir perfüzyon yapılmayan böbrekler.
3. Nefrektomi sonrası Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 1 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.

4. Nefrektomi sonrası 1.2 mg/kg dozunda Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 6 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
5. Nefrektomi öncesi 1.2 mg/kg sistemik Diltiazem infüzyonu, nefrektomi sonrası Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 1 saat yüzey soğutma uygulanan grup.
6. Nefrektomi öncesi 1.2 mg/kg sistemik Diltiazem infüzyonu, nefrektomi sonrası Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 6 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.

**C. Orta derecede değişiklikler saptanan örnekler: ( Histolojik korunma derecesi:3 )**

Hafif değişiklikler saptanan grupta görülen değişikliklere ek olarak bu grupta yaygın vakuolizasyon, hücre çekirdeğinde piknotik değişikliklerin yanı sıra seyrek, soluk-iridüzensiz çekirdekler(karyoreksis), distal tübüllerden başka proksimal tübüllerde de başlayan belirgin dejenerasyon ve glomerüllerde piknotik çekirdekli hücreler saptandı. (Resim.3)

Aşağıda bildirilen örnekler bu özellikleri göstermekte idi:

1. Nefrektomi yapıp 12. saatte incelenen böbrek.
2. Nefrektomi yapıp 12 saat yüzey soğutması uygulanan ancak herhangi bir perfüzyon yapılmayan böbrekler
3. Nefrektomi yapıp 24 saat yüzey soğutması uygulanan ancak herhangi bir perfüzyon yapılmayan böbrekler
4. Nefrektomi sonrası Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 6 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
5. Nefrektomi sonrası 1.2 mg/kg dozunda Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 1 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
6. Nefrektomi sonrası 1.2 mg/kg dozunda Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 12 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
7. Nefrektomi sonrası 0.5 mg/kg dozunda Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 6 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.

#### **D. Şiddetli değişiklikler saptanan örnekler: ( Histolojik korunma derecesi : 4 )**

Orta derecede saptanan değişikliklere ek olarak bu grupta, glomerüllerde belirgin dejenere hücreler, piknotik çekirdekler, hem distal hem de proksimal tübüllerde epitelyal düzensizlik, belirgin karyoreksis, yaygın intrasitoplazmik vakuolizasyon ve doku bütünlüğünün yer yer bozulması ile giden değişiklikler saptandı. (Resim.4)

Aşağıda bildirilen örnekler bu özellikleri göstermekte idi:

1. Nefrektomi yapıp 48 saat yüzey soğutması uygulanan ancak herhangi bir perfüzyon yapılmayan böbrekler.
2. Nefrektomi sonrası Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 12 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
3. Nefrektomi sonrası 0.5 mg/kg dozunda Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 12 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
4. Nefrektomi öncesi 0.5 mg/kg sistemik Verapamil infüzyonu, nefrektomi sonrası Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 6 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
5. Nefrektomi öncesi 0.5 mg/kg sistemik Verapamil infüzyonu, nefrektomi sonrası Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 12 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
6. Nefrektomi öncesi 1.2 mg/kg sistemik Diltizem infüzyonu, nefrektomi sonrası Diltizem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 24 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.

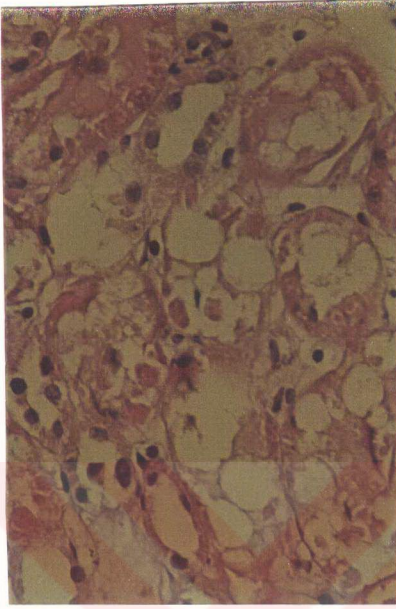
#### **E. Çok şiddetli değişiklikler saptanan örnekler: ( Histolojik korunma derecesi : 5 )**

Bu gruptaki örneklerde yaygın nekroz, silik karyorektik çekirdekler izlenmekte ve hücre detaylarının tamama yakın silindiği görülmektedir. (Resim.5)

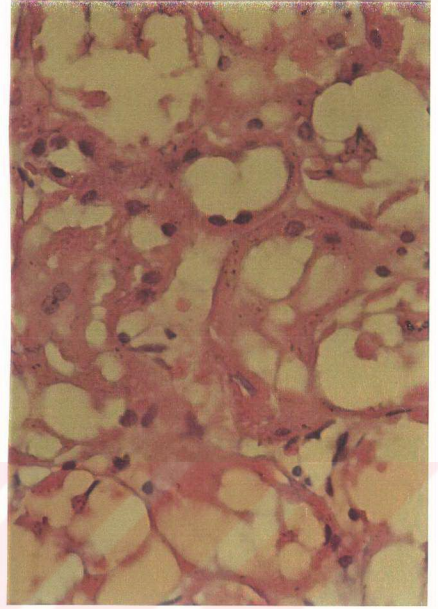
Aşağıda bildirilen örnekler bu özellikleri göstermekte idi:

1. Nefrektomi yapıp 24. saatte incelenen böbrek.
2. Nefrektomi yapıp 48. saatte incelenen böbrek.

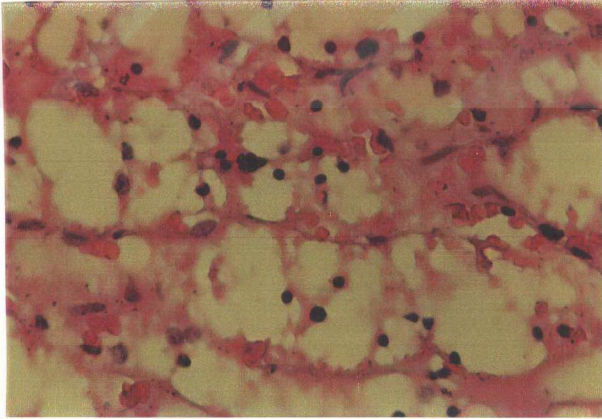
3. Nefrektomi sonrası Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 24 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
4. Nefrektomi sonrası Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 48 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
5. Nefrektomi sonrası 1.2 mg/kg dozunda Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 24 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
6. Nefrektomi sonrası 0.5 mg/kg dozunda Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 24 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
7. Nefrektomi sonrası 0.5 mg/kg dozunda Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 48 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
8. Nefrektomi sonrası 1.2 mg/kg dozunda Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon uygulanan ve 48 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
9. Nefrektomi öncesi 0.5 mg/kg sistemik Verapamil infüzyonu, nefrektomi sonrası Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 24 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
10. Nefrektomi öncesi 1.2 mg/kg sistemik Diltiazem infüzyonu, nefrektomi sonrası Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 12 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
11. Nefrektomi öncesi 0.5 mg/kg sistemik Verapamil infüzyonu, nefrektomi sonrası Verapamil içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 48 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.
12. Nefrektomi öncesi 1.2 mg/kg sistemik Diltiazem infüzyonu, nefrektomi sonrası Diltiazem içeren Ringer solüsyonu ile perfüzyon ve 48 saat yüzey soğutma uygulanan böbrekler.



Resim 1. İyi Korunmuş örnek

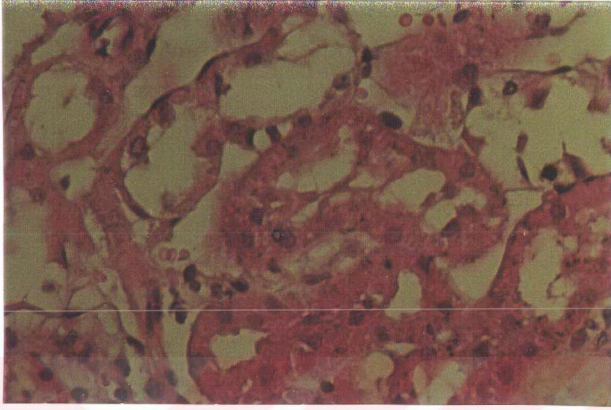


Resim 2. Hafif Değişiklikler

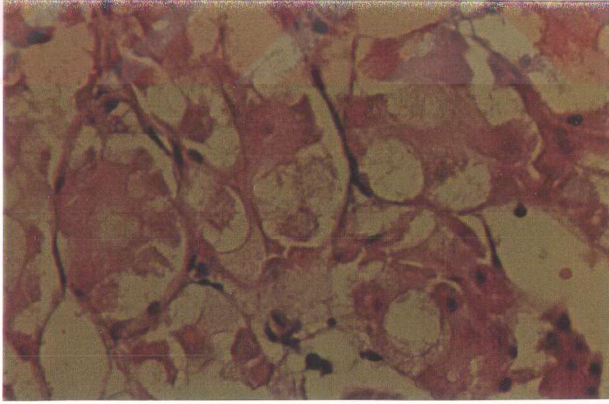


Resim. 3: Orta Derecede Değişiklikler





Resim.4 : Şiddetli Değişiklikler



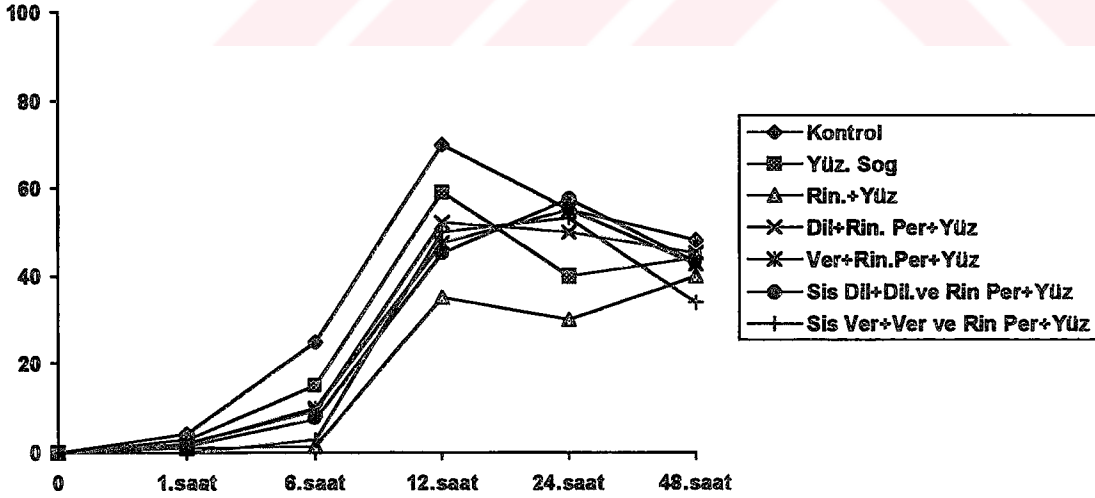
Resim. 5: Çok Şiddetli Değişiklikler

## 2. İSEL:

### APOPTOTİK İNDEKS(%) ve HİSTOLOJİK KORUNMA DERECESİ

	1.saat	6.saat	12.saat	24.saat	48.saat
<b><u>Kontrol Grubu.</u></b>	4.0(1)	25.0( 2)	70.0(3)	55.0(5)	48.0(5)
Yalnızca Nefrektomi					
<b><u>Grup 1-Yalnızca Yüzey</u></b>	3.0(1)	15.0(2)	59.0(3)	40.0(4)	44.0(5)
Soğutma Uygulanan Grup:					
<b><u>Grup 2-Nefrektomi sonrası Ringer Sol. ile Perfüzyon +</u></b>	1.0(2)	1.5(3)	35.0(4)	30.0(5)	40.0(5)
<b><u>Yüzey Soğutma Uygulanan Grup:</u></b>					
<b><u>Grup-3: Nefrektomi sonrası Verapamil içeren Ringer</u></b>	2.0(1)	10.0(3)	47.5(4)	55.0(5)	42.5(5)
<b><u>Sol. ile Perfüzyon+ Yüzey Soğutma Uygulanan Grup:</u></b>					
<b><u>Grup-4: Nefrektomi sonrası Diltizem içeren Ringer Sol.</u></b>	2.0(2)	9.5(3)	52.0(3)	50.0(4)	45.0(5)
<b><u>ile Perfüzyon + Yüzey Soğutma Uygulanan Grup:</u></b>					
<b><u>Grup-5: Sistemik Verapamil + Verapamil içeren Ringer</u></b>	0.0(1)	3.0(3)	50.0(4)	53.0(5)	34.0(5)
<b><u>Sol. ile Perfüzyon + Yüzey Soğutma Uygulanan Grup</u></b>					
<b><u>Grup-6: Sistemik Diltizem + Diltizem İçeren Ringer Sol.</u></b>	1.5(2)	7.5(2)	45.0(5)	57.5(4)	43.0(5)
<b><u>ile Perfüzyon + Yüzey Soğutma Uygulanan Grup</u></b>					

Tablo: 1. Çalışma gruplarında saptanan apoptotik indeksler



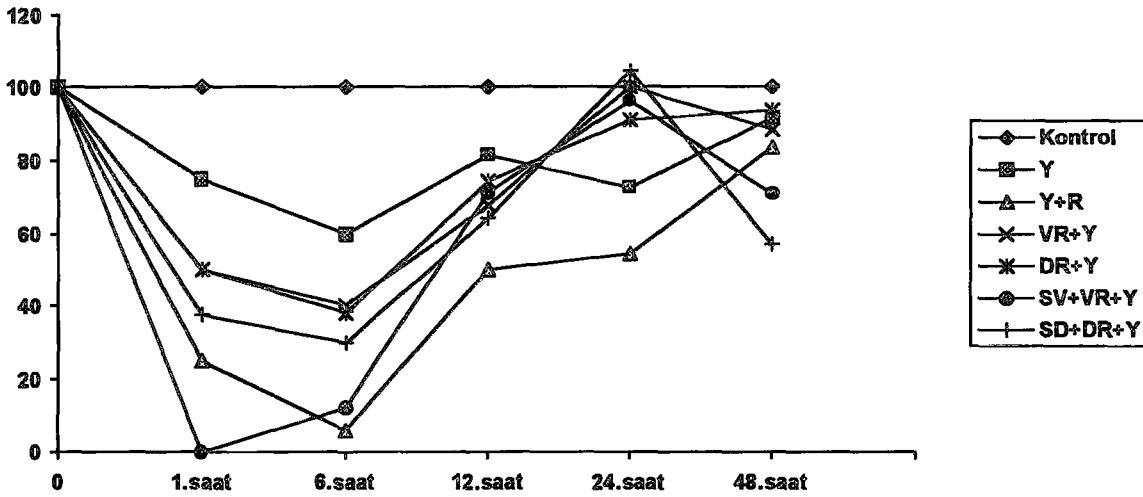
Grafik. 1: Çalışma gruplarında saptanan apoptotik indekslerin saatlere göre değişimi

Kontrol grubunda 12. saatten itibaren apoptozisin azalmaya başladığı görülmektedir. Bu durum histolojik değerlendirmede de 12. saatten sonra görülen çok şiddetli değişiklikler göz önüne alındığında hücre ölümünün nekroz ile devam ettiğini düşündürmektedir. Diğer çalışma gruplarının hepsinde, kontrol grubunda 1, 6 ve 12. saatte izlenen apoptotik indeks değerlerine göre azalma olduğu dikkati çekmektedir. (Tablo 1, Grafik 1)

#### **Apoptotik İndeksde Kontrol Grubuna Göre Görülen % Değişimler(Grafik.2):**

	1.saat	6.saat	12.saat	24.saat	48.saat
Grup I (Y)*	25	40	15.71	27.27	8.33
GrupII (R+ Y)*	75	94	50	45.45	16.66
GrupIII(VR +Y)*	50	60	32.14	0	11.45
GrupIV(DR+Y)*	50	62	25.71	9.09	6.25
GrupV(SV+VR+Y)*	100	88	28.57	3.63	29.16
GrupVI(SD+DR+Y)*	62.50	70	35.71	+4.54	10.41

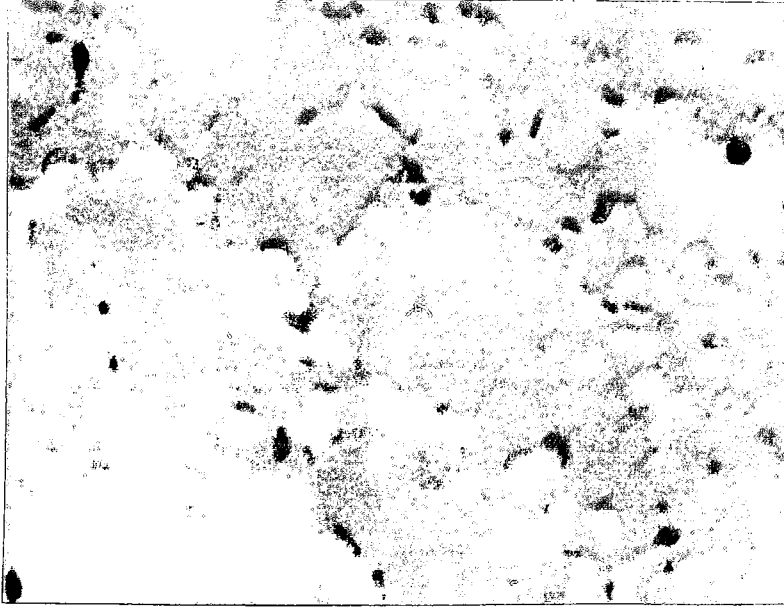
\* Y: Yüzey Soğutma, R+Y: Ringer perfüzyonu+Yüzey Soğutma, VR+Y: Verapamil içeren Ringer ile perfüzyon ve yüzey soğutma, DR+Y: Diltiazem içeren Ringer ile perfüzyon ve yüzey soğutma, SV+VR+Y: Sistemik verapamil+Verapamil içeren Ringer ile perfüzyon ve yüzey soğutma, SD+DR+Y: Sistemik diltiazem+Diltiazem içeren Ringer ile perfüzyon ve yüzey soğutma



Grafik.2: Apoptotik indekste kontrol grubuna göre görülen %değişimler

Özellikle ilk 6 saat içinde Ringer perfüzyonu+yüzey soğutma, sistemik verapamil+verapamil içeren Ringer ile perfüzyon ve yüzey soğutma ve sistemik diltiazem+diltiazem içeren Ringer ile perfüzyon gruplarında daha belirgin, Verapamil içeren Ringer ile perfüzyon+yüzey soğutma ile Diltiazem içeren Ringer ile perfüzyon+yüzey soğutma uygulanan gruplarda ise belirgin olarak apoptotik hücre sayılarında azalma eğilimi olduğu tespit edilmiştir. 12. saatten itibaren kontrol grubundaki apoptotik indekste görülen azalma eğilimi, diğer çalışma gruplarında da görülmektedir. 48 saatte apoptotik indeks hemen tüm gruplarda benzer düzeye gelmektedir. Histolojik değerlendirmelerde 12. saatten sonra örneklerin tamamına yakınında şiddetli ya da çok şiddetli nekrozla uyumlu değişikliklerin görülmesi, bu süreden sonra hücrelerde apoptozisten çok nekrotik hücre ölümünün rol oynadığını düşündürmektedir.

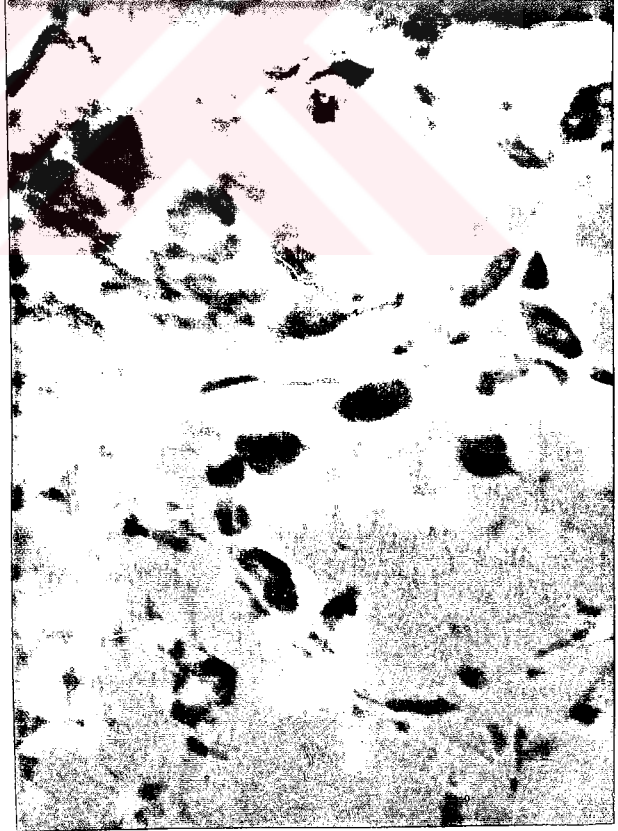
Tüm çalışma gruplarında medüller bölgede apoptozis oranının kortikal bölgeye oranla çok daha az olduğu da gözlenmiştir.



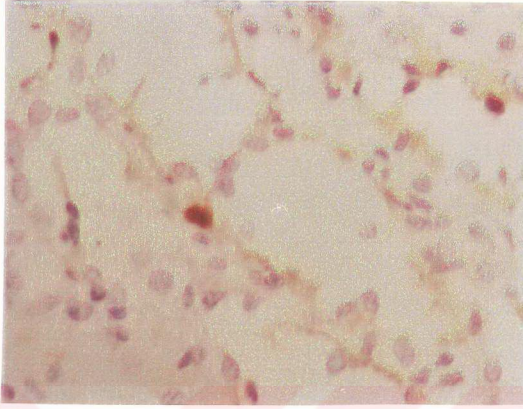
Resim. 6: Böbrek medullasında boyanma gösteren apoptotik çekirdekler  
(Kahverengi boyanan çekirdekler)



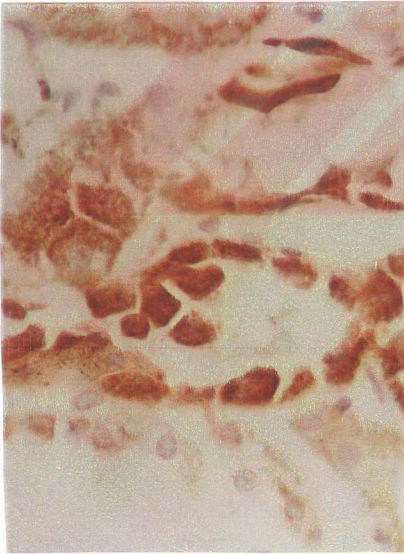
Resim. 7: Böbrek korteksinde yoğun boyanma gösteren apoptotik çekirdekler



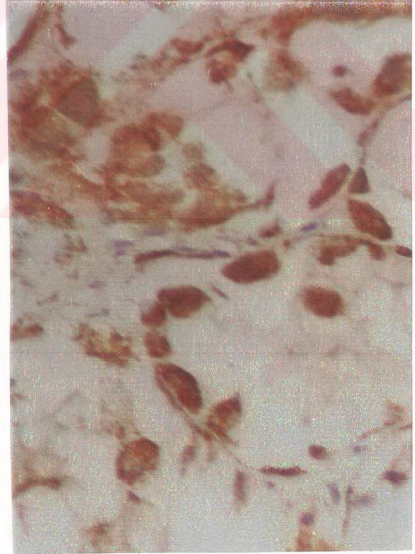
Resim. 8: Böbrek korteksinde yoğun boyanma gösteren apoptotik çekirdekler



Resim. 6: Böbrek medullasında boyanma gösteren apoptotik çekirdekler  
(Kahverengi boyanan çekirdekler)



Resim. 7: Böbrek korteksinde yoğun boyanma gösteren apoptotik çekirdekler



Resim. 8: Böbrek korteksinde yoğun boyanma gösteren apoptotik çekirdekler

## TARTIŞMA:

İlk olarak 1933 yılında Ukrayna'lı cerrah Voronoy tarafından uygulanan insan allograftı ile kadavradan böbrek transplantasyonu, immünsüpresif ajanlarda elde edilen büyük gelişmeler, organ koruma yöntemlerinde yapılan yenilikler ve transplantasyon immünolojisinde açıklığa kavuşan yeni bilgiler ile son dönem böbrek yetmezliğinin tedavisinde seçkin bir yer almıştır. Amerika Birleşik Devletleri Organ Paylaşma Organizasyonu (UNOS)'un verilerine göre kadavra vericili böbrek transplantasyonunda 1 yıllık graft ve hasta sağkalım oranları sırası ile %81 ve %92'dir. Takiff, Lee, Mahoney ve Guttman'ın kadavradan böbrek transplantasyonu yapmış 14.000 hastayı incelemesi sonucunda ortaya koydukları verilere göre bu oranları etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır(47). Bunlar, histokompatibilite ve HLA A-B uyumsuzluğu, primer hastalık, daha önceden yapılan transplantasyon, kan transfüzyonu, soğuk iskemi zamanı ve alıcının ırkıdır. Bu değerlendirmeler ışığında soğuk iskemi zamanının graft sürvisinde önemli bir yeri olduğu açıktır. Literatürde post-transplant geç graft fonksiyonunda uzamış soğuk iskemi zamanının başlıbaşına etkileyici bir faktör olduğunu belirten çok sayıda çalışma bulunmaktadır(47-49).

Soğuk iskeminin uzaması ile birlikte graftta ortaya çıkan ve fonksiyona etki eden morfolojik değişiklikler ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. İskemi ile birlikte böbrekte meydana gelen hücre ölümünün apoptozis ile olduğunu gösteren bulgular mevcuttur(17). Bu bulgular eşliğinde apoptozis oluşma riski olan hücrelerde apoptozisin engellenmesine yönelik yapılacak çalışmalar ile hücre kaybı ve dolaylı olarak ta özellikle ilk dönemde görülebilecek gecikmiş graft fonksiyonu önlenabilir.

Schumer ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada uzun süreli iskemi sonrasında nekrozun, daha kısa süreli iskemilerde ise apoptozisin saptandığı belirtilmiştir(43). Sunulan çalışmada da kontrol grubunda 12. saate kadar apoptotik indeksin yüksek olduğu 24. saatten itibaren, yani iskemi süresinin belirgin olarak uzaması ile beraber indekste azalma olduğu ve nekrozun ortama hakim olduğu görülmektedir. Çalışma gruplarında yapılan bütün değişik uygulamalarla ilk 12 saatte olan belirgin azalmalara rağmen, 12. saatten sonra (Sistemik Diltizem Grubu hariç, bu grupta apoptotik indeks 24. saate kadar artmıştır.) başlayıp 24. saatten sonra daha belirgin olarak apoptotik hücrelerin azalma eğiliminde olduğu görülmektedir. Bu durum bu süreden sonra nekrotik

değişikliklerin engellenememesi ile açıklanabilir. Iwata ve ark. tarafından yapılan çalışmada apoptozisin iskemi sonrası ilk 24 saatte progresif olarak arttığı bu saatten itibaren yavaş olarak azaldığı bildirilmiştir(17). Sunulan çalışmada elde edilen verilerin de benzer olduğu görülmektedir.

Yapılan çalışmada uygulanan metodlar ile elde edilen veriler arasındaki farklılıklar göz önüne alındığında ilk 1 saat içinde en fazla azalmaya Sistemik Verapamil grubunda(Apoptotik indekste %100 azalma), ilk 6 ve 12.saatler içinde ise Ringer perfüzyonu+yüzey soğutma(Apoptotik indekste 6. saatte %94, 12. saatte ise %50 azalma) uygulanan gruplarda ulaşıldığı görülmektedir. Özellikle sistemik Verapamil uygulaması ile 1.saatte hiç apoptotik hücre görülmemesi ve bu gruptaki örneklerin histolojik olarak çok iyi korunan örnekler olması kısa dönemde diğer yöntemlere göre bu yöntemin daha etkili koruma sağladığını düşündürmektedir.

Ringer solüsyonu içerisine herhangi bir  $Ca^{+2}$  kanal blokeri eklenmesinin ise tek başına perfüzyon yapılmasına göre apoptotik indekste bir azalma sağlamadığı saptanmıştır. Sistemik  $Ca^{+2}$  kanal blokeri uygulaması ile ise apoptotik indekste düşme oranında artış sağlandığı ancak bu artışın ringer perfüzyonu ile beraber yüzey soğutma uygulanarak elde edilen seviyenin üzerine çıkmadığı sonucu gözlenmiştir. Ringer perfüzyonu içerisine konulan ajanlar karşılaştırıldığında her iki ajan arasında % değişim bakımından fark olmadığı, bu ajanların ayrıca sistemik olarak verilmesi durumunda ise 6.saatte Verapamil'in ve Diltiazem'in infüzyon içerisinde verilmesine göre Verapamil ile %7, Diltiazem ile %1.5 daha az apoptotik hücreler görüldüğü saptanmıştır.

Her ne kadar çalışmada  $Ca^{+2}$  kanal blokeri kullanılan gruplarda standart ringer perfüzyonu+yüzey soğutma uygulanan gruplara göre apoptotik indekste azalma olduğu gösterilememiş ise de bu durum kullanılan ajanların dozları ve ajanın verilme şekli ile de ilintili olabilir. Veriliş şekli olarak sistemik uygulama ile yalnızca solüsyona ekleme karşılaştırıldığında sistemik uygulamanın daha belirgin azalma sağladığı görülmektedir. Bu bulgu da ajanın verilmiş şeklinin önemli bir faktör olduğuna işaret etmektedir. Çalışmada seçilen dozun artırılması ile de apoptozisde azalma beklenilebilir. Bu faktörler halen araştırılmayı beklemektedir.



Ca<sup>+2</sup> kanal blokerlerinin klinik kullanımı ile böbrek transplantasyonu sonrası graft fonksiyonlarında iyileşmeler olduğunu gösteren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır(50,51). Bu iyileşmelerin Ca<sup>+2</sup> kanal blokerlerinin proksimal arteriyol üzerindeki vazodilatör etkisinden ve lipid peroksidasyonunda meydana getirdikleri azalma yolu ile olduğu iddia edilmektedir(18). Bu fizyolojik etkilerin dışında hücresele düzeyde meydana gelebilecek koruyucu değişiklikler hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. İskemi ile böbrekte apoptozis görülmesi ve apoptozisin indüklenmesinde Ca<sup>+2</sup> 'un tetikleyici rol oynadığının bilinmesi, Ca<sup>+2</sup> kanal blokerlerinin bu mekanizma üzerinde yavaşlatıcı etkileri olabileceği düşüncesini akla getirmektedir. Sunulan çalışmada standart yöntemlere göre bu ajanlarla, kullanılan yöntemden bağımsız olarak ek bir fayda sağlanamaması, apoptozisin başlangıcından sonra hücrenin ölümüne kadar geçen süreçte hangi hücresele ve genetik mekanizmaların rol oynadığının tam olarak bilinmemesinden kaynaklanabilir. Bu mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesini sağlayacak çalışmalar ile daha kesin yargılara varabilmek mümkün olacaktır. Bu süreç üzerinde, ilaçların verilmiş biçimi ve dozlarının da önemli oranda etkili olabilecekleri göz ardı edilmemelidir.

## ÖZET:

Günümüzde böbrek transplantasyonu sonrası görülen gecikmiş graft fonksiyonu ve graft yetmezliğinin etyopatogenezi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

Bu çalışma böbrekte oluşturulan soğuk iskemide ortaya çıkan apoptotik hücre ölümünde Ca<sup>+2</sup> kanal blokerlerinin etkisini araştırmak amacı ile planlanmıştır. Bu amaçla Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda oluşturulan soğuk iskemide modelinde birer Ca<sup>+2</sup> kanal blokeri olan Diltiazem ve Verapamil'in etkileri araştırılmıştır. Gereken vasküler kontrol sonrası böbrekler yalnızca yüzey soğutma, yalnızca ringer solüsyonu, Diltiazem ve Verapamil'den birisini içeren ringer solüsyonu ya da nefrektomi öncesi verilen sistemik Ca<sup>+2</sup> kanal blokeri ile birlikte Ca<sup>+2</sup> kanal blokeri içeren ringer ile perfüzyon gruplarına ayrılmışlardır. Bu gruplandırmaya göre gerekli işlem uygulanan böbrekler 1, 6, 12, 24 ve 48 saat süre ile buzlu Ringer solüsyonu içerisinde bekletilerek, belirlenen sürelerin sonunda histolojik inceleme ve in-situ end labeling yöntemi ile inceleme için %10 nötral tamponlu formalin içerisine alınmıştır.

Histolojik değerlendirme, görülen hücre dejenerasyonunun şiddetine göre 5 seviyeye ayrılmış, uygulanan in-situ end labeling yöntemi ile her gruptaki örneklerde toplam 400

hücre sayılarak apoptotik indeks hesaplanmış ve gruplar arasındaki yüzde olarak değişimler değerlendirilmiştir.

Sonuçta apoptotik indeksin bütün çalışma gruplarında kontrol grubuna göre ilk 24 saat boyunca azalma gösterdiği bu saatten sonra ise aradaki farkın azalma eğiliminde olduğu saptanmıştır. Bu bulgu histolojik değerlendirmelerde nekrozun belirgin hale geldiği örneklerde daha dikkat çekicidir. Oluşturulan gruplar içerisinde sistemik ya da perfüzyon solüsyonu içerisinde  $Ca^{+2}$  kanal blokeri kullanılmasının standart Ringer perfüzyonuna göre % değişim olarak belirgin bir iyileşme sağlamadığı belirlenmiştir. Sistemik kullanımın ise perfüzyon solüsyonuna eklenmeye göre % değişim olarak apoptozisi daha fazla azalttığı saptanmıştır.

Bu veriler  $Ca^{+2}$  kanal blokerlerinin iskemik böbrekte görülen apoptoziste, bilinen standart uygulamalara göre önemli oranda ek bir fayda sağlamadıklarını düşündürmektedir. Diğer taraftan bulunan sonuçlar üzerinde verilen ajanların dozu ve uygulama yönteminin etkisinin olabileceği de unutulmamalıdır. Bu sorular yeni araştırmalara kaynak teşkil etmektedir.

Hücre içerisinde apoptozisi indükleyen, devamını sağlayan ve sonlandıran hücresel ve genetik mekanizmaların daha iyi açıklanabilmesi ile daha kesin yargılara ulaşılabilmesi mümkün olacaktır.

## **SONUÇ:**

İki farklı kalsiyum kanal blokeri kullanılarak, oluşturulan iskemi modelinde böbrekte oluşan apoptozisin ve ortaya çıkan farklılıkların araştırıldığı bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

1. Kullanılan kalsiyum kanal blokerleri ve farklı yöntemler ile elde edilen sonuçlar, bugün klinik kullanımda olan koruyucu yöntemlere göre ek bir fayda sağlanmadığı izlenimini vermektedir.

2. Çalışmada kullanılan kalsiyum kanal blokerleri sistemik olarak ve perfüzyon solüsyonuna eklenerek verilmiş ve bu uygulama şekilleri arasında sistemik uygulamanın daha etkili koruma sağladığı saptanmıştır. Bu durum kullanılan koruyucu ajanın uygulama şeklinin önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir.

3. Sistemik Verapamil uygulaması ile ilk 1 saatte apoptotik indeksin %100 oranında azalması ve histolojik inceleme ile bu örneklerin çok iyi korunan örnekler olması diğer yöntemlere göre bu yöntemin kısa dönemde daha etkili koruma sağladığını düşündürmektedir.

4. Hücre ölümünün bir şekli olan apoptozisin hangi mekanizmalar ile kontrol edildiğinin daha ayrıntılı olarak belirlenmesi, yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar ile daha kesin yargılara ulaşabilmemizi sağlayacaktır.

## **KAYNAKLAR:**

- 1- ) İlker Y, Yalın R, Özener Ç, Akoğlu E, Akdaş A: The Fourth Int. Cong. of M. East Soc. for organ trans. 1994; Isfahan-Iran.
- 2- ) Shoskes DA, Churchill BM, Mc Lorie GA, ve Khoury A: The impact of ischaemic and immunologic factors on early graft function in pediatric renal transplantation. *Transplantation*, 50: 877, 1990.
- 3- ) Young EW, Humes HD. Calcium and acute renal failure. *Miner. Electrolyte Metab.* 17:106-111, 1991.
- 4- ) Neumayer HH, Wagner K: Prevention of delayed graft function in cadaver kidney transplants by diltiazem: outcome of two prospective, randomized clinical trials. *J Cardiovasc Pharmacol*; 10: 170-177, 1987.
- 5- ) Schrier RW, Arnold PE, Van Putten VJ, Burke TJ: Cellular calcium in ischemic acute renal failure: role of calcium entry blockers. *Kidney Int*, 32:313-321; 1987.
- 6- ) Puschett JB: Do calcium channel blockers protect against renal ischemia?. *Am J Nephrol*, 7: 49-56; 1987.
- 7- ) Burke TJ, Arnold PE, Gordon JA ve ark. Protective effect of intrarenal calcium membrane blockers before or after renal ischemia. *J Clin Invest*, 74:1830- 1841, 1984.
- 8- ) Sterzel RB: Renal actions of calcium antagonists. *J Cardiovasc Pharmacol*, 10: 17-21; 1987.
- 9- ) Robinette JB, Conger JD, Schrier RW: The roles of cell calcium(Ca) and endothelium-derived relaxing factor(EDRF) in the loss of renal blood flow(RBF) autoregulation in ischemic acute renal failure(ARF) (abstr.) *Kidney Int*; 31: 374, 1987.
- 10-) Malis CD, Cheung JY, Leaf A ve ark.: Effects of verapamil in models of ischemic acute renal failure in rat. *Am J Physiol*, 245: 735-742, 1983.
- 11-) Loutzenhiser R, Epstein M: Effects of calcium antagonists on renal hemodynamics. *Am J Physiol*, 249: 619-629, 1985.
- 12-) Wylie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.*; 142: 67-77, 1984.
- 13-) Carol-Leslie LM, and Cidlowski JA. Similar actions of glucocorticoids and calcium on the regulation of apoptosis in S49 cells. *Molecular Endocrinology*, 1991; 1169-1179.

- 14-) Martin SJ, Lennon SV, Bonham AM, and Cotter TG. Induction of apoptosis ( programmed cell death ) in human leukemic HL-60 cells by inhibition of RNA or protein synthesis. *J Immunol.* 1990; 145: 1859-1867.
- 15-) Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 24: 203-214, 1991.
- 16-) Mc Conkey DJ, Hatrzell P, Nicotera P, Orrenius S. Calcium activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J*, 1989; 3: 1843-1849.
- 17-) Iwata M., Myerson D, Torok Storb B, Zager RA. An evaluation of renal tubular DNA laddering in response to oxygen deprivation and oxidant injury. *J Am Soc Nephrol.* Dec; 5(6): 1307-13, 1994.
- 18-) Levine RL.: Ischemia: from acidosis to oxidation. *FASEB J.*, 7:1242, 1993.
- 19-) Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S: The importance of iron, calcium and free-radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischemic rabbit kidneys. *Free Radical Res. Commun.*, 7: 255, 1989.
- 20-) Burke TJ, Singh H and Schrier RW.: Calcium handling by renal tubules during oxygen deprivation injury to the kidney prior to reoxygenation. *Cardiovasc Drugs Ther.*, 4: 1319, 1990.
- 21-) Mc Cord JM,: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New Engl. J. Med.*, 312:159, 1985.
- 22-) Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Amer. J. Physiol*, part 2, 255: H1269, 1988.
- 23-) Hochachka PW: Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, 231:234, 1986.
- 24-) Klausner JM, Paterson IS, Kobzik L, Rodzen C, Valeri CR, Shepro D and Hechtman HB: Vasodilating prostaglandins attenuate ischemic renal injury only if thromboxane is inhibited. *Ann. Surg.*, 209:219, 1989.
- 25-) Chintala MS, Chiu PJ, Vemulapalli S, Watkins RW and Sybertz EJ: Inhibition of endothelial derived relaxing factor (EDRF) aggravates ischemic acute renal failure in anesthetized rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 348:305, 1993.
- 26-) Emami A, Schwartz JH, Borkan SC: Transient ischemia or heat stress induces a cytoprotectant protein in rat kidney. *Amer. J. Physiol.*, part 2, 260: F479, 1991.
- 27-) Bonventre JV, Sukhatme JH, Bamberger M, Quellette AJ and Brown D: Localization of the protein product of the immediate early growth response gene, Egr-1, in the kidney after ischemia and reperfusion. *Cell Regulation*, 2: 251, 1991.

- 28-) Haab F, Julia P, Nochy D, Cambillau M, Fabiani JN, Thibault P. Improvement of postischemic renal function by limitation of initial reperfusion pressure. *J Urol.* 155:1089-1095, 1996.
- 29-) Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Husser WC. *Transplantation. Principles of Surgery*, Sixth Edition, Mc Graw Hill Inc, 448-451, 1995.
- 30-) Belzer FO, Ashby BS ve Dunphy JE. 24- and 72-hour preservation of canine kidneys. *Lancet*, 2:536, 1967.
- 31-) Collins GM, Bravo-Sugarman MB, ve Terasaki PI. Kidney preservation for transportation: Initial perfusion and 30 hours ice storage. *Lancet*, 2: 1219, 1969.
- 32-) Halasz NA, Collins GM. Forty-eight hour kidney preservation: A comparison of flushing and ice-storage with perfusion. *Arch. Surg.*, 1:175, 1976.
- 33-) Feduska NJ, Belzer FO ve ark. A ten-year experience with cadaver kidney preservation using cryoprecipitated plasma . *Am J. Surg.*, 135:356, 1978.
- 34-) Haberal M, Öner Z, Karamehmetoğlu M ve ark. Cadaver kidney transplantation with cold-ischemia time for 48 to 95 hours. *Transplant. Proc.*, 16:1330, 1984.
- 35-) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-57.
- 36-) Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *J NIH Res.* 3: 75-78, 1991.
- 37-) Cohen JJ. Programmed cell death in the immune system. *Adv. Immunol.* 50: 55-85, 1991.
- 38-) Ellis RE, Juan J, Hortvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.* 7: 663-98, 1991.
- 39-) Arends MJ, Morris RG and Wylie AH. Apoptosis : The role of endonuclease. *Am J Pathol* , 136: 593, 1990
- 40-) Kyprianou N, English HF, and Isaacs JT. Activation of a Ca<sup>+2</sup> -Mg<sup>+2</sup> dependent endonuclease as an early event in castration induced prostatic cell death. *Prostate*, 13:103, 1988.
- 41-) Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR, Sikorska M. Apoptotic death in epithelial cells : Cleavage of DNA to 300 and / or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *Embo J*, 12: 3679, 1993.
- 42-) Gobe GC, Axelsen RA, Searle JW: Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab. Invest.* 63:770-779, 1990.

- 43-)Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Gobe G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R: Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol* 140: 831-838, 1992.
- 44-)Rosenberg ME, Paller MS: Differential gene expression in the recovery from ischemic renal injury. *Kidney Int.* 39: 1156-1161, 1991
- 45-)Buttyan R: Genetic response of prostate cells to androgen deprivation: insights into the cellular mechanism of apoptosis. In *apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death*, edited by Tomei LD, Cope FO, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991, pp 157-173.
- 46-)Olsen S, Burdick JF, Keown PA, Wallace AC, Racusen LC, Solez K: Primary acute renal failure (acute tubular necrosis) in the transplanted kidney: Morphology and pathogenesis. *Medicine* 68:173-187, 1989
- 47-)Kahan BD, Mickey R, Flechner SM, Lorber MI, Wideman CA, Kerman RH, Terasaki P, and Van Buren CT. Multivariate analysis of risk factors impacting on immediate and eventual cadaver allograft survival in cyclosporine-treated recipients. *Transplantation*, 43:65, 1987.
- 48-)Halloran P and Aprile M: Factors influencing early renal function in cadaver kidney transplants. A case-control study. *Transplantation*. 45:122, 1988.
- 49-)Merkus JW, Hoistma AJ, Koene RA: Detrimental effect of acute renal failure on the survival of renal allografts influence of total ischemia time and anastomosis time. *Nephrol . Dialysis Transplant.* 6: 881, 1991.
- 50-)Neumayer HH, Kunzendorf U and Schreiber M. Protective effects of calcium antagonists in human renal transplantation. *Kidney Int., suppl.*, 36:S87, 1992.
- 51-)Dawidson IJ and Ar'Rajab A. Perioperative fluid and drug therapy during cadaver kidney transplantation. *Clin. Transplants*, p. 267, 1992.