

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ALFA LİPOİK ASİD VE SİLYMARİNİN MESANE ÇIKIM
OBSTRÜKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Abidin YILDIRIM

**Üroloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR
2010**

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ALFA LİPOİK ASİD VE SİLYMARİNİN MESANE ÇIKIM
OBSTRÜKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Abidin YILDIRIM

Üroloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Turgut DÖNMEZ

ESKİŞEHİR
2010

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Abidin YILDIRIM'a ait "Alfa Lipoik Asid ve Silymarinin Mesane Çıkım Obstrüksiyonu Üzerine Etkisi" isimli çalışma jürimiz tarafından Üroloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Metin KALE

Üroloji Anabilim Dalı

Üye

Prof. Dr. Turgut DÖNMEZ

Üroloji Anabilim Dalı

Üye

Doç. Dr. Cavit CAN

Üroloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun
...../...../.....Tarih ve Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ

Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalında almış olduğum uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana destek olan ve tezimin hazırlanmasında yardımlarını benden esirgemeyen tez danışmanım sayın hocam Prof. Dr. Turgut DÖNMEZ' e teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım. Bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve eğitimimde büyük emekleri olan sayın hocalarım Prof. Dr. Metin KALE, Doç. Dr. Cavit CAN, Doç. Dr. Aydın YENİLMEZ, Öğr. Gör. Dr. Barbaros BAŞESKİOĞLU' na teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım. Ayrıca ihtisas eğitimimin ilk yıllarında birlikte çalışma fırsatı bulduğum rahmetli Yrd. Doç. Dr. Mehmet TURGUT' u saygı ve rahmetle anıyorum. Ayrıca tez çalışmamda yardım ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Erinç ARAL, Prof. Dr. Nilüfer ERKASAP, Doç. Dr. Sema USLU, Arş. Gör. Dr. M. Caner ÖZER ve istatistiksel değerlendirmeleri yapan Arş. Gör. Ahmet MUSMUL' a içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Yıldırım, A. Alfa Lipoik Asid ve Silymarinin Mesane Çıkım Obstrüksiyonu Üzerine Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2010. Mesane çıkım obstrüksiyonunda, siklik iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarına bağlı olarak mesane disfonksiyonu gelişmektedir. Çalışmamızda MÇO sonucu gelişen mesane hasarını göstermeyi ve alfa lipoik asid ile silymarin kullanarak mesaneyi bu hasardan korumayı amaçladık. Bu deneysel çalışmada toplam 32 adet sprague Dawley cinsi rat kullanıldı. Her deney grubunda 8 adet rat olacak şekilde toplam 4 grup oluşturuldu. Grup 1: kontrol, Grup 2: sham grubunda herhangi bir tedavi uygulanmadan 4 hafta boyunca mesane çıkım obstrüksiyonu oluşturuldu. Grup 3: mesane çıkım obstrüksiyonu sonrası 4 hafta boyunca alfa lipoik asid 100mg/kg'dan intraperitoneal (ip) uygulandı. Grup 4: mesane çıkım obstrüksiyonu sonrası 4 hafta boyunca silymarin 25mg/kg'dan ip olarak uygulandı. Deney sonunda tüm gruplardaki ratların mesaneleri cerrahi olarak çıkarıldı. Mesane ağırlıkları, serum ve dokuda MDA, TNF- α , IL-6, Tip 1 ve Tip 3 kollajen, düz kas oranı incelendi. TUNEL yöntemiyle apoptozis ve Real Time PCR ile iNOS düzeyi belirlendi. ALA ve silymarinin mesane ağırlıklarını koruduğu, doku ve serumda MDA, TNF- α düzeylerini azalttığı ancak IL-6 üzerine etkisinin olmadığı görüldü. ALA'nın silymarine göre mesane düz kas kollajen oranını daha iyi koruduğunu ve daha güçlü antiapoptotik etki gösterdiğini bulduk. ALA'nın iNOS düzeyini azaltarak oksidan hasardan mesaneyi koruduğunu tespit ettik. Mesane çıkım obstrüksiyonunda, antioksidan ajan kullanımının mesane fonksiyonlarının korunmasında etkili olduğunu ve tedavide yer alması gerektiğini bu çalışmayla gösterdik.

Anahtar Kelimeler: Rat, mesane, I/R, MDA, TNF- α , IL-6, Real Time PCR, iNOS, apoptozis, ALA, Silymarin.

Destekleyen Kurum: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu 11009/2010 nolu proje.

T.İ.C.A.M.

ABSTRACT

Yıldırım, A. Effect of Alpha Lipoic Acid and Slymarine on Bladder Outlet Obstruction. Eskisehir Osmangazi University Medicine Faculty Department of Urology Medical Specialty Thesis, Eskisehir, 2010. Bladder dysfunction occurs due to cyclic ischemia reperfusion (I/R) damage in bladder outlet obstruction (BOO). In our study, we aimed to show bladder damage results from BOO and to prevent bladder from this damage by using alpha lipoic acid and slymarine. Total 32 Sprague Dawley rats were used in these experiments. There were 4 study groups, with 8 rats in each group. Group 1: control; Group 2: sham, BOO-maintained for 4 weeks with no treatment; Group 3: intraperitoneal (ip) 100 mg/kg alpha lipoic acid treated for 4 weeks after BOO; Group 4: ip 25 mg/kg slymarine treated for 4 weeks after BOO. After completion of experiments, bladders of all rats from all groups are removed surgically. Bladder weights; MDA, TNF- α , IL-6 and Type 1 and Type 3 collagen levels in serum and tissue; and smooth muscle proportions in tissue were evaluated. Apoptosis was determined by TUNEL method and iNOS levels were determined by real Time PCR. It was found that ALA and slymarine maintained bladder weights and decreased MDA and TNF- α levels in serum and tissue, but had no effect on IL-6 levels. ALA was better maintained bladder smooth muscle collagen proportion and had more potent antiapoptotic effect than slymarine. We found that ALA protects bladder from oxidant damage by decreasing iNOS levels. We concluded that antioxidant agents are effective in maintaining bladder functions in BOO and should be included in the treatment.

Key Words: rat, bladder, I/R, MDA, TNF- α , IL-6, Real Time PCR, iNOS, apoptosis, ALA, slymarine.

Supporter Institution: Eskisehir Osmangazi University Scientific Research Projects Committee 11009/2010 numbered Project.

T.I.C.A.M.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mesane Embriyolojisi	3
2.2. Mesane Anatomisi	6
2.3. Miksiyon Fizyolojisi	7
2.4. Mesane Histolojisi	13
2.5. Mesane Çıkım Obstrüksiyonu	16
2.6. İskemi/Reperfüzyon (İ/R) Hasarı	19
2.7. İ/R Hasarına Karşı Oluşan Savunma Mekanizmaları	31
2.8. Alfa Lipoik Asid	34
2.9. Silymarin	38
2.10. Apoptosis	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	60
3.1. Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları	60
3.2. Deney Grupları	60
3.3. Deney Protokolü	61
3.4. Histolojik İnceleme	63
3.5. Biyokimyasal İnceleme	65
3.6. Fizyolojik İnceleme	66
3.7. İstatiksel İnceleme	71
4. BULGULAR	72
4.1. Histolojik Bulgular	72

	Sayfa
4.2. Biyokimyasal Bulgular	87
4.3. Fizyolojik Bulgular	91
5. TARTIŞMA	95
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	111
KAYNAKLAR	115

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALA	Alfa Lipoik Asid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BPH	Benign Prostat Hiperplazisi
CAT	Katalaz
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
DHLA	Dihidro Lipoik Asid
DRG	Dorsal Kök Ganglionu
EMG	Elektro Myelo Grafi
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
IL	İnterlökin
IFN	İnterferon
iNOS	indüklenbilir Nitrik Oksit Sentaz
İ/R	İskemi/Reperfüzyon
JAK-STAT	Janus Kinases Signal Transducers and Activators of Transcription
KDa	Kilodalton
LH	Lüteinizan Hormon
MÇO	Mesane Çıkım Obstrüksiyonu
MDA	Malondialdehit
µgr	Mikrogram
ng	Nanogram
NO	Nitrik oksit
O ₂ ⁻	Süperoksit radikali
OH ⁻	Hidroksil radikali
PNL	Polimorf Nüveli Lökosit
PGI ₂	Prostasiklin
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TICAM	Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa

TUNEL Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling

VUR Veziko Üreteral Reflü

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Erkek mesane anatomisi.	5
2.2. Mesane innervasyonu.	6
2.3. Mesane fonksiyonlarında etkin olan nörolojik yollar.	8
2.4. Miksiyonun istemli nörolojik kontrolü.	9
2.5. Mesane duvarı katlarının histolojik görünümü.	14
2.6. İskemide erken fazdaki değişiklikler.	20
2.7. İskemik dokularda ksantin oksidaz yolu ile serbest oksijen radikali üretimi.	22
2.8. Lökositlerin, iskemik bölgeye göçü.	23
2.9. Nitrik oksit sentezi.	24
2.10. Dismutasyon reaksiyonu.	28
2.11. Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu.	29
2.12. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve antioksidan mekanizmalar.	34
2.13. ALA ve DHLA'nın yapıları.	35
2.14. Lipoik asidin diğer antioksidanlarla etkileşimi.	38
2.15. Silybum marianumun doğadaki görünümü.	39
2.16. Silymarinin içerisindeki bulunan maddelerin kimyasal formülleri.	40
2.17. Silymarinin etki mekanizması.	42
2.18. Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar.	46
2.19. İntrensek ve ekstrinsek sinyal yolu tetikleyicileri.	49
2.20. Fas ve TNF ölüm reseptör ve aktivatörleri.	50
2.21. İntrensek apoptotik sinyal yolu.	51
2.22. Apoptozisteki olayların şematik görünümü.	53
2.23. Bax/ Bcl-2'nin etki mekanizması.	55

	Sayfa
3.1. Rat mesane boynunun ortaya konması.	62
3.2. Seçilmiş PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	71
4.1. Kontrol grubuna ait histolojik mesane kesiti.	74
4.2. Sham grubuna ait histolojik mesane kesiti.	74
4.3. MÇO + Silymarin grubuna ait histolojik mesane kesiti.	75
4.4. MÇO + ALA grubuna ait histolojik mesane kesiti.	75
4.5. Kontrol grubu mesane kesitinde tip 1 kollajen dağılımı.	76
4.6. Kontrol grubu mesane kesitinde tip 3 kollajen dağılımı.	77
4.7. Sham grubuna ait mesane kesitinde tip 1 kollajen dağılımı.	77
4.8. Sham grubuna ait mesane kesitinde tip 3 kollajen dağılımı.	78
4.9. MÇO + Silymarin grubuna ait mesane kesitinde tip 1 kollajen dağılımı.	78
4.10. MÇO + Silymarin grubuna ait mesane kesitinde tip 3 kollajen dağılımı.	79
4.11. MÇO + ALA grubuna ait mesane kesitinde tip 1 kollajen dağılımı.	80
4.12. MÇO + ALA grubuna ait mesane kesitinde tip 3 kollajen dağılımı.	80
4.13. Mesane ağırlıklarının grafiksel karşılaştırılması.	81
4.14. Düz kas ve kollajen oranının grafiksel olarak gösterilmesi.	82
4.15. Tip 1 ve tip 3 kollajen oranlarının grafiksel değerlendirmesi.	84
4.16. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde TUNEL (+) hücreler.	85
4.17. Sham grubuna ait mesane kesitinde TUNEL (+) hücreler.	85
4.18. Sham grubuna ait mesane kesitinde TUNEL (+) hücreler.	86
4.19. MÇO + Silymarin grubuna ait mesane kesitinde TUNEL (+) hücreler.	86
4.20. MÇO + ALA grubuna ait mesane kesitinde TUNEL (+) hücreler.	87
4.21. TUNEL(+) hücrelerin gruplara göre dağılım grafiği.	88
4.22. Doku ve serum MDA düzeylerinin grafiksel gösterimi.	89

	Sayfa
4.23. Doku ve serum TNF- α düzeylerinin gruplara göre dağılımı.	91
4.24. Doku ve serum IL-6 düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi.	92
4.25. Gruplara göre iNOS kat artışı.	92
4.26. Kontrol grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.	93
4.27. Sham grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.	93
4.28. Silymarin grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.	94
4.29. ALA grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.	94
4.30. Seçilmiş RT-PCR ürünlerinin jel görüntüsü.	95

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1. Nekrozis ve apoptozis arasındaki farklılıklar.	47
2.2. Bcl-2 ailesi.	56
2.3. Apoptozis ile hastalıkların ilişkisi.	58
3.1. gDNA uzaklaştırmak için reaksiyon hazırlanması.	69
3.2. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.	69
3.3. RT PCR için miks içeriği.	70
3.4. Çalışmada kullanılan iNOS primerinin dizileri, Tm dereceleri.	71
4.1. Mesane ağırlıklarının gruplara göre dağılımı.	81
4.2. Düz kas ve kollajen oranı.	82
4.3. Tip 1 ve tip 3 kollajen oranları.	83
4.4. TUNEL(+) hücrelerin gruplara göre dağılımı.	87
4.5. Doku ve serum MDA düzeyleri.	89
4.6. Doku ve serum TNF- α düzeyleri.	90
4.7. Doku ve serum IL-6 düzeyleri.	91
4.8. Gruplara göre iNOS kat artışı.	93

1.GİRİŞ

Benign prostat hiperplazisi'ne (BPH) sekonder gelişen mesane çıkım obstrüksiyonu (MÇO), 50 yaş ve üzeri erkek hasta popülasyonun yaklaşık %80'inde değişik derecelerde görülmektedir (1). BPH sık görülen MÇO nedeni olmakla birlikte diğer etiyolojik faktörler ise; karsinoma, mesane boynu fibrozisi veya sklerozisi, üretral darlık, üretral valv ve düz kas sfinkter dissinerjisidir (2).

Normal mesane fonksiyonları; mesanenin otonomik innervasyonu, hücre yapısı, metabolizmanın integrasyonu ve dolaşım sistemi ile sağlanan oksijen ve besin maddelerinin yeterliliği ile sağlanır (3). Yapılan araştırmalar mesane çıkımının parsiyel obstrüksiyonun, farklı türdeki hayvanlarda mesane kan akımında azalmaya ve hipoksi gelişimine neden olarak mesane duvar kalınlığında artış yaptığı belirtilmiştir (4,5). MÇO sonucu artmış duvar kalınlığının her miksiyonda siklik bir İ/R'ye neden olarak mesane hasarının artmasına yol açar (6). Bununla beraber akut overdistansiyon veya retansiyondan sonra yapılan dekompresyon ya da kateterizasyon sonucu görülen mesane disfonksiyonunun, İ/R'ye bağlı geliştiği bildirilmiştir (7,8).

Mesane duvar kalınlığındaki artış, her işeme ve inhibe edilemeyen kontraksiyon süresince siklik iskemi/reperfüzyon hasarıyla sonlanmaktadır. Reperfüzyon ve reoksijenasyon olarak adlandırılan bu olayda ortaya çıkan reaktif oksijen radikalleri hücre membranlarının lipid peroksidasyonu yolu ile membran hasarına neden olabilecekleri önceki çalışmalarda saptanmıştır (6,9-12). Aynı şekilde, membran hasarının sürekliliği parsiyel MÇO ile ilgili progresif mesane disfonksiyonunun temelini de oluşturabilir (6). Mesane çıkım direncinin artması, mukozadaki fibroproliferatif gelişim ve kollajen depolanması sebebiyle mesane vizkoelastisitenin kaybına, kompliyansın azalmasına ve basınçta artmaya yol açmaktadır. Burada en önemli rolü, kollajen üretimi oynamaktadır. Her ne kadar tip III kollajen elastik özellik taşımakta ise de önce fibroblastlarca daha sonra da bizzat kas hücreleri tarafından üretilen kollajen, sonunda mesanenin viskoelastik yapısını tahrip etmekte ve kompliyansı azaltmaktadır (13).

Bratslavsky ve arkadaşları, sıçan mesanesinde reperfüzyonun tek başına iskeminin oluşturduğu hasardan daha fazla hasar oluşturduğunu belirtmiştir (5).

Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) vardır. Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümü meydana getirmektedirler (14). Reperfüzyon aşamasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerini engellemek için antioksidan ajanların kullanılabilceğini düşündük. Biz çalışmamızı planlarken mesanedeki hasarın asıl sorumlusu olan reperfüzyon hasarını önlemek için antioksidan ajanlardan alfa lipoik asid (ALA) ve silymarin'i seçtik.

Çalışmamızda; kontrol, sham, MÇO + ALA ve MÇO + Silymarin gruplarında mesane ağırlıkları, MDA, TNF- α , IL-6, Tip 1 ve Tip 3 kollajen, düz kas oranı, apoptozis ve iNOS aktivitesini inceledik. Parsiyel MÇO oluşturulmuş hayvan modellerinde, ideal, eşsiz ve evrensel antioksidan olan ALA'nın mesane kontraktilesindeki etkinliği ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Ancak ALA'nın tip 1 ve tip 3 kollajen oranı, iNOS aktivitesi, mesanede apoptozis ve oksidatif hasarda rol alan TNF α ve IL-6 gibi sitokinlere olan etkileri ile ilgili çalışmaya rastlayamadık. MÇO'da gelişen I/R hasarı değerlendirmek ve tedavide antioksidan etkinliği görmek için bu parametrelerin çalışılmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz. Silymarinin antikarsinojenik, antiapoptotik, antioksidan özellikleri vardır. Hücre çoğalmasını arttıran, nörotoksin ve kardiyotoksinlere karşıda koruyucu olan, östrojenik ve antiöstrojenik etkileri vardır (15,16). Silymarinin birçok doku ve organdaki koruyucu özelliklerine rağmen mesanedeki etkisiyle ilgili yapılmış hiçbir çalışmaya rastlayamadık.

Biz bu çalışmada antioksidan özellik gösteren ALA ve silymarin kullanarak mesane çıkım obstrüksiyonu sonucu gelişen I/R hasarını engellemeyi, mesane fonksiyonlarını korumayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Embriyolojisi

Fertilizasyondan yaklaşık 15 gün sonra presomit embriyonun ektodermi ile endodermi arasında lateral göç sonucu mezodermal hücreler invajine olur. 17. günde ise endoderm ve ektoderm, mezoderm tarafından tamamen ayrılır, sadece sefalik yönde prokordal plak ile kaudal yönde kloak plakta bu ayrılma olmaz (17,18). Allantois 18. günde yolk kesesinin arka duvarından bir divertikülüm halinde oluşur. Somit gelişimi esnasında kraniyal ve kaudal yönde öne doğru eğilerek, allantoisi içeren “connecting stalk” ve kloakal membran, embriyonun ön kısmına gelerek pozisyon değiştirir. Hindgut, kloakayı meydana getirir. Kloaka'ya, önde allantois, laterallerde ise mezonefrik kanallar girer. Fertilizasyonun 28. gününde, allantoisin tabanından kloak membrana doğru, üreteral septumu oluşturmak üzere bir mezodermal doku harekete geçer. Bu yapı kloakayı, öne ürogenital sinüs arkada ise rektum olmak üzere ikiye böler. Ürogenital vestibul, ürogenital membranın involusyonu sonucu meydana gelir. Üreterin serbest kraniyal ucu, kraniyal ve dorsale doğru büyüyerek metanefrojenik blastemin (böbreğin son hali) oluşmasını uyarır. Üreterik çıkıntının oluşmaması renal agenezi ile sonuçlanır. Bu nedenle üreterin oluşması renal gelişim için zorunludur. Fertilizasyonun 28. gününe kadar, mezonefrik kanallar ürogenital sinüse ulaşır ve birleşir. Aynı zamanda üreterik çıkıntı, mezonefrik kanalın posteromedyal kısmından bir divertikülüm olarak gelişir ve mezonefrik kanalın sonundan kloaka'ya girer.

Mezonefrik kanalın kraniyal kısımdan vezikoüretal kanal, kaudal kısımdan ise ürogenital sinüs gelişir. Vesikoüretal kanalın kraniyal kısmının genişlemesi ile mesane meydana gelecektir. Vezikoüretal kanal kraniyalde allantois ile birleşir. Allantois fetal 12. haftada oblitere olarak urakusu meydana getirir (17,19). Üreteral bud (üreterik çıkıntı), mezonefrik kanaldan, dışa doğru çıkıntı yaparak meydana gelir. Embriyonun gelişimi sırasında pozisyonel değişikliklerle, üreter, mezonefrik kanalın posterolateraline doğru yer değiştirir. Mezonefrik kanalın distal segmentinin üreteral bud'a verdiği yer genişler ve ürogenital sinüs içinde absorbe olarak mesane

trigonunu meydana getirir. Böylece endodermden kaynaklanan vezikoüretal yapı içinde mezodermal kaynaklı bir katkı oluşmuştur.

Yaklaşık fertilizasyondan 42 gün sonra mezonefrik kanaldan gelişen üreteral bud vezikoüretal kanal ile birleşerek mesane trigonunu ve üretra boynunu meydana getirir. Mesane trigonu ve üretra boynu transizyonel epitel ile döşeli iken üretra distali çok katlı yassı epitel ile kaplıdır. Vezikoüretal kanalın kaudal kısmı dar olarak kalır ve üretrayı oluşturur. Proksimal üretranın posterior kısmı, mesane trigonu gibi, mezonefrik kanaldan kaynaklandığı görüşü hakimdir. Bu da mesane trigonunu kas yapısının adeta üreterin bir devamı olduğunu ve detrusör kasından farklılığını açıklamaktadır (17,19).

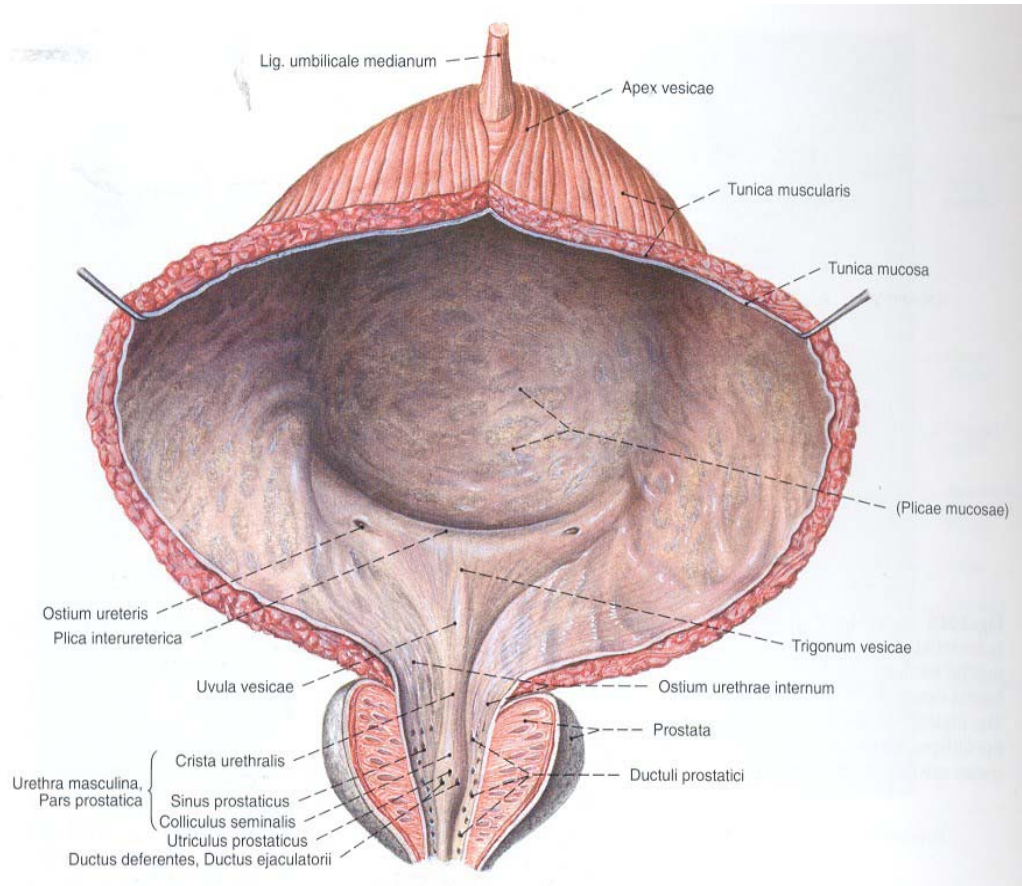
2.2. Mesane Anatomisi

Mesane, büyüklüğü ve şekli yaşa, cinsiyete, boş ve dolu olmasına bağlı olarak değişir. Pelvik yerleşimli, içi boş musküler bir organdır. Yaklaşık 500 ml kadar idrar depolayabilir. Tabanına *fundus vesicae*, boyun bölümüne *cervix (collum) vesicae*, uç kısmına *apex vesicae* denir. Fundus ile apex arasındaki geniş bölümü ise *corpus vesicae* adını alır. Cervix vesicae aşağıda üretra ile devam eder. Fundus vesicae aynı zamanda piramit şeklindeki organın arka-alt yüzünü oluşturur. Apex vesicae ile ilişkili olan urakus, mesaneyi ön karın duvarına asar. Boşken pelvis minor içinde yer alan mesane doldukça ön-orta hatta yukarıya doğru uzanır. Tam dolu mesanenin üst sınırı umbilicus'a kadar yükselebilir. Mesane kapasitesi fare'lerde yaklaşık 0.15 ml, sıçan'larda ise yaklaşık 1 ml'dir (Şekil 2.1) (20).

Tunika seroza organın üst yüzünü kaplayan peritondur. Diğer bir deyişle mesane peritonun arkasında kalan retroperitoneal bir organdır. Inferio- anteriorda ve lateralde mesane retropubik alanda perivezikal yağ dokusu ve gevşek bağ dokusu ile pelvik yan duvara komşudur. Kadında mesane ve rektum arasında vajina ve uterus bulunduğundan dolayı mesane tabanı ve üretra ön vajinal duvara yaslanır. Erkeklerde ise mesanenin tabanı rektumla, aralarında fasiya rektovezikalis (Denonviller fasiyası), seminal veziküller ve vas deferensin ampullası ile terminal üreterle komşudur. Mesane boynu pelvik fasiyaya sıkı bir şekilde fiksedir ve prostat ile devam eder. Mesanenin kas tabakası (detrüsör), içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler olarak üç katmanlı seyreder. Ancak mesanenin üst kısımlarında bu tabakalar birbiriyle iç içe geçmiş halde

bulunan longitudinal ve sirküler liflerden oluşmaktadır. Parasempatik sistemin etkisi ile kasılır. Ostium ureteris'leri birleştiren kıvrıma *plica interureterica* denilir. Mesanenin tabanında yer alan açıklık *ostium urethrae internum* adını alır. Burası uretranın başladığı yerdir. Açıklık çevresindeki kas lifleri dairesel bir şekilde seyrederek *m. sphincter vesicae*'yi (sifinkter-büzücü kas) oluştururlar. Bu kas parasempatik etki ile gevşer ve idrarın geçmesini sağlar. Sempatik liflerin mesaneye etkisi parasempatiklerin tersi yöndedir. Mesanenin iç yüzünde her iki üreter orifisi ile tepesi aşağıda mesane boynunda bulunan üçgen *trigonum vesicae* adını alır.

Mesanenin iç yüzeyi dolduğunda düz bir zemin, boşaldığında ise katlantılar oluşturan transizyonel hücreli epitelyum ile döşelidir. Ürotelyum ince bir bazal membran üzerine oturmuş altı kat hücre kalınlığındadır ve geri emilim özelliği yoktur.



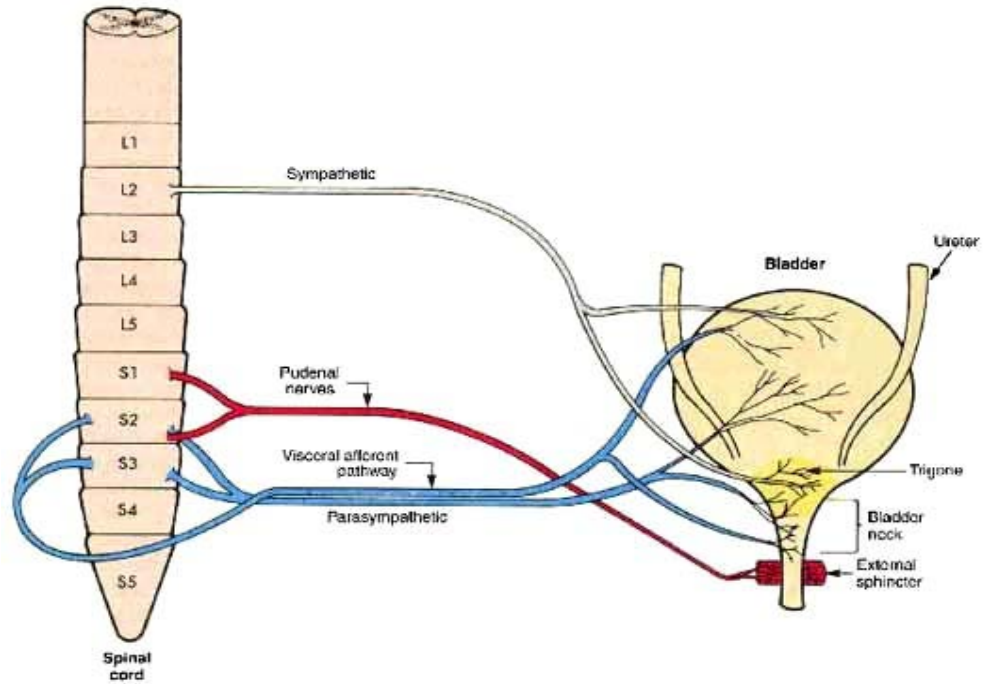
Şekil 2.1. Erkek mesane anatomisi (Sobotta Anatomi Atlası)

2.2.1. Mesane Dolaşımı

Mesaneyi besleyen damarlar a. iliaca interna'dan gelen a. vesicalis superior ve inferior'dur. Ayrıca komşuluk yaptığı organları besleyen a. glutealis inferior, a. obturatoria ile a. vaginalis ve a. uterina'dan (kadınlarda) da dallar gelir. Venleri organ çevresinde bir ağ oluşturarak plexus venosus prostaticus yolu ile v. iliaca interna'ya dökülürler. Lenfatik akımı büyük oranda internal iliak lenf düğümlerine doğrudur. Alt bölümünün lenfatik akımı prostat çevresindeki lenf damarları ile bağlantılıdır.

2.2.2. Mesane İnnervasyonu

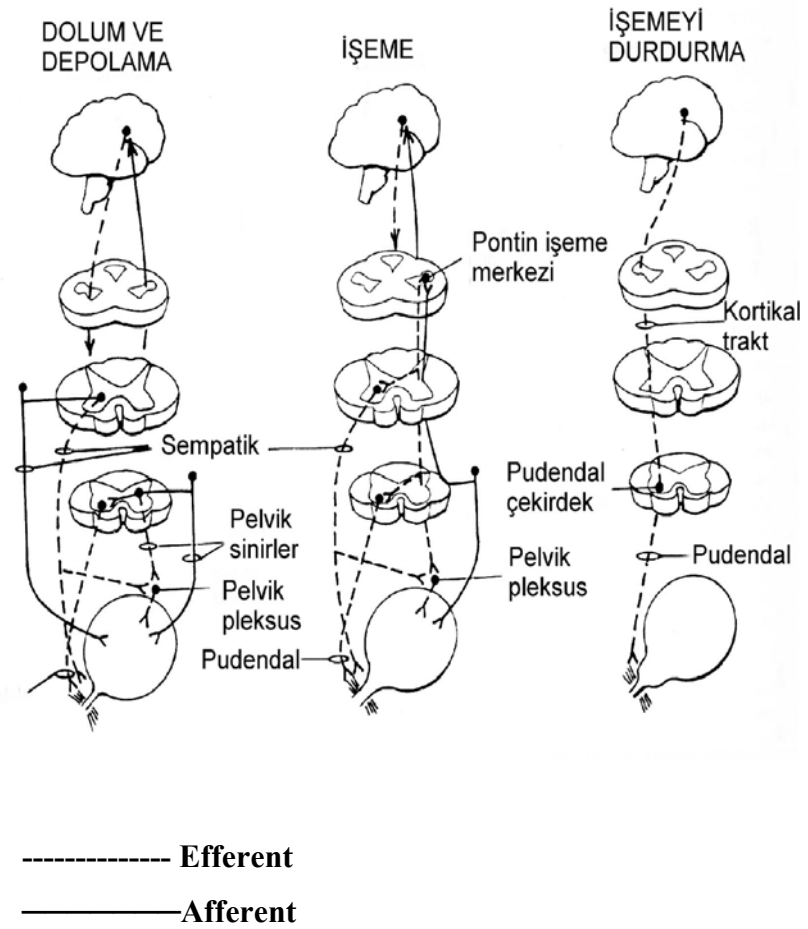
Organın innervasyonunu sağlayan sempatik sinir lifleri T₁₁-L₂, parasempatik sinir lifleri S₂₋₄ medulla spinalis segmentlerinden gelirler. Afferent liflerinin de sempatik ve parasempatik liflere (özellikle ağrı duyusu ve doluluğu bildiren gerilme duyusu parasempatikler ile) katılarak plexus vesicalis yolu ile medulla spinalis'e ulaştığı kabul edilir. Ağrı duyusu ön, dolgunluk hissi omuriliğin arka kordonunda iletilir. Mesanenin ağrısı karın ön duvarının alt bölümünde, perinede ve erkeklerde ayrıca penis üzerinde hissedilir (yansıyan ağrı) (Şekil 2.2) (21,22).



Şekil 2.2. Mesane innervasyonu.

2.3. Miksiyon Fizyolojisi

Normal miksiyon, mesane dolduğunda fiziksel ve sosyal açıdan uygun bir zamanda istemli olarak gerçekleşir. Miksiyon, depolama ve boşalma evresi olmak üzere iki evrede incelenebilir. Depolama evresi boyunca giderek artan sempatik uyarı ve baskılanan parasempatik uyarı yolu ile mesane içi basınç düşük tutulur. Üretral sfinkter elektromyografi (EMG) aktivitesi giderek artar. Normal bir mesanede mesane içi basınç 0–6 cmH₂O olup, 15 cmH₂O'yu aşmamalıdır (22,23). Sıkışma hissi ile birlikte (300 ml) detrusörü gevşeten, sfinkteri kasan refleks yollar aktive olur. Normal mesane kapasitesi 400–750 ml arasında değişkenlik gösterebilir. İlk doluluk hissi 100–200 ml, doluluk hissi 300–400 ml, acilen boşaltma gereksinimi ve ağrı olarak tanımlanabilen “urgency” ise 400–500 ml’de hissedilir (22). Depolama evresinde düşük mesane içi basınçlarda hipogastrik–pudental (sempatik) sinirler, yüksek mesane içi basınçlarda (>15 cmH₂O) pelvik–pudental sinirler aracılığı ile detrusörün refleks inhibisyonu sağlanır (24). Sakral segment arka boynuzuna gelen afferent aktivite ara nöronlar tarafından baskılanabilir. Boşaltma evresinde mesaneden gelen uyarılar ve dorsolateral pons ve mamiller cisimlerde giderek artan aktivite işeme eşiğini düşürür (23). Üretral sfinkter EMG aktivitesi kesilir ve sfinkter basıncı düşer. Sfinkter mekanizmasının sakral işeme merkezine refleks inhibisyonu ortadan kalkar, sempatik aktivite inhibe olur, parasempatik yollar aktive olur ve sonuçta detrusör kasılır. Böylece miksiyon gerçekleşir (Şekil 2.3).



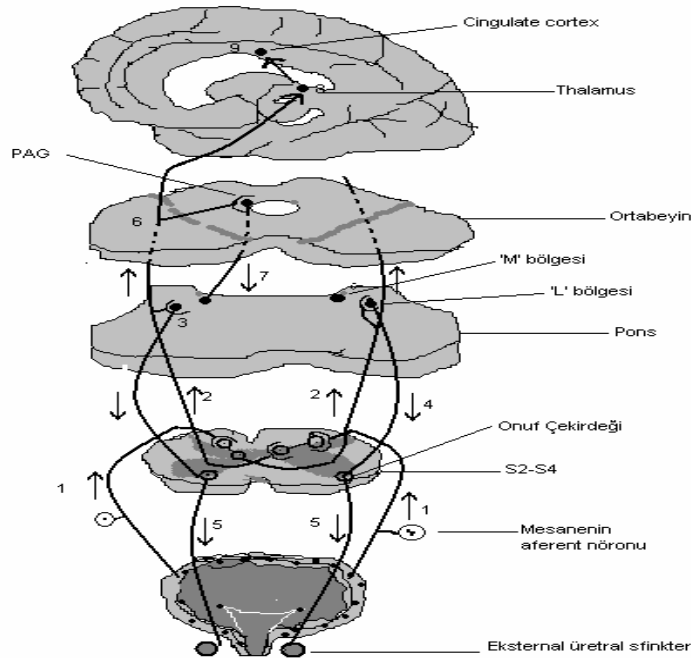
Şekil 2.3. Mesane fonksiyonlarında etkin olan nörolojik yollar.

2.3.1. Alt Genitoüriner Sistem Nörofizyolojisi

Alt üriner sistemde idrar depolanması, mesane içi basınç artmadan üretral basıncın artışı ve mesane boynundaki sfinkterin kapalı olması ile sağlanır. İdrar yapma santral, otonom ve periferik sinir sisteminin korale çalışmasıyla oluşan, kompleks kontrol mekanizması ile gerçekleşen bir işlemdir. Mesanenin yeterli zaman ve kuvvette kasılmasını ve üretranın eş zamanlı gevşemesini ayarlayan sinir bağlantıları, beyin kökünde anterior pontindeki "Barrington" merkezidir. Dorsal pontin tegmentum normal kişilerde işemenin ana kontrol merkezidir. İlk Barrington (1921) tarafından tarif edilmiş olup, "Barrington çekirdeği", "pontin işeme merkezi" ya da "M bölgesi" olarak adlandırılır(25).

Miksiyonun istemli nörolojik kontrolünde 4 önemli sinir ileti halkası mevcuttur.

1) Frontal lob-beyin sapı halkası: miksiyonun istemli olmasını ve bunun koordinasyonunu sağlar. Serebrovasküler hastalıklar, tümör ve diğer merkezi sinir sistemi hastalıklarından etkilenir. 2) Beyin sapı spinal kord sakral alan: Sakral alanda diğer bir refleks miksiyon alanı vardır. Bu alan detrüsr kasına nörolojik işeme stimulusu gönderir. Bu bölgedeki iletimi bozan multiple skleroz, tümör, enfeksiyon, travma gibi hastalıklar üriner inkontinansa sebep olur. 3) Spinal kord sakral işeme alanı-mesane: Bu refleks nöronal ileti mesane kasının kasılmasına üretranın ise relaksasyonuna sebep olur. 4) Frontal lob-spinal kord sakral işeme alanı: Üretral sfinkterin istemli kontrolünü sağlar. Mesane kontraksiyonu sakral 2,3,4' den gelen parasempatik sinirler yolu ile gerçekleşir. Alt üriner yolları innerve eden parasempatik preganglionik nöronlar, sakral parasempatik çekirdek olarak bilinen sakral ara gri maddenin lateralinde yerleşmiş bir bölgede bulunurlar. Parasempatik preganglionik nöronlar, ventral kök üzerinden uyarıcı taşıyıcı asetilkolin salgılanan periferik gangliyonlara ulaşırlar (25). Parasempatik sinirlerden salgılanan asetilkolin ve mesane duvarındaki nikotinik ve muskarinik reseptörler aracılığı ile mesane kası kasılır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Miksiyonun istemli nörolojik kontrolü.

Mesanenin dolum fazı: Mesane duvarından çıkan afferent nöronlar (1), dorsal gri boynuzun sakral segmentinde sinaps yaparlar. Dorsal boynuzdan çıkan projeksiyonlar (2) ise kontrateral beyin sapından geçerken pons kontinans merkezine ('L' bölgesi) dal verirler (3). [Pons kontinans merkezi ('L' bölgesi) de retikulospinal lifler (4) aracılığı ile Onuf çekirdeğine uyarılar göndererek cevap verir ve bu çekirdek pudental sinir (5) boyunca impuls yollayarak eksternal üretral sfinkteri aktive eder.] Diğer yukarı doğru çıkan dallar periaqueductal gri madde (PAG) (6) ile sinaps yaparlar. [PAG, pons işeme merkezinin ('M' bölgesi) (7) eşliğini düşürerek cevap verir]. Thalamus'un ventral posterior çekirdeği (8) kalan assenden lifleri alır ve cingulate kortekse (9) iletir.

Muskarinik reseptörler mesane duyusu ve motor sıkışmasından sorumludur. En az 5 farklı alt grup muskarinik reseptör klonlanmıştır (M1-M5). Reseptör bağlanması ile ilgili çalışmalar, M2 reseptörlerinin ağırlıklı olarak bulunduğunu gösterse de M3 reseptörleri de kolinerjik kasılmaya aracılık eder. M3 reseptörlerinin asetilkolinle uyarımı, IP3 (inositol trifosfat) hidrolizini, intraselüler kalsiyumun serbest kalmasını ve düz kas kasılmasını sağlar. M2 reseptörlerinin birlikte aktivasyonunun, M3 stimülasyonuna verilen cevabın artmasını üç yolla sağladığı iddia edilir: 1) Adenilat siklazı inhibe eder ve detrusör kasının sempatik uyarımını baskılar. 2) Potasyum kanallarını inaktive eder 3) Özelleşmiş katyon kanallarını aktive eder (9). İdrar depolama lomber sempatikler vasıtası ile gerçekleşir. Rostral lomber spinal kordtan çıkan sempatik akım, mesane ve üretraya noradrenerjik uyarıcı ve inhibe edici impulslar gönderir. Presakral pleksustan gelen sempatik sinirlerden hem α hem β reseptörlere etkili norepinefrin salgılanır. β reseptörleri mesane kasında bulunur ve gevşemeden sorumludur. α Reseptörler ise mesane boynu ve üretrada bulunur, kontraksiyon oluşturarak rezistansı artırır. Üretrada iki tür α adrenerjik reseptör vardır (α_1 ve α_2). Postsinaptik adrenerjik reseptörler genellikle α_1 tipindedir. Periferik sempatik yollar, sempatik gangliyon ve hipogastrik sinirler ile pelvik gangliyonlara uzanan karışık bir yol izler (26).

2.3.2. Afferent Yollar

Pelvik, hipogastrik ve pudental sinirlerdeki afferent aksonlar, bilgileri alt idrar yollarından lumbosakral spinal korda taşır. Pelvik ve pudental sinirlerin ana afferent nöronları sakral dorsal kök gangliyonlarında (DRG) bulunurken, hipogastrik sinirlerin afferent innervasyonu rostral lomber DRG'den çıkar. DRG nöronlarının santral aksonları, alt idrar yollarından duyuşsal bilgileri spinal kordda ikinci mesajcıya iletir ve pudental sinirlerin visseral afferent lifleri korda girdikten sonra Lissauer yolundan rostrokaudal olarak ilerler. Mesane hacmi ve mesane kasılmalarının büyüklüğünü ölçen pelvik sinir afferentleri myelinize (A-delta) ve demiyelinize (C) aksonları içerir. Olası inflamatuvar durumlarda, suprapubik ağrı ve sıkışma idrar kaçırmasına neden olan yeni fonksiyonel afferent yollar oluşturan C liflerinin yeniden yapılanması ile oluşur (26).

Nöroölojinin tarihsel gelişiminde Barrington'un çalışmaları dönüm noktası olmuştur. Gözleme yeteneğini kullanarak Barrington, idrar akımı ya da üretranın bir kateter ile mekanik olarak uyarılmasının afferent sinirleri uyarabileceğini ve böylece refleks mesane kasılmalarını kolaylaştırabileceğini bildirmiştir. Bu kolaylaştırıcı üretra mesane refleksinin mesanenin tamamen boşalmasına yardımcı olabileceğini ileri sürmüştür. Barrington bu refleksin iki elemanını tanımlamıştır. Bir eleman pudental sinirdeki somatik afferent yollar ile aktive edilir ve pontin işeme merkezini de içeren supraspinal mekanizmalar aracılığı ile fonksiyon gösterir. İkinci eleman ise pelvik sinirdeki visseral afferent yollar ile aktive olur, spinal refleks mekanizma ile çalışmasını sağlar (25).

2.3.3. Mesane Fizyolojisi

Mesane boynunun üremede önemli rolü vardır. Erkeklerde mesane boynunun kapanması antegrad ejakülasyonu kolaylaştırır. Ejakülasyon sırasında mesane boynunun kapanması, zengin sempatik noradrenerjik innervasyon sayesinde olmaktadır. Kadınlarda mesane boynundaki adrenerjik innervasyon yoğunluğu, erkeklerden daha düşüktür (27). Mesane düz kas hücrelerinin kasılma özellikleri hem idrar depolaması hem de idrar atılımı için uygun yapıdadır. Mesane düşük fizyolojik bir hız ile doldurulduğunda intravezikal basınç 10cm H₂O nun altında kalmaktadır

(28). Mesanenin akut denervasyonu düşük basınçlı dolumu önemli ölçüde etkilememektedir (29). Bu görüş, hücrel ve hücre dışı yapıların intrinsek miyojenik ya da viskoelastik özelliklerinin, düşük basınçlı mesane dolumu ve mesane uyumunun ana elemanlar olduğu hipotezini desteklemekte kullanılmıştır. Yine de, işemeye eşlik eden hızlı ve sürdürülebilir düz kas kasılması için sinirsel uyarıya ihtiyaç vardır (25).

İntravezikal basınç ile mesane boyutu arasında ilişki vardır ve bu da mesane duvar gerilimini etkilemektedir. Duvar geriliminin artması, mesane afferent sinirlerini uyararak mesane doluluğunun algılanmasını sağlayabileceği gibi istemsiz mesane kasılmalarına da yol açabilir. İntravezikal basınçta büyük artışlar, özellikle hipertrofik, düşük kapasiteli mesanelerde iskemi, VUR (veziko üreteral reflü), hatta venöz ve/veya lenfatik sisteme bakteri saçılmasına neden olacak kadar mesane duvar gerilimini arttırabilir (25). Mesane ve üretradaki kollajen ve elastin bileşenler strese maruz kaldıkları zaman viskoelastik özellikleri açısından değişime uğrarlar. Düz kastan ayrı olarak insan mesanesi kabaca %50 kollajen ve %2 elastinden oluşur. Yaralanma, obstrüksiyon ya da denervasyonu durumunda, kollajen içerik artar (30). Kasılabilir protein içeriği kollajen içeriğini aştığı zaman, aşırı gerilebilme özelliği kazanılır (komplians, uyum). Kollajen konsantrasyonu arttığında ise aksine uyum azalır (25).

2.3.4. Mesane Uyumu

Mesane yüzeyi, mesanenin dolu ya da boş olmasına göre büyük değişiklik gösterebilir. Değişimin yüzdesi vücuttaki herhangi bir organ ile kıyaslanmayacak boyuttadır. Bu değişiklik, ürotelyum ve mesane duvarı düz kası ve bağ dokusunun uyumu ile gerçekleşir (25).

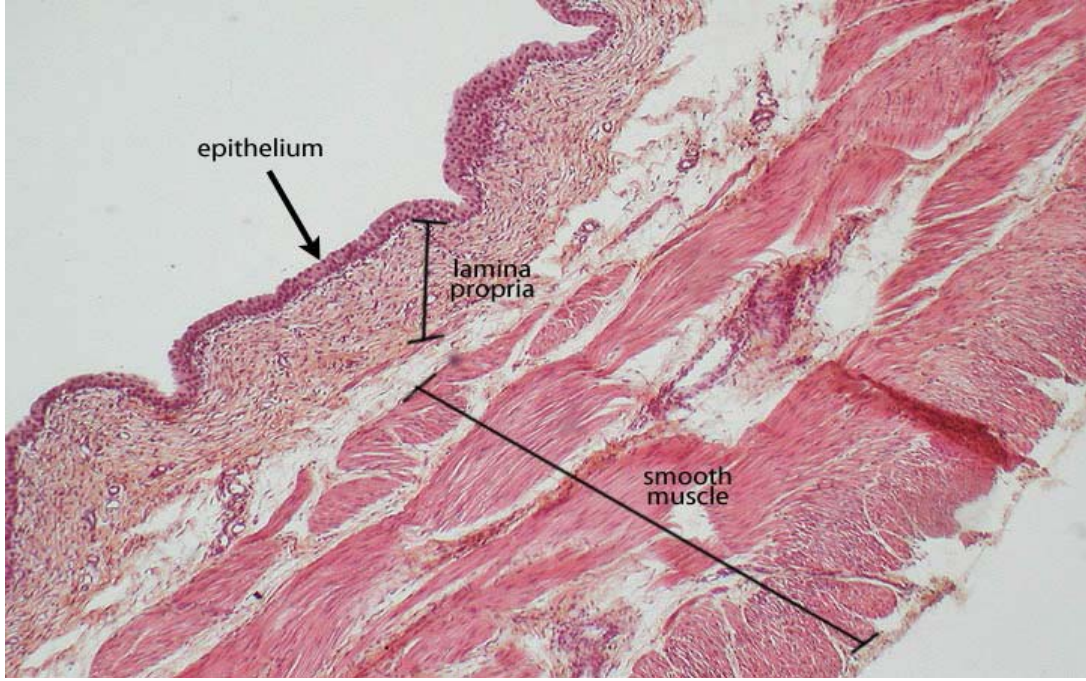
Lamina propria ve detrusörün kalınlığındaki değişiklikler, mesanenin artan idrar hacmine uyumu için mekanik gereksinimlerdir. Dolum sırasında, lamina propria kastan daha hızlı incilir. Mesane duvarının dolum sırasında incelmesinin, kas liflerinin yeniden tanzimi ve kollajenin sarmal yapısındaki değişikliğe bağlı olduğu iddia edilmiştir (30). Kas ve bağ dokusunda bazı değişikliklerin birlikte oluşması idrarın düşük intravezikal basınçlarda depolanması için gereklidir (31).

2.4. Mesane Histolojisi

Mesane mukozası değişken epitel ve bağ dokusunun yaptığı lamina propria'dan oluşur. Lamina propriayı örgü biçiminde yoğun düz kas tabakası sarar. Mesane gevşek iken epiteli 5-6 sıra hücreden oluşur, yüzeydeki hücreler yuvarlaktır ve lümeneye uzanır. Bu hücreler genellikle polipoid ve çift çekirdekli dirler. Epitelyum gerildiğinde (mesane dolduğunda) epitelin kalınlığı 3-4 hücre sırasından oluşur ve yüzeydeki hücreler yassılaşıır (32).

2.4.1. Çok Katlı Değişici Epitel

Mesane epiteli çok katlı değişici epitel niteliğindedir. Gerilmeye son derece dayanıklı olan bu epitel, renal pelvisten üretraya kadar üriner sistemin bütün bölümlerini döşer. Epitelin bazı özellikleri çok katlı prizmatik epitele, bazı özellikleri ise çok katlı yassı epitele benzer. Organın gerilme derecesine bağlı olarak hücrelerin şekilleri ve hücre kat sayısı değişiklik gösterir. Organ boş iken, yani duvarda bir gerilme yokken, epitel 4-7 hücre sırasından oluşur. Bazal hücreler küboid, orta sıralardaki hücreler poligonal ve yüzeydeki hücreler geniş ve yuvarlak yüzeylidir. Bu hücrelerin çoğu iki nükleus içerir. Organ dolu iken epitel 2-3 hücre sırasından oluşur. Orta ve üst sıradaki hücreler hafifçe yassılaşımıştır. Lamina propria'nın bağ dokusu içinde birkaç mukus salgılayan beze rastlanabilir. Lamina propria'nın derin bölümü submukoza olarak kabul edilir. Tunika muskularis içte longitudinal, ortada sirküler, dışta longitudinal seyirli kas liflerinden oluşur. Adventisiya, çok miktarda damar ve sinir içeren fibroelastik bağ dokusu özelliğindedir. Adventisiya dışında periton mesaneyi gevşekçe sarar (Şekil: 2.5) (33).



Şekil 2.5. Mesane duvarı katlarının histolojik görünümü (dms.dartmouth.com).

2.4.2. Mesane Duvarı Stroması

Mesane duvarı stromasının ana bileşenleri, proteoglikanlardan oluşan bir matriks içerisinde yerleşmiş kollajen ve elastindir. Ana hücreler fibroblastlardır (34). Stroma genellikle, damarlar ve sinirlerin arasını dolduran az bir doku olarak görülür.

2.4.3. Mesane Duvarı Kollajeni

Kollajen, kas lifleri dışında bağ dokusunda bulunur. Birçok farklı kollajen tipi belirlenmiştir. Mesanede en sık tip I, III ve IV kollajen görülmektedir (35). Uyumu azalmış mesaneler normal mesaneler ile karşılaştırıldığında, bağ dokusu düz kas oranında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Tip III kollajenin tip I'e oranında anlamlı artış olduğu görülmüştür. Buna göre, mesanenin azalmış uyumu ve düşük depolama kapasitesi, mesane duvarında bağ dokusu içerisindeki değişikliklere, özellikle de artmış tip III kollajene bağlı olduğu iddia edilebilir (25).

2.4.4. Mesane Duvarı Elastini

Elastin lifleri, elastin ve amorf yapıların etrafına yerleşen mikrofibriler yapılardan oluşan amorf yapılardır. Kollajen ile karşılaştırıldığında elastin lifleri mesanede oldukça az görülmelerine karşın mesane duvarının tüm katlarında bulunurlar (36).

2.4.5. Mesane Duvarı Matriksi

Stromada nonfibriller matriks büyük oranda proteoglikan ve sudan oluşan bir jelden meydana gelir. Proteoglikanlar, glikozaminoglikanların bağlı olduğu glikoproteinlerdir. Proteoglikanların matrikste birleşmesi ile deformasyona maruz kaldığında, viskoz davranabilen sulu bir doku yapısı elde edilir (25).

2.4.6. Mesane Duvarı Kan Damarları

Mesane çok katlı damar ağı içerir ve bunun hem fonksiyonel hem de morfolojik faydaları vardır. Dikkatle incelendiğinde, epitelyumun dış yüzünün kan damarcıkları tarafından kaplandığı görülür. Bu damarsal çukurlar, epitelyumda mikronun onda biri kadar mesafede oldukça yüksek sayıda damarların bulunmasını sağlar (37). Subepitelyal damarsal ağlar, idrardan süzülen maddelerin detrusör düz kasına temasını engelleyen ürotelyumun bariyer fonksiyonuna katkıda bulunuyor olabilir (38). Ayrıca bunlar epitelyal taşıma fonksiyonunda rol alabileceği gibi, ürotelyal metabolizma için gerekli de olabilir.

Dolum sırasında mesane duvarının yüzey alan çok genişlediği için, kan damarları da yeterince uzayabilmelidir. İyi bir akımı sağlayabilmek için uzamalar sırasında damarlar üzerinde oluşacak basıncın, doku perfüzyonunu bozmasına engel olacak bir mekanizma olmalıdır. Birçok çalışmada gerilmeyle kan akımının azaldığı gösterilmiştir (39,40). Uyumu azalmış mesanelerde, mesane içi basınçta artış olup, normal kontrol grubuyla kıyaslandığında kan akımının anlamlı ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Mesane duvarında kan akımının ana belirleyicisinin duvar içi gerilimi olduğu görülmektedir. Normal dolum sırasında, mesanede basınç artana kadar kan akımı, yüzey alanındaki artışa uyum sağlar (41).

İskemide olduğu gibi, detrüsör oksijenden ve /veya başka bir metabolitten yoksun kalırsa, kasılma yeteneği hızla azalır (42,43). İskemi ve reperfüzyonun duvar içi sinirlerde hasara neden olduğu ve yamalı denervasyon alanları yaparak detrüsör instabilitesi olan hastalarda olduğu gibi düz kas fonksiyonlarında bozulmaya yol açtığı iddia edilmiştir (44).

2.5. Mesane Çıkım Obstrüksiyonu

Eksternal üretral meadan başlamak üzere tüm üretra ve mesane boynu ile mesane içi patolojilerini içeren etkenlere bağlı oluşan obstrüksiyonlardır. Bu seviyedeki obstrüksiyonlar erken dönemlerde üretra ve mesanede patolojik değişiklikler meydana getirirken, ileri dönemlerinde üriner sistemin hemen tümünü kapsayan hatta böbrek yetmezliğine varan sonuçlar doğurabilirler.

Erken yaş grubunda; erkek çocuklarda eksternal mead darlığı ve posterior üretral valv, kız çocuklarında ise distal üretral stenoz en sık görülen nedenlerdir. İleri yaş grubunda ise mesane boynu ve posterior üretrayı etkileyen patolojiler (BPH, prostat kanseri, üretra darlığı, serviks ca, bartolin kisti ve sistosel) öncelikli sırada yer alır. Ayrıca travma, enfeksiyon ve üretral enstrümantasyon nedeni ile her yaşta mesane çıkım darlığı meydana gelebilir. Bunlar gerçek mekanik obstrüktif etki nedenleridir. Ayrıca nörojenik mesane ve diabetes insipitusta olduğu gibi aşırı idrar çıkışı olan hastalıklarda ise fonksiyonel bir obstrüksiyon etkeni söz konusudur (45).

2.5.1. Obstrüksiyona Mesane Cevabı

Bulgular obstrüksiyona mesane cevabının büyük oranda adaptatif tipte olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, klinik alt üriner sistem semptomlarının çoğu, direkt olarak çıkım obstrüksiyonundan çok, mesane fonksiyonunda ortaya çıkan obstrüksiyonun etkilediği değişikliklere bağlıdır. Yaklaşık olarak hastaların 1/3'ünde, obstrüksiyonun cerrahi olarak kaldırılmasından sonra da miksiyon disfonksiyonu belirgin derecede devam eder. Mesanede obstrüksiyona bağlı ortaya çıkan değişiklikler iki basit tiptedir. İlk olarak, detrüsör instabilitesi ne veya azalmış kompliyansa yol açan değişiklikler; klinikte pollaküri ve urgency semptomları ile

beraberdır. İkinci olarak da bozulmuş detrüör kontraktilesi ile beraber olan değişiklikler; klinikte üriner akım gücünde kötüleşme, kesik kesik ve aralıklı miksiyon, artmış rezidüel idrar ve çok az vakada detrüör yetmezliği ile beraberdir. Sonuçta akut üriner retansiyon gelişmesi kaçınılmaz olacaktır.

Obstrüksiyona mesanenin cevabı hakkında çoğu bilgimiz, deneysel hayvan çalışmalarına dayanır. Gosling ve arkadaşları, tavşanlarda uzun süren kısmi mesane çıkım tıkanıklığının detrüör düz kasının kasılmasında ilerleyici azalmaya sebep olduğunu göstermişlerdir (46). Düz kas hipertrofisi, myofilamentlerde azalma, detrüör düz kaslarının içinde mitokondrilerin hasarlanmasını da içeren çıkım tıkanıklığı sonrası tavşan detrüöründe oluşan değişiklikler, uyarılara karşı detrüörün azalmış cevabı ile uyumludur. Bu uyum bozukluğu, mesane çıkım tıkanıklığından sonra 70 güne kadar tedrici olarak artabilir, bu da mesane yapısı ve fonksiyonunda devamlı bir kötüleşme olduğunu gösterir. Üretranın kısmi tıkanıklığı sonrası mesane genişler, normal ağırlığının yaklaşık 15 katına çıkar, büyüme kasın hipertrofisine bağlıdır. Mesane çıkım tıkanıklığı genellikle detrüör hipertrofisine ve mesane instabilitesi ne yol açar (46). Obstrüksiyona insan mesanesinin cevabı hakkında sınırlı bilgiler mevcuttur. Hayvan deneyleri ile mesanenin parsiyel obstrüksiyona cevabı araştırılmış ve üç evreden geçtiği saptanmıştır: 1 – Başlangıç, 2 – Kompansatuar, 3 – Dekompansatuar evre (45).

1-Başlangıç Evresi: İlk olarak mesanede oluşan distansiyonun başlattığı ve çeşitli büyüme faktörlerinin rol aldığına inanılan enflamatuar cevap oluşmakta, bunu takiben de tüm mesane duvarını içeren proliferasyon görülmektedir. üroepitelyal hiperplazi, düz kas hipertrofisi, tip III kollajen sentezi ve depolanması neticesinde mesane ağırlığında belirgin bir artma görülmektedir. İlk baştaki mesane kontraktilesindeki bozulma hızla düzelmekte, mesane basıncındaki artışı karşılayabilmekte ve özellikle boşalma fonksiyonunu yerine getirebilmektedir. Bu fazda adaptatif bir cevap olarak ortaya çıkan kas kitlesindeki artış; detrüör instabilitesi ne yol açan düz kas hücresindeki belirgin intraselüler ve ekstrasellüler değişiklikler ile beraberdir. Obstrüksiyon, aynı zamanda hücre-hücre iletişimde, enerji üretiminde ve düz kas hücresi kontraktil protein ekspresyonunda da değişikliklere neden olur (25,45).

2-Kompanzasyon Evresi: Mesane adalesi daha kuvvetli kontraksiyonlarla mesanenin tam boşalmasını sağlamaya çalışır. Mesane içerisinde rezidüel idrar kalmaz. Yani mesane bir anlamda obstrüksiyona karşı denge kurmuş durumdadır. Kompansatuar dönemde kitle artışı stabilize olmakta, mesane normale yakın basınç ve boşalma fonksiyonu ile çalışabilmekte ise de düz kas ve kollajen dağılımı açısından morfolojik değişiklikler devam etmektedir. Ancak, bir süre sonra mesane normal fonksiyonlarını yerine getirememekte ve dekompanzasyon dönemine girmektedir.

3-Dekompanzasyon (Retansiyon) Evresi: Bu dönemde de kas dokusunun yerini bağ dokusunun almasıyla yeniden mesane ağırlığında hızlı bir artma izlenmektedir. Sonunda özellikle boşalma fonksiyonu progresif olarak bozulmaktadır (47). Obstrüksiyonun devamı ve zamanla artış göstermesi mesane fonksiyonlarının daha da bozulmasına, belirgin rezidüel idrar oluşmasına neden olur. Hasta idrarını tam olarak boşaltamaz. Yükselen üretral rezistansı yenmeye detrüör kontraksiyonlarının gücü yetmez yani obstrüksiyon daha da belirginleşir. Mesanede değişik miktarlarda rezidüel idrar kaldığı için, mesanenin bu yolla da fonksiyonel kapasitesi azalır. Hasta çok daha sık idrara çıkma ihtiyacı duyar. Bu atılmayan idrara bağlı oluşan gerginlik detrüörün kontraksiyon gücünü daha da azaltır ve zamanla üretero-trigonal bileşkede bozulma olur. Sonuçta veziko üreteral reflü (VUR) gelişir (45).

Mesane çıkım direncinin artması, mukozadaki fibroproliferatif gelişim ve kollajen depolanması sebebiyle mesane vizkoelastisitenin kaybına, kompliyansın azalmasına ve basınçta artmaya yol açmaktadır. Burada en önemli rolü kollajen üretimi oynamaktadır. Her ne kadar tip III kollajen elastik özellik taşımakta ise de önce fibroblastlarca daha sonra da bizzat kas hücreleri tarafından üretilen kollajen, sonunda mesanenin viskoelastik yapısını tahrip etmekte ve kompliyansı azaltmaktadır (47). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, detrüör kollajen içeriğinin kadınlarda da yaş ilerledikçe arttığı ve kontraktilitede azalmaya sebep olduğu ileri sürülmüştür. Detrüörde kollajen artışının, belirli bir bulgu olmaksızın, çıkış obstrüksiyonu ile değil, benign prostat hiperplazisi olan erkeklerde mesane yaşlanması (Aging Detrüör) ile ilgili olduğu iddia edilmiştir. Aynı zamanda,

kolinerjik innervasyonun da yaş artışı ile birlikte belirgin derecede azaldığı düşünülmüştür (48).

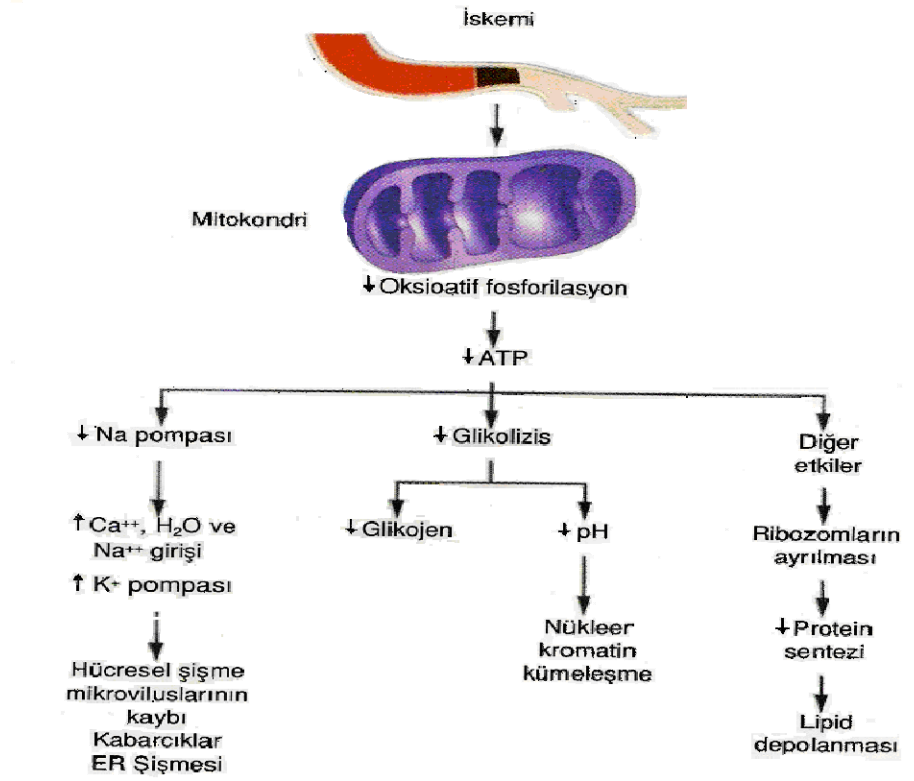
2.6. İskemi Reperfüzyon Hasarı

2.6.1. İskemi

Dokuların normal homeostazı için gerekli olan oksijenin taşınmasındaki yetersizlik iskemi olarak tanımlanır. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (49-51).

İskemiye direnç farklı dokularda değişkenlik gösterir. İskelet kası saatlerce iskemiye maruz kalsa bile normale dönebilirken, nöronlar birkaç dakikada irreversible hasara uğrayabilirler (49). Homeostazı için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP sentezinin azalması (ya mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ya da anaerobik glikoliz yolu ile) intraselüler metabolit birikmesine ve hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar (51,52).

Öncelikle enerji gerektiren Na-K pompası etkilenirken, Na⁺ iyonları intraselüler ortama geçer ve komşu intertisyel boşlukta osmotik dengeyi sağlamak için beraberinde su çeker. Bunun sonucunda K⁺ iyonları intraselüler ortamdan, ekstrasellüler ortama kaçar. Bu değişikliklere mitokondriyal fosfolipaz inaktivasyonu eşlik eder ve oksidatif fosforilasyon kaybı ortaya çıkar böylece adenosin trifosfat (ATP) üretimi durma noktasına gelir. İskemik hasara karşı gelişen erken fazdaki bu değişiklikler zedeleyici ajan ortadan kaldırılmazsa irreversible hücre hasarı meydana gelir (Şekil 2.6). Kalsiyum iyon dengesi bozulur, hücre dışı Ca⁺⁺ plazma membranından içeriye akışı artarak sitoplazmada birikir. Bu olaylar sonucunda sırasıyla mitokondriyal hasar, lizozomlarda şişme, endoplazmik retikulumun dilatasyonu, enzim ve protein kaybı, hücresel kompartımanların bozulması ve otoliz meydana gelir. Bunu asidoz ve osmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder (53).



Şekil 2.6. İskemide erken fazdaki değişiklikler.

2.6.2. Reperfüzyon

İskemik dokuda kan akımının normale dönmesi ile enerji kaynağının geri gelmesi ve toksik metabolitlerin temizlenmesi gibi iki yararlı sonuç ortaya çıkar. Bundan dolayı reperfüzyon iskemik hasarın iyileşmesi için ön koşuldur. Ancak paradoks olarak iskemik dokunun reperfüzyonu daha fazla hasarla sonuçlanabilir (49,54). Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönmesi ile O₂ kaynaklı serbest radikallerin İ/R hasarında önemli rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (55-57).

Dokuda her iskemi periyodu sonrasında progresif mikrovasküler obstrüksiyondan dolayı reperfüzyon süreci gelişmeyebilir. No-reflow fenomeni olarak adlandırılan bu süreç tam mekanizması bilinmemekle birlikte, mikrovasküler yapının bozulması (endotelde ödem, trombosit agregasyonu, hızlı miyosit ödemi sonucu damarın kompresyonu) sorumlu tutulmaktadır (58). Reperfüzyon süreci iskemik intervalin uzunluğu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir, 1-3 saat iskemik kalan

kaslar reperfüze edilebilirken, 5 saat iskemiye maruz kalan olgularda %40–50 oranında no-reflow fenomeni gelişmiştir (59).

Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır. Reperfüzyon hasarı SOR (serbest oksijen radikali), endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir (60-63).

I/R’da doku hasarının oluşmasında rol oynayan faktörler şunlardır;

I- Ksantin Oksidaz

II- Polimorf Nüveli Lökosit (PNL) aktivasyonu

III- Endotelial faktörler

1-Araşidonik asit metabolitleri

a)-Prostasiklin (PGI₂)

b)-Tromboksan A₂ (TxA₂)

c)-Lökotrien B₄

2-Nitrik Oksit

3-Endotelin

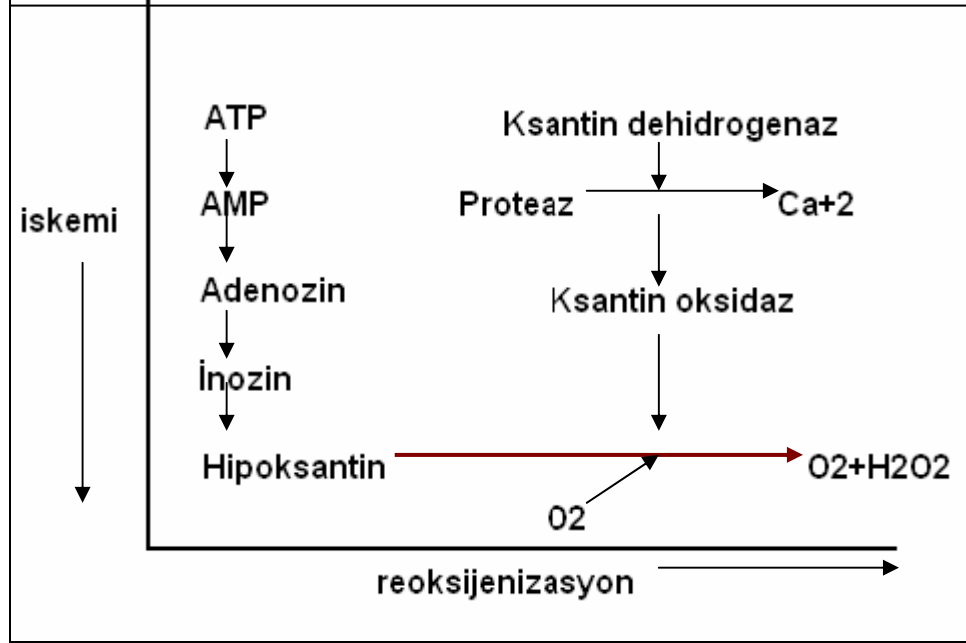
IV- Komplemanlar

V- Sitokinler

VI- Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)

I. Ksantin Oksidaz Yolu

Post-iskemik dönemde, iskemik dokudaki serbest radikallerin en belirgin kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Bu enzim “dehidrojenaz” ve “oksidaz” aktivitesine sahip iki şekilde bulunur. Çalışmalarda iskemi sırasında ksantin dehidrojenaz enziminin kalsiyum aracılı bir proteaz katalizörlüğünde ksantin oksidaza dönüşmesi, intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dakika sürmektedir. Bu da değişik dokuların iskemi-reperfüzyon hasarına neden farklı oranlarda cevap verdiği konusunda açıklayıcı olmaktadır. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar (Şekil 2.7) (24,64–66).

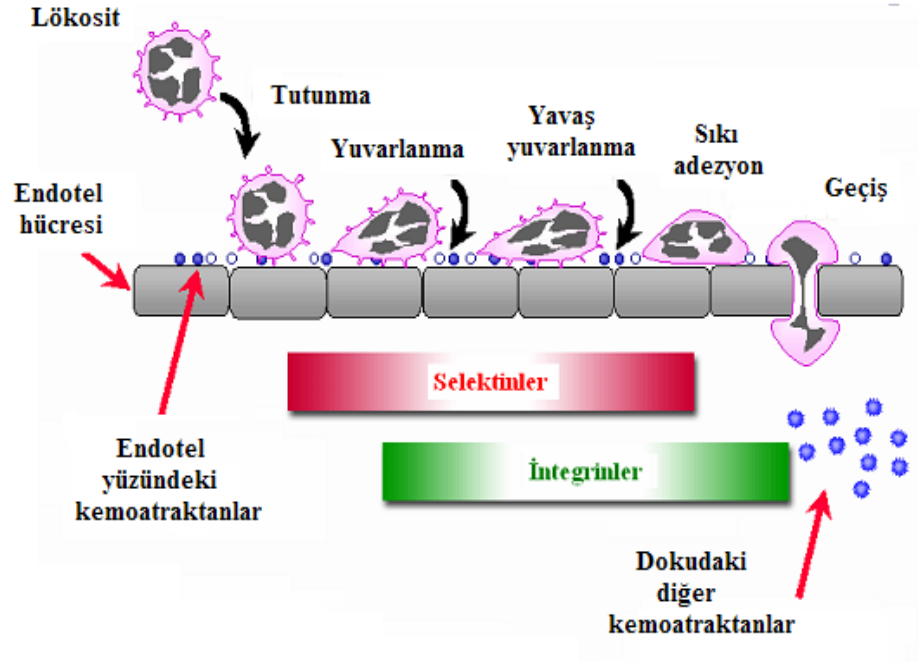


Şekil 2.7. İskemik dokularda ksantin oksidaz yolu ile serbest oksijen radikali üretimi.

II. Polimorf Nüveli Lökosit (PNL) Aktivasyonu

PNL ile endotel hücre ilişkisi İ/R sırasında gelişen mikrovasküler hasarda önemli rol oynamaktadır. Polimorf nüveli lökositlerin başlangıçtaki kemoatraksiyonları endotel hücreleri ve ksantin oksidaz aracılığı ile olur. Aktivasyon ve migrasyonları ise endotel hücrelerde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığı ile olur (67). PNL'ler de endotel hücreleri gibi SOR üretme kapasitesine sahiptir. İ/R hasarında PNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar; 1- Mikrovasküler oklüzyon, 2- SOR salınması; 3- Sitotoksik enzim salınması, 4- Vasküler permeabilite artışı ve 5- Sitokin salınımında artış (68).

Nötrofiller, adhezyon molekülleri aracılığı ile etkileşime girdikleri endotel hücreleri arasında ilerleyerek (diapedez olayı) ekstravasküler dokuya doğru geç ederler (Şekil:2.8). Aktive olmuş nötrofiller, antimikrobiyal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyonda gelen moleküler oksijenden seri reaksiyonlar sonucunda süperoksit anyon radikali(O⁻²), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksil radikali (⁻OH), hipoklorik asid (HOCl) ve kloraminleri (R'RNCl) oluşturarak, ileri doku hasarına neden olurlar.



Şekil 2.8. Lökositlerin iskemik bölgeye göçü.

III. Endotelial Faktörler

Vasküler endotelial çeper pek çok lokal hormon ve otakoid salgılayarak vasküler düz kas tonusunu düzenler (24,69).

1. Araşidonik Asit Metabolitleri

a) Prostaglandin (PGI₂): Endotel hücrelerinden serbestlenen ilk vazodilatör ajan olan PGI₂ endotelial yüzeylerde trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatördür. Prostaglandinler membran fosfolipidlerindeki fosfolipaz A₂'nin etkisiyle arşidonik asit oluşumuyla başlar, siklooksijenaz yoluyla prostaglandinlerden oluşur (69,70).

b) Tromboxan A₂ (TXA₂): Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımı ile oluşan TXA₂ trombositleri agreste eder ve vazokonstriktör etkisi vardır. Reperfüzyon, prostaglandin üretiminin en potent uyarandır. TXA₂, iskemi-reperfüzyonda endotelyuma nötrofil adhezyonunu indükleyen güçlü bir kemotaktik maddedir (70).

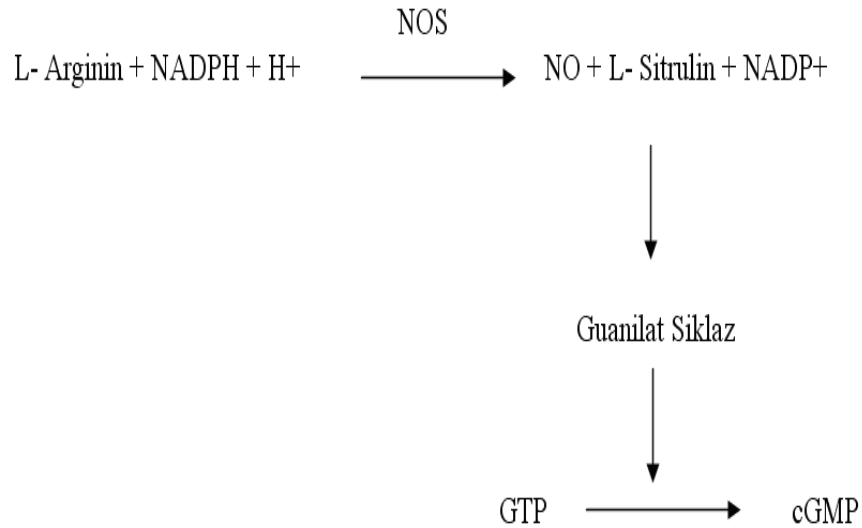
c) Lökotrien B₄ (LB₄): Lökotrienler, iskemi-reperfüzyon boyunca endotelial disfonksiyonda önemli rol oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan arşidonik asit metabolitleridir. LB₄ nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere

bağlanır. Adezyon moleküllerinin aktivasyonunu, endotelial hücrelere yapışmayı, SOR' nin ve proteazların üretimini sağlar. 3 saatlik iskemik periyodu mukozal LB₄ seviyelerini değiştirmezen, reperfüzyonun izlediği aynı süreli iskemi mukozal LB₄ seviyelerinde %200 ila 600 oranında artışa yol açmaktadır (54,71).

2. Nitrik Oksit (NO)

Endotel türevli ve çok önemli bir endojen vazodilatör olan nitrik oksidin biyolojik sistemler üzerinde çeşitli fizyolojik ve patolojik etkisi bulunmaktadır.

NO enzimatik olarak NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-argininin terminal guanido nitrogen atomunun oksidasyonu ile yapılır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Nitrik Oksit sentezi

NOS'un molekül ağırlıkları 125-160 kDa arasında değişen üç izoformu vardır.

1- Konstitüsyonel NOS (cNOS): Az miktarda endotel ve nöronal nitrik oksit yapımından sorumludur. Ca⁺⁺ ve kalmodulin bağımlıdır. Uyarılma sonucu saniyeler veya dakikalar içinde düşük veya orta derecede yapılan NO, daha çok fizyolojik olaylarda etkilidir. cNOS denildiğinde, kalsiyum bağımlı eNOS (endotel hücresi) ve nNOS (sinir hücresi) izoformları kastedilir. **2-** indüklenbilir NOS (iNOS): Sitokinler ve enzimlere maruz kaldıktan sonra, özellikle makrofajlarda NO yapımından

sorumludur. Ca^{+2} ve kalmoduline gereksinim göstermez. Bu enzim daha çok sitotoksik ve immünomodülatör etkilerden sorumlu, uzun sürede fazla miktarda NO yapımı ile ilişkilidir. iNOS aktivasyonu gen transkripsiyonu gerektirdiğinden, NO yapımı birkaç saat sonra görülür ancak birkaç gün devam edebilir. **3- Üçüncü tip NOS:** Nötrofillerde bulunur, kalsiyuma bağımlıdır ancak kalmoduline gereksinim göstermez (72).

NO, bazal durumlarda vasküler endotel tarafından salınan bir maddedir. Asetilkolin, ATP ve bradikinin gibi vazodilatatörler, reseptör aracılı Ca^{++} iyonunun hücreye akışını sağlayarak endotelden NO'nin üretimini ve ekstrasellüler salınımını tetikler. NO, vasküler düz kas ve trombositlerde çözünebilen guanilat siklazı stimüle eder ve intraselüler siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) üretimini artırır. Artmış cGMP düzeyi, vasküler düz kasta relaksasyonu başlatır ve trombositlerin endotele agregasyonu ve adhezyonunu inhibe eder (73).

NO'ye bağlı direkt ve indirekt etkiler mevcut olup, doku NO yoğunluğuna göre farklılık gösterir. Direkt etkiler düşük doku yoğunluklarında, indirekt etkiler ise yüksek doku yoğunluklarında gözlenir. NO'ye bağlı indirekt etkiler, NO'nin oksijen ve süperoksit ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan reaktif nitrik asit türleri (dinitrite dioksit, peroxynitrite) aracılığıyla gerçekleşir. NO'nin direkt etkinliği cNOS izoformu tarafından tayin edilirken, indirekt etkinlik iNOS izoformuna bağlıdır (74).

NO'nin doku koruyucu özellikleri; vasküler tonus kontrolü, trombosit agregasyonunun engellenmesi, lökosit-endotel etkileşiminin azaltılması, dolaşımdan serbest radikallerin temizlenmesi, seçici damarsal geçirgenliğin düzenlenmesi, düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesi, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve endotel hücre rejenerasyonunun uyarılmasıdır. Aynı zamanda iskemik dokularda SOD aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (75).

I/R hasarına bağlı gelişen endotel hücre disfonksiyonunda NO sentezinde azalma oluşarak I/R hasarı derinleşir. Endotel disfonksiyonuna bağlı NO azalma mekanizması hala tam olarak gösterilememiştir. Doku reperfüzyonuyla birlikte SOR oluşumunda patlama, NO seviyesinde azalma ve SOD / katalaz enzim aktivitelerinde düşme gerçekleşir. Böylelikle, süperoksit ve NO arasındaki denge süperoksit lehine kayar. Bu denge kaybı NO bağımlı vazodilatasyonda azalma ve nötrofil-endotel adhezyonu ile trombosit agregasyonunda artışa ikincil "no-reflow" fenomenine

eğilim oluşturur. Buna ek olarak NO yokluğunda süperoksit-hidrojen peroksit dönüşümü kolaylaştırarak inflamatuvar aracılardan (PAF ve LTB₄) sentezinde artış oluşur. Hem iskemi hem de reperfüzyonu takiben zarar gören endotelyumda NO sentezi belirgin derecede azalır. NO gibi inhibitör etkisi çok kuvvetli bir ajanın eksikliği nötrofil aktivasyonunun kolaylaşmasına ve doku hasarının artmasına yol açabilir. Reperfüzyonun geç fazında üretilen NO ve ONOO'in reperfüzyonun erken fazına oranla çok daha fazla olduğu ve bu durumun uyarılabilir NOS (iNOS) “up regülasyonu” ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. NO düzeyindeki bu gecikmiş artış doku hasarının daha da artmasına neden olur (76).

NO sentezini birçok farmakolojik ajan inhibe eder. Floraprotein, kalmodulin hem bağlayıcıları, substrat analogları ve tetrahidrobiopterini azaltan ajanlar, NO inhibitörlerinin başlıcalarıdır. Kullanım kolaylığı ve bulunabilirlik açısından substrat analogları en sık kullanılan NO sentez inhibitörleridir. L-argininin yapısal analogları olan bu ajanlar, metabolize olduklarında NOS enzimine kovalent olarak bağlanırlar NG-monometil-L- arginin (L-NMMA), N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) ve NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) gibi maddeler; L-argininin yapısal analoglarıdır ve selektif olmayan NOS inhibitörleridir, yani hem cNOS hemde iNOS'ı inhibe ederler. L-nitroarginin, cNOS'a spesifik bir inhibitördür. Aminoguanidin ise sadece iNOS'ı inhibe eder (77).

3. Endotelin

Vasküler endotelde yapılan, parakrin ve otokrin etki gösteren, 21 aminoasitli, bilinen en potent vazokonstriktör bir polipeptiddir. Endotelin dolaşımında çok küçük konsantrasyonda (nanomolar/pikomolar) bulunur (78).

IV. Komplemanlar

Komplemanların arka arkaya aktivasyonu, anaflatoksin C3a ve C5a'nın üretimine yol açar. Nötrofiller üzerindeki etkileri ise kemotaksis, endotele adezyonun artışı, serbest oksijen radikallerinin üretim ve salınmasını sağlamaktır (49,69).

V. Sitokinler

İ/R hasarını takiben dolaşımda proinflamatuvar sitokinler olan IL-1, IL-6 ve TNF- α belirir. TNF- α konakçı cevabının oluşumuna yol açan ilk ve en güçlü mediyatörlerden biridir. TNF- α sentezinin kaynağı, periton ve splanknik dokularda çok bulunan monositler, makrofajlar ve T hücreleridir. Yarı ömrü 15-18 dk. olmasına rağmen TNF'nin kısa süreli ortamda bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün ileri kısmındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olur (79).

TNF- α ve IL-1 β nötrofilleri aktive ederler ve komşu endotel hücreleri hasara uğratan değişik inflamatuvar etkenlerin salgılanmasına yol açarlar. Bu sitokinler aynı zamanda hücre yüzey adhezyon moleküllerinin ortaya çıkışını arttırmak için endotel hücreleri de aktive ederler, bu da aktif lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasına ve daha fazla hasarın oluşmasına yol açar (80).

TNF- α , endotel hücrelerine nötrofil agregasyon ve adezyonuna, süperoksit anyon oluşumuna, nötrofilik fagositoz ve sitotoksik aktivitesinin artmasına neden olur (81). TNF- α 'nın diğer fonksiyonları koagülasyonun aktivasyonu, prostaglandin E2, platelet aktive edici faktör (PAF), glukokortikoidler ve eikozanoidlerin salınımının arttırılması sağlar. Ayrıca lenfositteki IL-2 üretiminin ve hücrelerin IL-2 ye cevabını arttırarak şok benzeri bir tabloya da neden olur (82).

VI. Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)

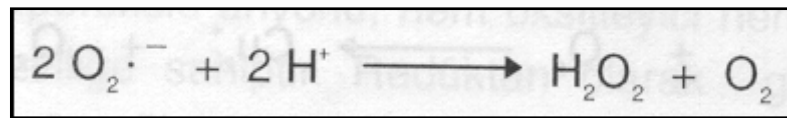
Fosfolipaz A₂'nin etkisiyle endotel hücreleri tarafından membran fosfolipidlerinden üretilir. Çok çeşitli inflamatuvar reaksiyonda (ARDS, Akut pankreatit, İnflamatuvar barsak hastalığı, Glomeruler hasar vs.) etkin olduğu gözlenen bir substrattır (49,83). Trombositlerin şekil değişikliğine, agregasyonuna ve granül içeriğinin salınmasına yol açan oldukça kuvvetli bir ajandır. Ek olarak PAF kuvvetli bir nötrofil kemoatraktan ve aktivatör bir maddedir ayrıca TNF- α üretiminde önemli bir rol oynar. Dokuların reperfüzyonu sonucu lökositlerin aktivasyonuna, adhezyonuna ve aynı zamanda vasküler permeabilite artışına yol açar. Pek çok çalışma PAF'ın in vitro ve in vivo ortamda lökositlerin mikrovasküler endotele adezyonunu arttırdığını göstermiştir. PAF'ın reperfüzyon sonucu gerçekleşen kemotaksisin bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir (49,84).

2.6.3. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (katyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Moleküler oksijen, radikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede serbest oksijen radikali (SOR) oluşturma eğilimindedir. Kısa ömürlü ve anstabil moleküllerdir (85).

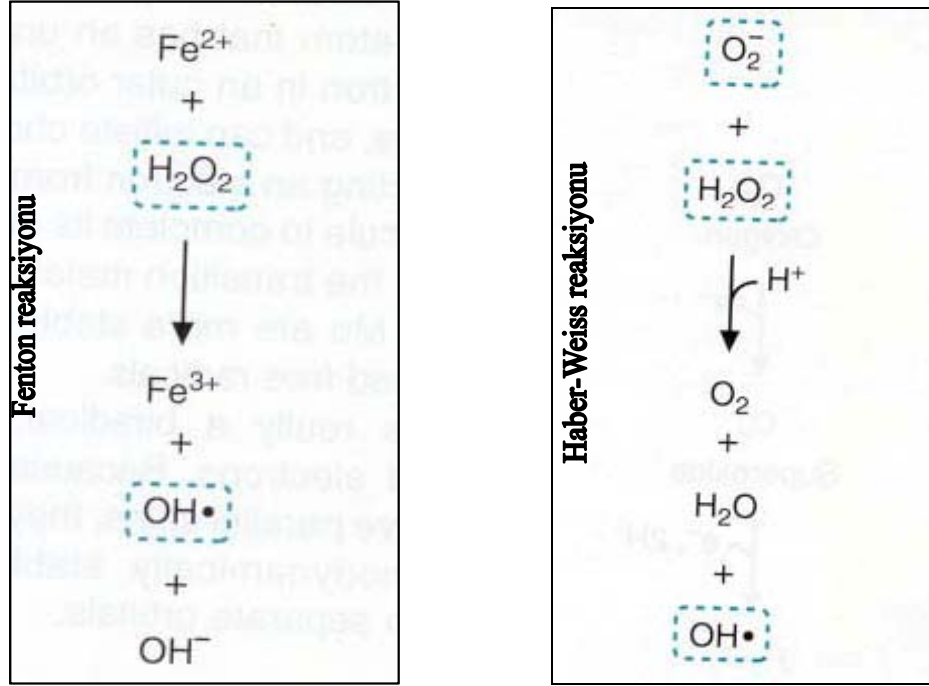
SOR normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-)'dir. Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali (O_2^-) oluşur. Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali (H_2O_2) oluşur. Daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikali (OH^-) oluşur. Organizmada bu serbest radikaller dışında, hipoklorik asit gibi radikal olmayan, bununla birlikte serbest radikal oluşturma potansiyelinde olan zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Serbest oksijen radikallerinden en aktif olanı OH^- radikalidir (85).

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin (O_2^-) dismutasyonu ile olur (Şekil 2.10). Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir.



Şekil 2.10. Dismutasyon reaksiyonu.

Hidrojen peroksit (H_2O_2) bir serbest radikal olmadığı halde serbest oksijen radikalleri (SOR) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{++} veya diğer geçiş metallerinin varlığında **Fenton reaksiyonu** sonucu, süperoksit radikalinin (O_2^-) varlığında **Haber-Weiss reaksiyonu** sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^-) oluşturur (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu

Süperoksit radikalının lipid solubilitesi sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit lipid solubldur. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin oluştuğu yerden uzakta olan fakat Fe^{++} içeren membranlarda hasar oluşturabilir.

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali (O_2^-) ve hidroksil radikali (OH^-) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur (86). Bu hasarlanma özetle şu mekanizmalarla olur;

Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve

oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L^{\cdot}) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO^{\cdot}) oluşması, SOR'nin neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Lipid radikallerinin moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri oluşur. Lipid peroksit radikalleri, membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. Oluşan membran hasarı hücre duvarını etkileyebileceği gibi hücre içi organellerin membranlarını da ilgilendirmektedir. Lizozom membranının hasarı sonucu serbestleşen lizozomal enzimler hücre hasarının artmasına neden olur (87).

Lipid peroksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (88).

Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Serbest radikallerin etkisiyle, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin SOR üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidrosilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi

hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali (O_2^-) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (88,89).

Serbest Radikallerin Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri

SOR, nükleer ve mitokondrial DNA'da timin ile reaksiyona girerek tek zincir kırılmaları oluşturur. Hidroksil radikali (OH^-) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (90,91).

2.7. İ/R Hasarına Karşı Oluşan Savunma Mekanizmaları

SOR oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. **Antioksidan** olarak da adlandırılan bu savunma mekanizmalarının etkileri dört ayrı şekilde olur;

- 1) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması **onarıcı** etkidir.
- 2) SOR'ni bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki **zincir kırıcı** etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
- 3) SOR'yle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme **bastırıcı** etkidir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- 4) SOR'ni etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme **toplayıcı** etkidir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler. Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler.

2.7.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar

- 1) Süperoksit dismutaz (SOD)
- 2) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)

- 3) Glutatyon S-Transferazlar (GST)
- 4) Katalaz (CAT)
- 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi
- 6) Hidroperoksidaz

Enzim olmayan endojen antioksidanlar

- 1) Melatonin
- 2) Seruloplazmin
- 3) Transferrin
- 4) Miyoglobin
- 5) Hemoglobin
- 6) Ferritin
- 7) Bilirubin
- 8) Glutatyon
- 9) Sistein
- 10) Metiyonin
- 11) Ürat
- 12) Laktoferrin
- 13) Albümin

2.7.2. Eksojen Antioksidanlar

Vitamin olan eksojen antioksidanlar: 1) α - tokoferol (vitamin E), 2) β -karoten, 3) Askorbik asit (vitamin C), 4) Folik asit (folat).

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar:

- 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenylene iodonium)
- 3) Rekombinant süperoksit dismutaz
- 4) Trolox-C (vitamin E analogu)

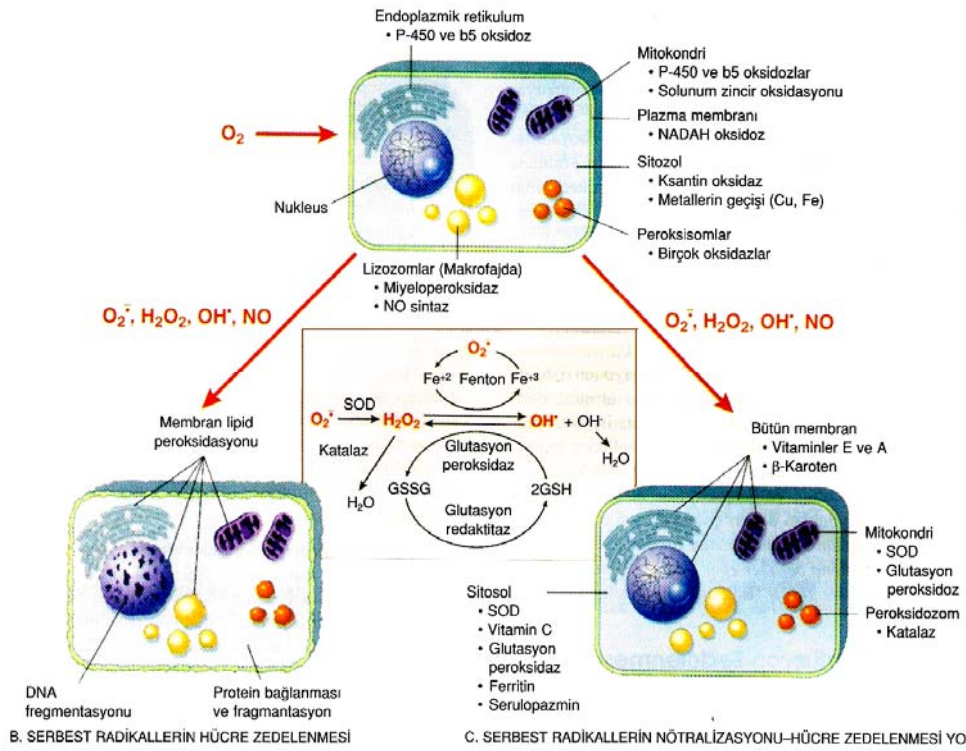
- 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- 6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- 7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- 8) Nötrofil adhezyon inhibitörleri
- 9) Sitokinler (TNF ve IL-1)
- 10) Barbitüratlar
- 11) Demir şelatörleri (Şekil 2.12).

İ/R hasarına karşı başlıca korunma mekanizmalarını 3 grupta toplayabiliriz;

1- Fizyolojik: Süperoksit dismutaz, katalaz, NO gibi serbest radikal temizleyicileri.

2- Farmakolojik: Mannitol, allopurinol, antioksidanlar, desferroksamin.

3- Fiziksel: İskemik prekondüsyon, hipotermi.



Şekil 2.12. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve antioksidan mekanizmalar.

2.8. Alfa Lipoik Asid

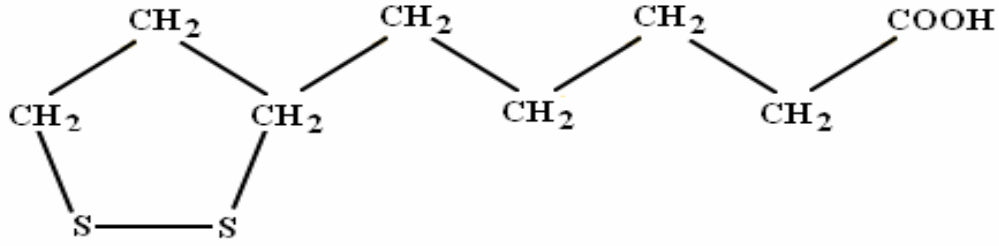
Alfa Lipoik asid (ALA; 1,2-dithiolan-3-pentanoik asit; 6,8-dithio-oktanoik asit veya thioktik asit) mikroorganizmalardan insanlara kadar bütün organizmalarda enerji metabolizmasında kofaktör olarak gerekli olan ve son zamanlarda antioksidan özellikleri ortaya konulan bir moleküldür (92,93). İlk olarak 1937’de, bazı bakterilerin gelişimleri için patates ekstraktında bulunan bir maddeye gereksinim duydukları ortaya konulmuş ve bu maddeye “*potato growth factor*” denilmiştir. 1951’de ise Reed ve arkadaşları tarafından bu madde tonlarca karaciğerden birkaç miligram olarak izole edilmiş ve alfa lipoik asit olarak adlandırılmıştır (94-96).

2.8.1. Lipoik Asidin Genel Özellikleri ve Kaynakları

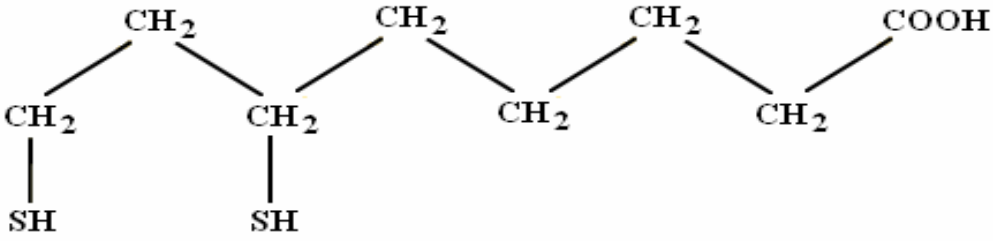
Lipoik asid (LA) bakterilerden insanlara kadar birçok organizmada sentezlenmektedir. İnsanlarda karaciğer ve diğer dokular tarafından sentezlenerek, doğal bir kofaktör olarak görev yapmaktadır (94). LA predominant olarak beyin, böbrek, karaciğer, ince barsak ve iskelet kaslarında bulunmaktadır. Memeli dokuları 5-25 nmol/g LA içermekle birlikte, bunun hemen hemen tümü proteine bağlı formda bulunup, dışarıdan verilmediği sürece hücrede sadece çok az serbest LA bulunmaktadır. Çeşitli sebze ve meyveler ile hayvansal dokular farklı düzeylerde *lipoillizin* formunda R-LA içerirler. Ispanak başta olmak üzere brokoli, domates, bezelye, Brüksel lahanası ve pirinç ALA içeren bitkisel kaynaklardır. Kalp, karaciğer ve böbrek gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip hayvansal dokular da ALA bakımından zengin kaynaklardır (96,97).

2.8.2. Lipoik Asidin Yapısı

Alfa-Lipoik asid yapısında iki sülfür atomu ve bir karboksilik asit grubu bulunan beşli bir halka içermektedir. Alfa lipoik asid (ALA) kendi orijinal okside formunda ya da dihidrolipoik asit (DHHLA) şeklinde redükte formda bulunabilir. ALA diyetten hızla emilir, transport sonucu hücreler tarafından alınarak, beyin dahil birçok dokuda redükte formu olan DHHLA’ya indirgenir (93-96). ALA; DHHLA’ya indirgendiği zaman molekülün uç kısmındaki atomların oluşturduğu dithiolan halkası kırılır ve sülfür atomları sülfhidril (-SH) grupları şekline dönüşür. ALA ve DHHLA’nın yapıları Şekil 2.13’de verilmiştir.



α -Lipoik Asit (α -LA)



Dihidrolipoik Asit (DHHLA)

Şekil 2.13. ALA ve DHHLA' nın yapıları.

2.8.3. ALA'nın DHHLA İndirgenmesi

Mitokondri bulunan çoğu hücrede ALA dihidrolipoamid dehidrogenaz (E3 enzimi mitokondriyal a-ketoasit dehidrogenaz kompleksi (E.C.1.8.1.4) tarafından NADH-bağımlı bir reaksiyon ile DHHLA'ya indirgenir. Mitokondri bulunmayan hücrelerde ise indirgenme NADPH-bağımlı olarak glutatyon redüktaz ve thioedoksin redüktazlar tarafından gerçekleştirilir (97-99). Ayrıca sentetik olarak NaBH_4 ile de indirgenme oluşabilir. ALA'nın antioksidan özelliklerine büyük ölçüde indirgenmiş formunun katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (100).

2.8.4. Lipoik Asidin Fonksiyonları

ALA'nın vücutta iki şekilde fonksiyon yaptığı düşünülmektedir. Bunlardan ilki, metabolik süreçlerde koenzim olarak görev alması; ikincisi ise suplementasyon yoluyla ulaşılan dozlarda antioksidan özellikler göstermesidir. Lipoik asit; a-ketoglutarat dehidrogenaz, dallı zincir a-ketoasit dehidrogenaz, pirüvat dehidrogenaz multienzim kompleksleri için kofaktör olarak rol oynayıp, enerji metabolizmasında çok önemli bir yere sahiptir (92,95). ALA'nın karboksilik grubu pirüvat

dehidrogenaz komplekslerinin dihidrolipoil transasetilaz subunitine (E2) spesifik lizin e-amino grubuna amid bağı ile kovalent olarak bağlanır. ALA ayrıca glisin dekarboksilaz kompleksinin H proteinine de bağlanır ve glisinin CO₂, amonyak, 5,10-MTHF ve NADH'a reversible oksidasyonunu katalize eden glisin cleavage sisteminin de bir bileşendir (92,93,95,101).

2.8.5. Lipoik Asidin Antioksidan Özellikleri

Bir bileşiğin antioksidan potansiyeli değerlendirilirken bazı kriterler göz önünde bulundurulmaktadır. **a)** serbest radikalleri temizleme spesifitesi, **b)** diğer antioksidanlarla etkileşimi, **c)** metallerle şelat yapma yeteneği, **d)** absorpsiyonu, biyolojik yararlılığı ve hücre konsantrasyonu, **e)** gen ekspresyonuna etkileri, **f)** molekülün membran veya akuöz fazda lokalize olması, **g)** oksidatif hasarı onarma yeteneği (92,93).

Bir maddenin iyi bir antioksidan olması için bu özelliklerin tümüne sahip olması gerekmez. Örneğin Vitamin E vücutta iyi bir antioksidan olarak düşünülmesine rağmen sadece membran ya da lipid fazda etkisini gösterip özellikle lipid peroksil radikallerini nötralize ederken, akuöz fazdaki radikallere karşı çok az ya da hiç etki göstermemektedir (93). İdeal bir antioksidan ise yukarıdaki kriterlerin tümünü sağlamalıdır. Alfa lipoik asit/dihidrolipoik asit redoks çifti, diğer antioksidanlarda bulunmayan bazı özelliklere sahiptir. ALA "*ideal*", "*eşsiz*" ve "*evrensel antioksidan*" olarak tanımlanmaktadır. Bunun nedenleri:

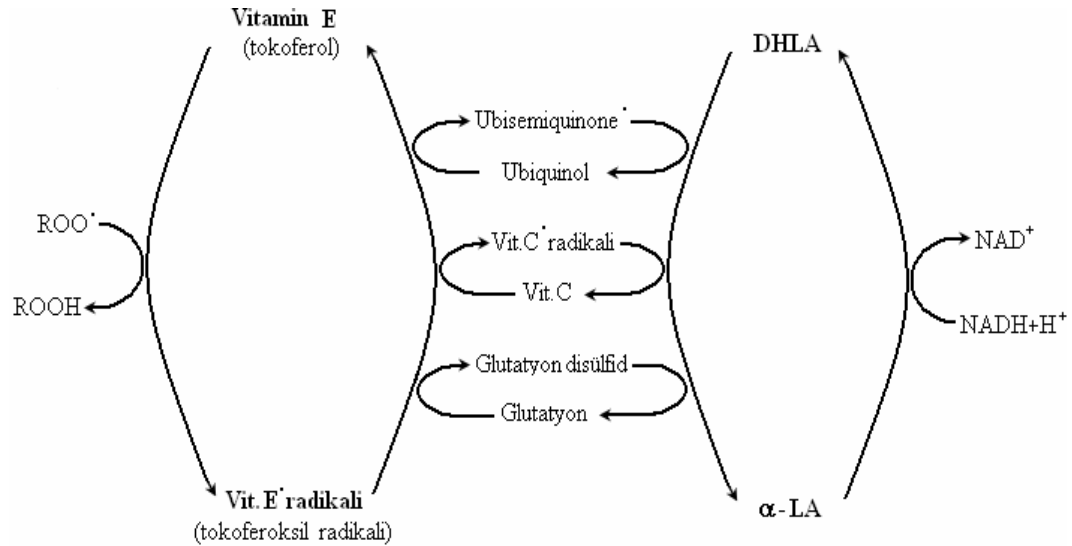
1. Hızla absorbe edilmesi: Diyet ya da dışarıdan alınan ALA hızlı bir şekilde absorbe edilir. Birçok dokuya dağılır ve kan-beyin bariyerini de geçer (93,102).

2. Redükte ve okside formlarının antioksidan etkiye sahip olması: ALA hücre içerisinde DHLA'ya indirgenir ve antioksidan yeteneklerine büyük ölçüde indirgenmiş formunun katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (100). Çoğu antioksidan bileşik sadece indirgenmiş formda buldukları zaman antioksidan olarak rol oynamasına rağmen (örn: redükte glutatyon), ALA'nın hem okside hem de redükte formu kuvvetli antioksidanlar olarak rol oynarlar (93). DHLA'nın tiyol grupları için yüksek pKa'sı (10.7) bu molekülün, pKa'sı 9.45 olan GSH'dan bile daha kuvvetli bir nükleofil olduğunu göstermektedir (100).

3. Hem sıvı, hem de lipid fazda çözünmesi: ALA, amfifilik özellik gösterip hem sıvı hem de lipid fazda çözünebilmektedir. Bu özelliği oldukça önemlidir. Çünkü suda çözünen antioksidan bileşikler (örn: Vit C) hücre içinde, yağda çözünen antioksidanlar (örn: Vit E) ise hücre membranında bulunurken; ALA ve DHLA hem hücre içinde hem de membran düzeyinde etki göstererek çift koruma sağlamaktadır (93,100,103,104).

4. Glutasyon düzeylerini arttırması: ALA, hücrelerde başlıca antioksidan olan glutasyon üretimini stimüle etmektedir.

5. Diğer antioksidanlarla etkileşimi: ALA; Vitamin C, Vitamin E, glutasyon ve koenzim Q'yu da kapsayan çeşitli antioksidanları aktif durumlarına dönüştürüp yeniden oluşturma yeteneğine sahiptir (Şekil 2.14) (95,96).



Şekil 2.14. Lipoik asidin diğer antioksidanlarla etkileşimi.

6. Serbest metal iyonlarıyla şelat yapması: ALA; geçiş metal iyonlarıyla şelat yapma yeteneğine sahiptir. Arsenik, kadmiyum, kurşun, cıva gibi toksik metallere çözünmeyen kompleksler oluşturduğu ortaya konulmuştur. ALA ve DHLA'nın şelasyon yaptığı geçiş metalleri: Pb^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} , Co^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3}/Fe^{+2} , Ni^{+2} (97-100).

7. Serbest radikalleri nötralize etmesi: ALA ve DHLA; OH^- , $-O_2$, LOO^- , NO^- ve $HOCl$ 'yi içeren çeşitli radikallere karşı antioksidan olarak rol oynarlar. Ayrıca $-O_2$ ve H_2O_2 ile de etkileşime girdikleri bilinmektedir (96,100). DHLA mükemmel bir

indirgeyici ajandır ve serbest radikale bağılı patolojilere karşı insanlardaki antioksidan defansları arttırıcı potansiyele sahiptir (104).

8. Normal gen ekspresyonunu arttırması.

9. Birçok hastalıkta terapötik olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olması:

ALA'nın; klinik olarak mantar zehirlenmesi ve metal toksisitesinin tedavisinde kullanılmanın yanı sıra; yukarıda bahsedilen önemli etkileri ile iskemi-reperfüzyon hasarı, diyabet, katarakt oluşumu, HIV aktivasyonu, nörodejenerasyon ve radyasyon hasarı gibi çeşitli oksidatif stres modellerinde yararlı olduğu ortaya konulmuştur (93).

2.9. Silymarin

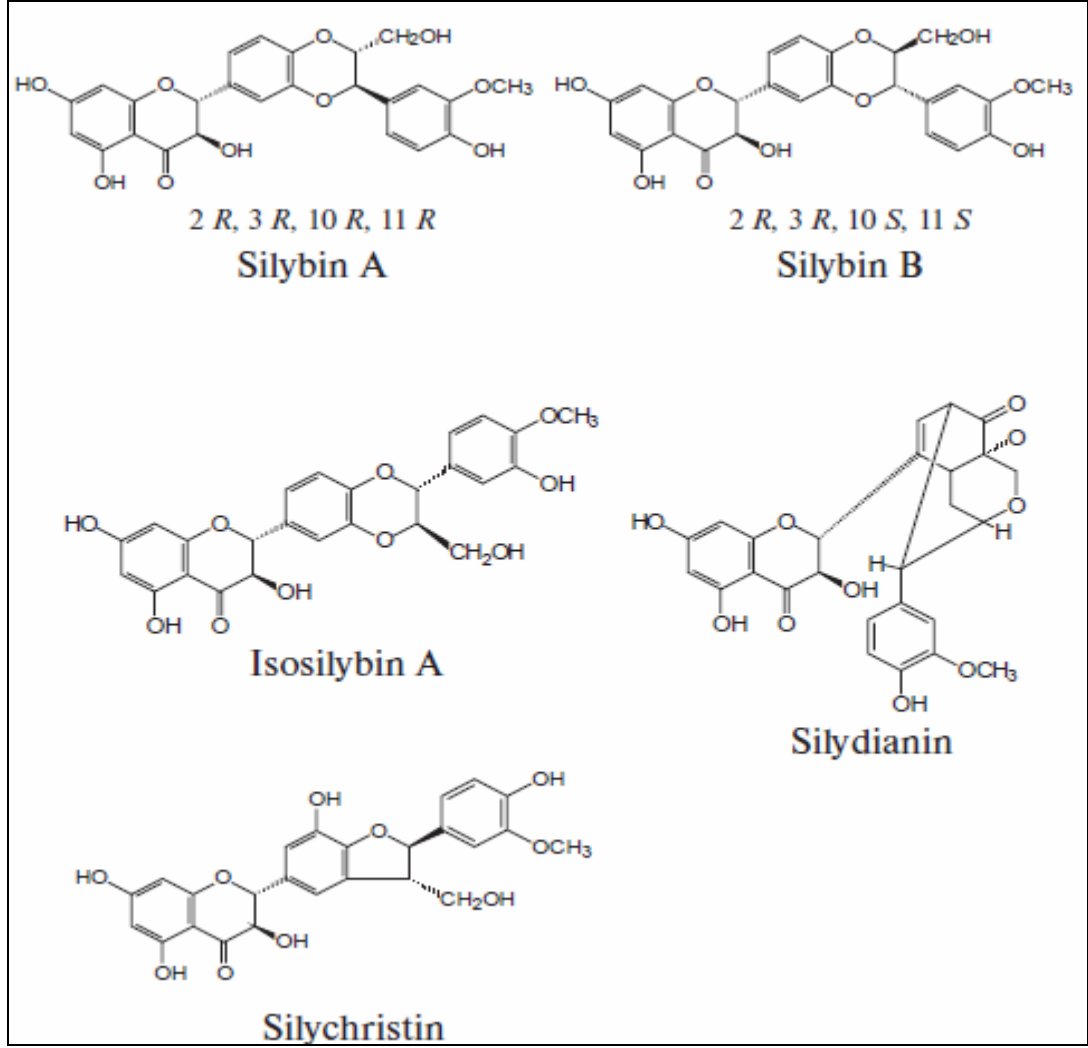
Silymarin uzun yıllardır karaciğerdeki hepatit, siroz gibi ve safra kesesindeki hastalıklarda çeşitli çevresel toksinler ve kimyasalların yol açtığı zehirlenmelerde, yılan ve böcek sokmalarında, mantar zehirlenmelerinde ve de alkol tedavilerinde kullanılır. Silymarin *Milk Thistle* olarak da bilinmektedir ve *Silybum marianum* L. Gaertn (deve dikenini) ya da *Carduus marianus* L. (Meryem ana dikenini) bitkisinin yaprak ve tohumlarından elde edilir (Şekil 2.15). Silymarin, *Astraceae* (*Compositae*) familyasına ait polifenolik bir flavonoiddir ve molekül ağırlığı 482,44 g'dır. Silymarindeki bileşenlerin yapısı 1960'lı yıllarda tanımlanmıştır. Yapısında %70-80 oranında flavolignanlar ve %20-30 oranında ise tanımlanmamış polifenolik bileşenler bulunur. Silymarinin kimyasal formülü $C_{25}H_{22}O_{10}$ 'dir. Silymarin 4 flavolignan izomerlerinin kompleks bir karışımıdır. Bunlar silymarinin ana maddesi olan silybindir ve yaklaşık olarak %60'ını kapsar. Bunun dışında isosilybin, silychristin ve silydiadin bulunur (Şekil 2.15) (105-108).



Şekil 2.15. *Silybum marianum*un doğadaki görünümü.

Silymarin suda çok az çözülür. Plazmadaki en yüksek değeri hem insan hem de hayvan safra tuzlarında alınımından sonraki 4-6 saat arasında bulunur. Silybin ve silymarinli bileşenler karaciğerde sülfat ve glukronik asitle hızla konjuge olurlar. Konjugatlar plazmaya ve safraya geçerler. Silymarin temel olarak safrayla, az bir miktarı da idrarla atılır. Silymarinin yarılanma ömrü yaklaşık olarak 6 saattir (105,109).

Silymarinin toksitesi oldukça düşüktür ve embriyo toksik özellikleri yoktur. Silymarinle yapılan akut toksisite çalışmalarında letal doz (LD50) değerleri farede 400 mg/kg, sıçanda 385 mg/kg, tavşan ve köpekte ise 140 mg/kg olarak bulunmuştur ve bu değerler infüzyon hızıyla orantılıdır (105,109).



Şekil 2.16. Silymarinin içerisindeki bulunan maddelerin kimyasal formülleri (110).

Silymarinin koruyucu özellikleri bakımından 4 etkisi gözlenir (Şekil 2.17) (111);

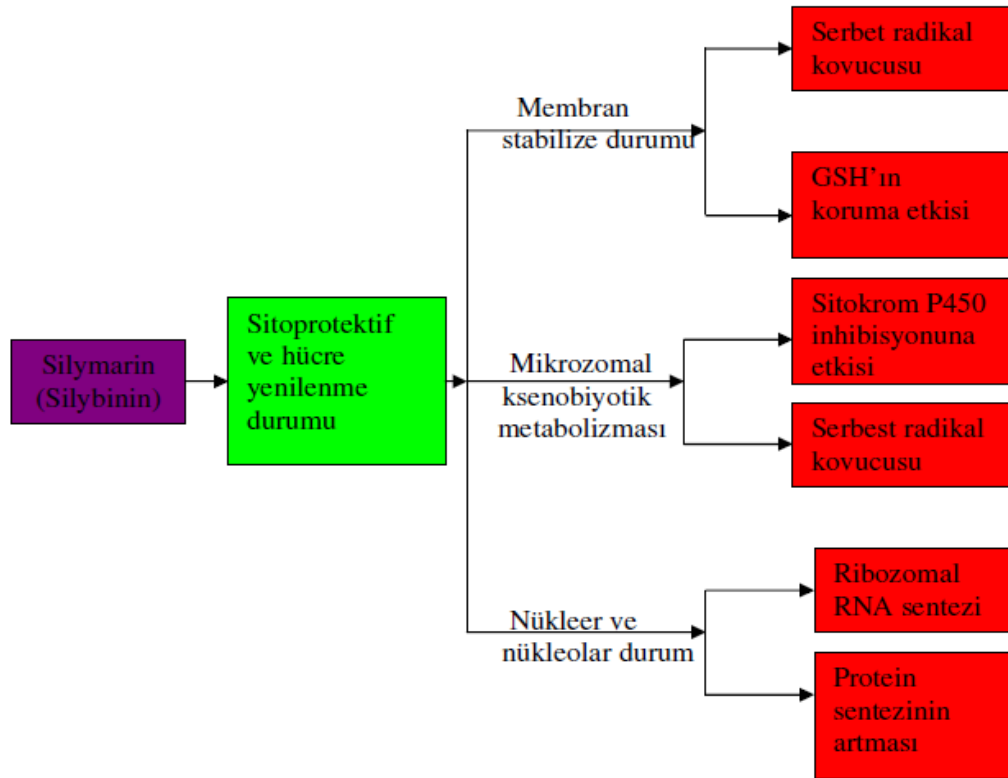
- 1- GSH'ın hücresel içeriğini artırır ve serbest radikal temizleyicilerle lipit peroksidasyonuna karşı aktivite gösterir.
- 2- Membran geçirgenliğini düzenler ve ksenobiyotik tehlikelerde membran stabilitesini artırır.
- 3- Steroid gibi etkileriyle nükleer ekspresyonu düzenler
- 4- Hepatositlerin siroza neden olan kollajen fibrillerin yıkımından sorumlu olan miyofibroblastlara dönüşmesini baskılar.

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda Silymarinin östrojenik aktivitesinin olduğu, ilaç taşıyıcıların (P-glycoprotein) modülasyonunda görev aldığı ve nükleer

faktör kappa B'nin (NF- κ B) baskılanmasıyla DNA ekspresyonu üzerine spesifik etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (106, 112).

Silymarin, bazı kimyasalların karsinojenik etkilerini inhibe eder. Silybin hücresel döngü, sinyallerin ve çeşitli mitojeniklerin modülasyonlarında görev alır. İnsan prostat kansinomunda, silymarin mitojenik sinyal yollarını ve hücresel döngü düzenleyicilerini baskılar. Silymarin ayrıca steroid hormonlara bağlı tümörleri inhibe eder ve antiangiyojenik etkisi vardır (106,113,114).

Silymarin veya silybin bazı nörodejeneratif hastalıklarda hücreleri nörotoksik etkilerden korur ve bu hastalıkların tedavilerinde kullanılabilir. Silymarin bazı hücre kültürlerinde farklılaşmayı baskılar ve hücreleri apoptoza karşı korur. Ayrıca, silymarin oksidatif stresin tetiklediği apoptoza karşı primer hipokampal nöronları korur. Silymarin glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz ve katalaz gibi antioksidanları uyarır. Silymarin makrofajlardaki ve T-lenfositlerdeki interlekin 1 β (IL-1 β), interferon- γ (IFN- γ), interferon- α (IFN- α) gibi inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe eder ve pankreastaki β hücrelerini korur (106,115-117).



Şekil 2.17. Silymarinin etki mekanizması (111).

Silymarin ultraviyolenin (UV) tetiklediği oksidatif stres, inflamasyon, immün cevap ve DNA hasarı gibi tehlikeli etkileri baskılar ve azaltır. Silymarinin apoptoz sinyal yollarında, kaspaz aktivasyonunun ve MAPK üzerine koruyucu etkileri vardır. Silymarin sitotoksiteyi ve kaspaz aktivitesini ortadan kaldırır. Bcl ve Bax oranını arttırır. Ayrıca silymarin atheroskleroza karşı adhezyon moleküllerini etkiler (106,118, 119).

Silymarinin karaciğer ve safra hastalıklarına karşı koruyucu, antikarsinojenik, antiapoptotik, antioksidan, hücre çoğalmasına arttıran, nörotoksinlere ve kardiyotoksinlere karşı koruyucu, östrojenik ve anti östrojenik etkileri vardır (105,106).

2.10. Apoptozis

Apoptoz eski Yunanca ‘*apo*’ (ayrı) ve ‘*ptosis*’ (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terk etmesi ve arkadan gelen hücelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, klasik Yunan tarihçisi olan James Cormack’ın önerisiyle ‘‘apoptoz’’ olarak adlandırılmıştır (120).

Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tarif edilmiştir. Kerr fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı ‘‘büzüşme nekrozu’’ olarak adlandırmıştır (121).

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (122,123). Apoptozis ve mitozis dokuda sürekli bir denge halindedir. Zamanı gelince ölen hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürler (programmed cell death). Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (*physiological cell death*) olarak da adlandırılır. Ayrıca, bir şekilde DNA’sı hasarlanmış (virüs etkisi veya çevresel nedenlerle) hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler (*cell suicide*) ve bunu organizmanın yararı için yaparlar. Doku homeostazisi için (örneğin yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin ‘‘turnover’’ında olduğu gibi) hücreler ortamdan ölümlerle kaybolur (*cell deletion*). İşte, tüm bu kavramlar (*programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre*

intiharı, hücre kaybı) apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılabilen terimlerdir (122,124,125).

Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozisi, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımını yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (126). 1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir (127). Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir (128).

Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz. Apoptozisin gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir. Apoptozis, hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendisini aktif olarak yok eder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmantasyonu ile karakterizedir (122,129).

2.10.1. Apoptozisin Önemi

İnsan vücudunda her saniyede 10^5 hücre mitoz ile oluşurken, yine benzer sayıda hücre apoptozis ile ölür (130). Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik bir süreçtir. Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım, yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden devamlı olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir (131). Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozise örnektir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya

organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır (131,132). Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (133). Apoptozis, doku gelişimi esnasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde de rol alır. Örneğin böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun yok edilmesine neden olur. Diğer bir örnek de memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasındaki programlanmış hücre ölümüdür. Fazla sayıda üretilen nöronların %50'den fazlası programlanmış hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılır. Ayrıca akut hücre hasarı durumunda da apoptozis rol almaktadır (131).

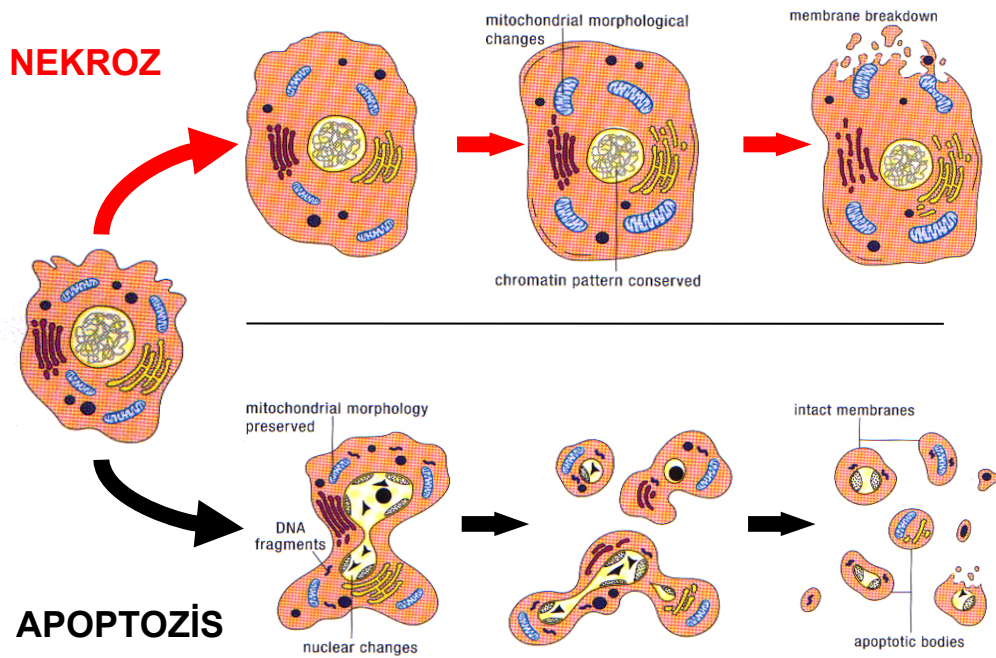
2.10.2. Apoptozisde Hücre Morfolojisi

Apoptoz, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine, dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak yangısal değişiklikler yoktur. Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde mikst kondens bir yapıda olup daha diffüz görünümündedir. Apoptoziste süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180–200 bp. (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır. İmmün Elektforezi yapıldığında *“ladder patern”* olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (134). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 30×10^5 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz.

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, birkaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm, muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır. Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskobunda incelendiğinde, hücreler, etrafında açık bir halo ile görülmektedir Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin

parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Hücre henüz yaşamaya devam etmektedir (135).

Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir. Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidil serin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (128). Diğer bir hücre ölüm şekli olan **nekroz** ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir (129) (Şekil 2.18) (Tablo 2.2).



Şekil 2.18. Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar.

Tablo 2.1. Nekrozis ve apoptozis arasındaki farklılıklar.

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan Nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması HIV Kanser ilaçları Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Sitotoksik T lenfositler Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik ve Histolojik Özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin " <i>flocculation</i> "u Hücre şişmesi Organellerin disintegrasyonu Endoplazmik retikulumun dilatasyonu Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	İntak hücre membranı fakat membranda " <i>bleb</i> "lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücrenin intak mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal Özellikler	Bozulmuş iyon homeostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4°C'de gerçekleşebilir DNA rasgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4°C'de gerçekleşmez DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni→apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmentasyonu
Diğer Özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür patolojik etkiler sonucu gerçekleşir İnflamasyona neden olur	Hücreler tek veya birkaçı bir arada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir İnflamasyon görülmez

2.10.3. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin klasik tanımlaması otonomik ve programlı hücre intiharı olarak da ifade edilebilir. Apoptozis, hücre dışı ve hücrel seviyede oluşan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir (136). Hücrel düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligant (FasL) ve Tümör nekrozis faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir (137). Bunun dışında apoptozis büyüme faktör ya da hormon eksikliği, viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon gibi bazı faktörler ile de başlatılabilir. Ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan p53 geni, reaktif oksijen radikalleri (hem mitokondri, hem plazma membran, hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak) apoptozisi tetikleyebilmektedir.

I— Apoptozis Sinyalinin Oluşumu

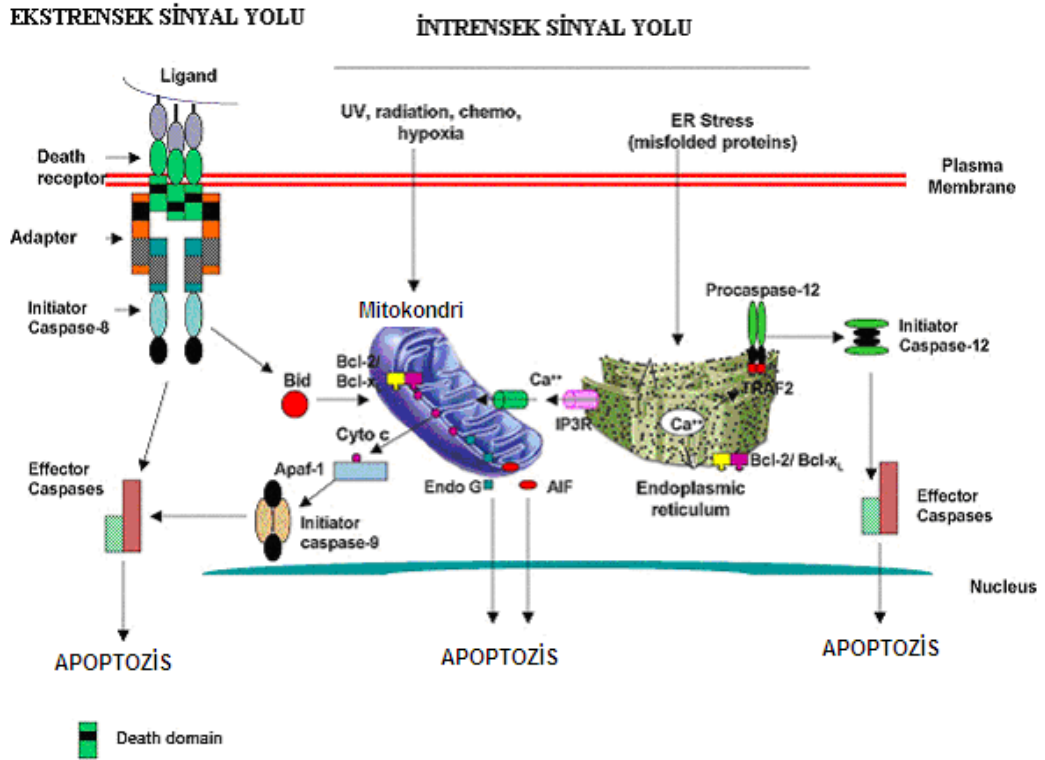
Apoptozisin indüklenmesinde iki majör sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir. Bunlar "**ekstresek**" hücre dışı ve "**intresek**" hücre içi sinyal yollarıdır (Şekil 2.19).

1- Ekstresek sinyal yolu

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine bağlanma ile tetiklenme

2- İntresek sinyal yolu

- a) Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması
- b) Endoplazmik Retikulum aracılı apoptozis oluşturulması



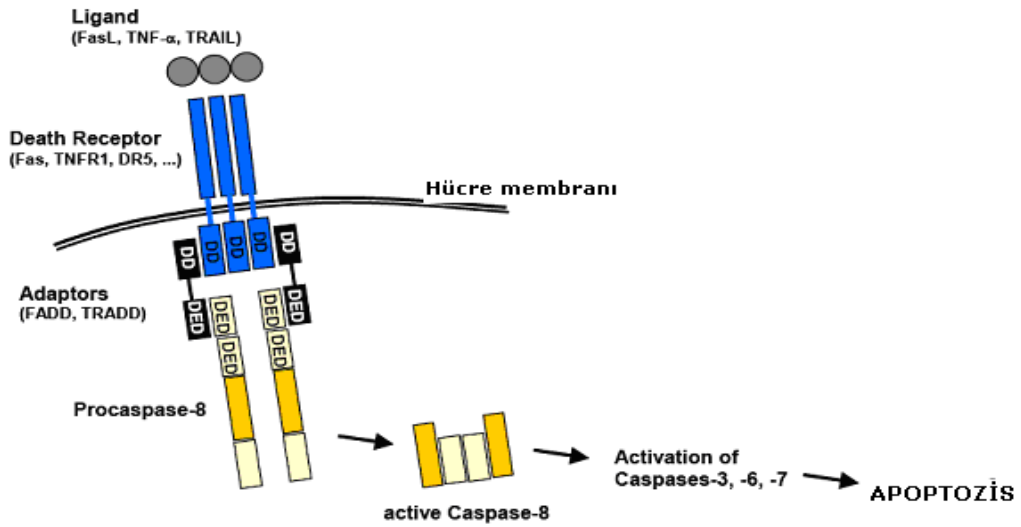
Şekil 2.19. İntrensek ve ekstrensek sinyal yolu tetikleyicileri.

1) Ekstrensek Sinyal Yolu

Fas Ligand (FasL) ve TNF

Hüresel düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligand (FasL) ve Tümör nekrozis faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir. Sitokinler protein yapısında olup hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eder. Sitokinler, yapısal özelliklerine göre; sitokin bağımlı büyüme faktörü, TNF ve helikal sitokinler olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. Önemli bir apoptotik faktör olan Fas Ligand (FasL), TNF ailesinin bir üyesidir (138). TNF, hedef hücredeki TNFR-1 (Tümör nekrozis faktör reseptör-1) ve TNFR-2 (Tümör nekrozis faktör reseptör-2) adlı reseptörleri ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. FasL, sitotoksik T lenfositlerde (CTL) ve natural killer (NK) hücrelerde bulunur. Hedef hücrede bulunan reseptörü Fas ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. FasL, Tip-II membran proteini gibi sentezlenir. FasL'in N terminali sitoplazmadadır, C terminali ise ekstrasellüler alana doğru

uzanmaktadır (139). Membrana bağlı TNF ve FasL'in metalloproteinaz enzimleri aracılığı ile proteolizi sonucunda membrandan ayrılıp serbest hale geçen formları mevcuttur. Bu serbest formlarına, solubl TNF ve solubl FasL adı verilmektedir (140). Solubl formda bulunan TNF ve FasL'da apoptozisi aktive etmektedir. Ancak membrana bağlı TNF ve FasL'in, spesifik reseptörlerini aktive etmekte solubl formlarından daha etkili oldukları saptanmıştır (141) (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Fas ve TNF ölüm reseptör ve aktivatörleri.

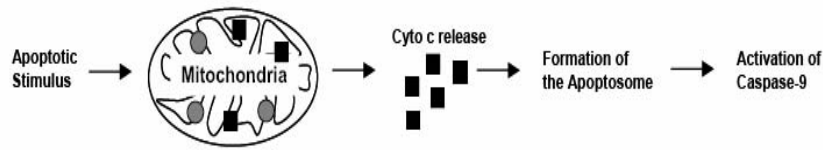
2 İntrensek Sinyal Yolu

a) Mitokondriyal Yolak: Memeli hücrelerinde majör apoptotik sinyal yolu mitokondriyal dir. Radyasyon, toksinler, ısı artışı, çoğu kemoterapötik ajan, tümör supresör genler, DNA hasarında, viral virulans faktör ile intrensek mitokondriyal yolak üzerinden apoptotik sürecin başlamasına neden olurlar (142) (Şekil 2.21).

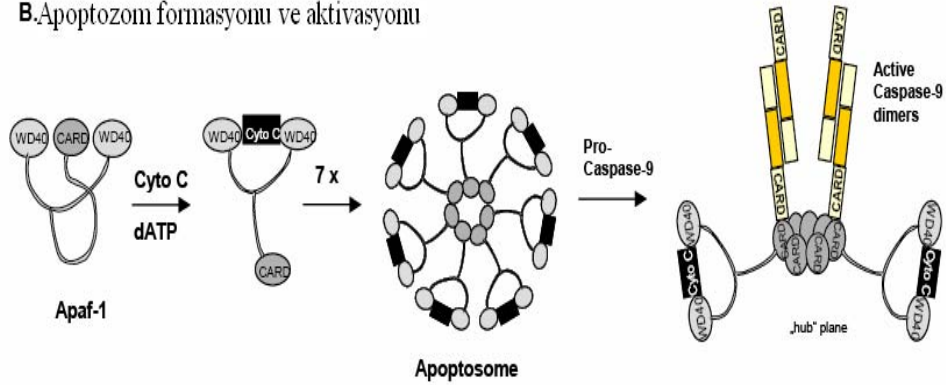
Sitokrom-C mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom-C'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversible bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom-C mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamış bir şekilde

mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (AIF, apoptosis-inducing factor) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom-C sitoplazmik protein olan Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan pro kaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan pro kaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (*ICAD*, *inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease*) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (*CAD*, *caspase-activated deoxyribonuclease*) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (143).

A. Mitokondrial sinyal yolu ve Kaspaz aktivasyonu



B. Apoptozom formasyonu ve aktivasyonu



Şekil 2.21. İntrensek apoptotik sinyal yolu.

b) Endoplazmik Retikulum (ER) Aracılı Apoptozis Oluşturulması: Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (144). Bu yol mitokondriyal/sitokrom-C ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Ca^{++} seviyesinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile pro kaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de pro kaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskatını aktive eder. Son çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir (145).

2.10.4. Apoptozis Sürecini Başlatan Diğer Nedenler

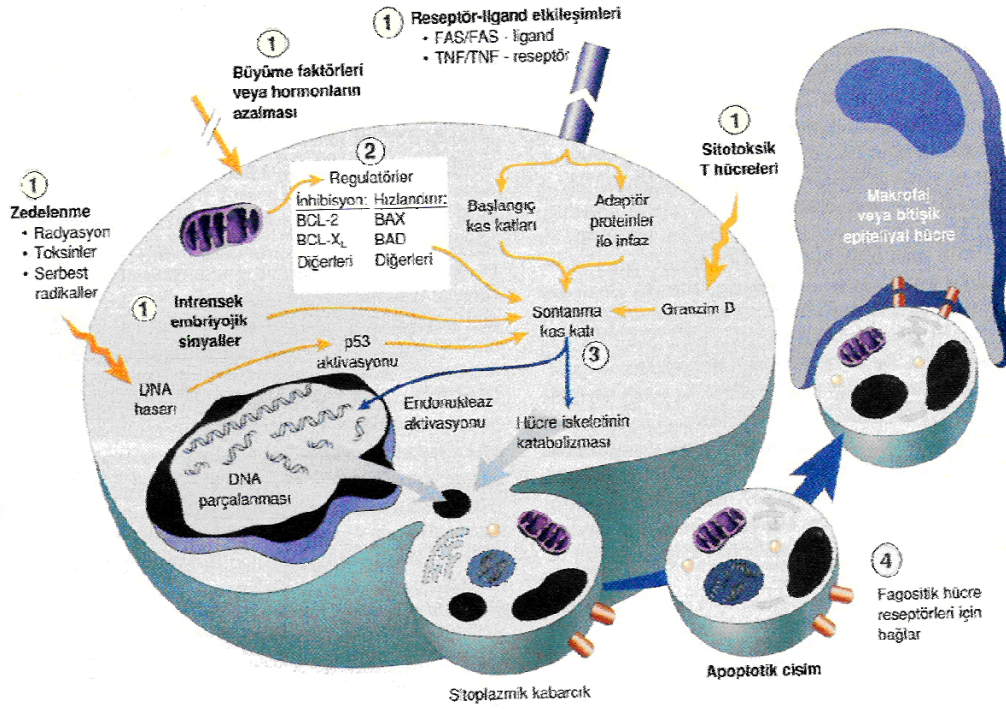
Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53 bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir (146).

Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stres) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir (146).

Apoptozisi büyüme faktörlerinin ortamdan eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığına (serum starvation) maruz bırakılırlarsa apoptozisle ölürlür. Buradaki mekanizma, apoptozis indükleyici bir nükleer protein olan p53 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Ayrıca, bir pro-apoptotik (apoptozis uyarıcı) ve bir bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenmemesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom-C'nin sitoplazmaya salınması yoluyla da gerçekleşir (146).

Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salınan Granzim B'lerin (GrB) hedef hücrede (örneğin virüsle enfekte hücre veya kanser hücresi) kaspaz sistemini aktifleştirmesidir. GranzimB bir serin proteaz

enzimdir. Sitoplazma içine alınan GrB, hem pro-kaspas 10'u hem de pro-kaspas 3 ve pro-kaspas 7'yi aktive eder. Aktive olmuş pro-kaspas 3 bir yandan doğrudan selüler proteolizi başlatırken bir yandan da pro-kaspas 7 üzerinden selüler proteolizi başlatır (Şekil 2.22) (146,147).



Şekil 2.22. Apoptozisteki olayların şematik görünümü.

2.10.5. Apoptozisde Hücre İçi Sinyal İletiminin Regülasyonu

Ca⁺⁺

Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca⁺⁺ apoptoziste de rol oynar. Hücre içindeki Ca⁺⁺ iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptozise götürmektedir. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti organizasyonunda rol alabilirler (127,146).

Kaspazlar (CASPASES): Cysteine dependent Aspartate specific Proteases

Zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu da apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan *Poli ADP-Riboz Polimeraz (PARP)*'ı parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim ICE (interlökin 1-β dönüştürücü enzim)'dir ve prokaspaz 1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom C'nin stoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom-C'nin salıverilmesine neden olabilirler (148,149).

Kaspazların aktivasyonu; İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan Apaf'nin oligomerize olmak üzere indüklenmesiyle gerçekleşir. Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom-C'nin mitokondriden salıverilmesi ile gerçekleşir. Apaf -1'in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin bir araya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9 kaspaz-3'ü aktifleştirir. Mitokondriden ayrıca AİF (apoptozis indükleyici faktör) salıverilir. Bunlar bilinmeyen bazı nükleazları aktive ederek DNA'nın degraşyonuna yol açarlar. Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Kaspazların uyarılması ile hücrelerde proteoliz başlatılır (148,149).

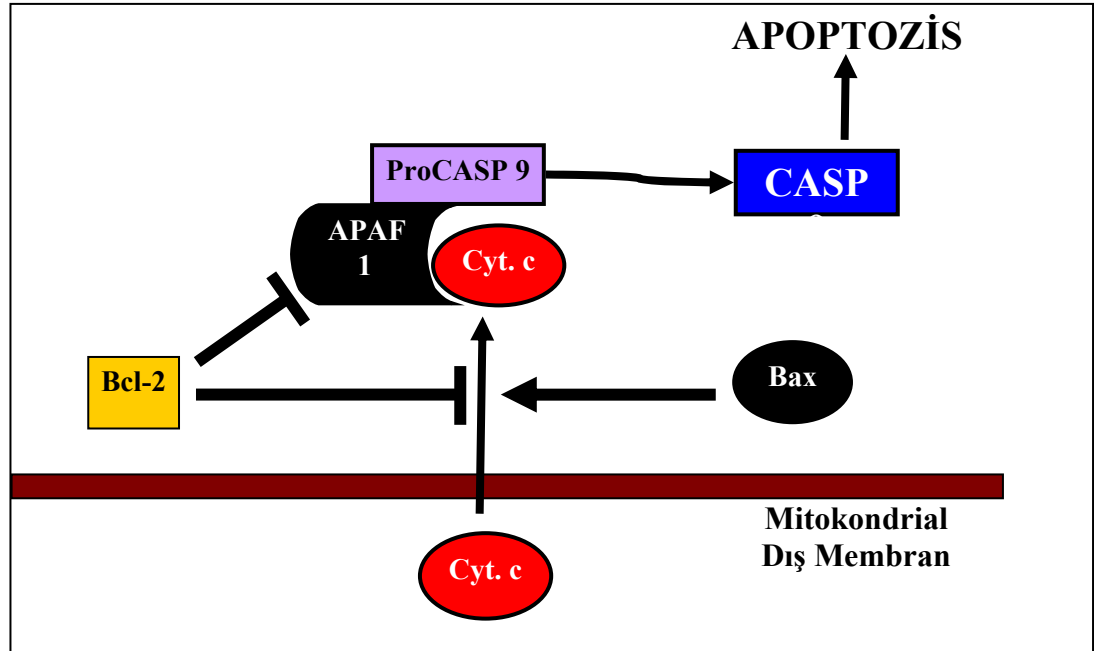
Mitokondri

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu nedenle mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom-C'nin mitokondriden stoplazmaya salıverilmesi) apoptotik süreçte irreversible basamaktır. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir.

Bcl-2 ailesi

Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2 normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır.

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik yani apoptozisi indükleyici (Bax, Bad, Bid, v.b.), etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı (Bcl-2, Bcl-X1) etkiye sahiptir (Tablo 2.2). Pro-apoptotik olanlar, sitokrom-C'nin mitokondriden stoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom-C salıverilmesini baskırlar. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler "pore" oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom-C ve apoptozis indükleyici faktör olarak bilinen AIF'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar (146) (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Bax/ Bcl-2'nin etki mekanizması.

Tablo 2.2. Bcl-2 ailesi.

Bcl-2 Ailesi	
Apoptozisi Baskılayanlar	Apoptozisi İndükleyenler
1.Bcl-2	1.Bad
2.Bcl-xL	2.Bax
3.BHRL-1	3.Bak
4.Bcl-w	4.Bcl-xs
5.Bfl-1	5.Bik
6.Brag-1	6.Hrk-1
7.Mcl 1	

2.10.6. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Coenorhabditis elegans isimli bir nematod ile yapılan çalışmalar sonucunda görülmüştür ki her hücre hayatta kalabilmek için ölümü engelleyici mesaj (Egl-1) yollayabileceği gibi ölümü başlatıcı mesaj da yollayabilir (Ces-1 ve Ces-2). Apoptotik sinyal yandaki hücreden gelebileceği gibi hücrenin kendinden de gelebilir (146,150).

Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53, Rb (retinoblastoma) ve bcl-2 ailesi (bcl-2, bax ve bcl-x) olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır (150,151).

2.10.7. Apoptozisin Görüldüğü Olaylar

Bazı organların biyolojik gelişimleri esnasında apoptozise rastlamak mümkündür. Örnek olarak, Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı iç organların lümenlerinin oluşması gösterilebilir (122). Apoptozis ayrıca her türlü neoplastik oluşumda hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir (124). Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir (122). Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır (123). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (127).

Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar;

1. Fizyolojik Olaylar

a- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı (fetus implantasyonu, organogenezis ve gelişim sürecinde yaşanan involüsyonu).

b- Erişkinde hormona bağımlı involüsyon (menstrüel siklusta endometriyum hücrelerinin yıkımı, menopozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu).

c- Sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi amacı ile hücre azaltılması (barsak kripta epitelleri)

d- İmmun hücrelerin seçimi (hem B hem de T hücrelerinin sitokin deplezyonundan sonra ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması) .

2. Patolojik Olaylar

a- Tümörlerde hücre ölümü (hem büyüme hem de regresyon aşamasında).

b- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofi (kastasyon sonrası prostat atrofisi, glukokortikoid kullanımı sonrası timusta lenfosit kaybı) (126).

c- Parankimden zengin dokularda duktus tıkanmasından sonra patolojik atrofi (pankreas ve böbrek tübüllerinde olduğu gibi) .

d- Sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (otoimmün hastalıklar) (128).

e- Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, anti kanser ilaçları, hipertermi, hipoksi, travma) (125).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apoptozis yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının kanser, otoimmün bozukluklar, viral enfeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (152) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Apoptozis ile hastalıkların ilişkisi.

<p>Apoptozisin İnhibisyonu ile İlişkili Hastalıklar</p> <p>1-Kanserler: Foliküler lenfoma P53 mutasyonları ile oluşan karsinomlar, Hormon bağımlı tümörler, Akciğer kanseri, Prostat kanseri, Over kanseri</p> <p>2- Otoimmün bozukluklar: Sistemik lupus eritamatozus, İmmün ilişkili glomerulonefritler, Otoimmün diabet, Greft rejeksiyonu</p> <p>3- Viral infeksiyonlar: Herpes virüs, Poliovirus, Adenovirus</p>
<p>Apoptozisin Aktivasyonu İle İlişkili Hastalıklar</p> <p>1- AIDS</p> <p>2- Nörodejeneratif hastalıklar: Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz, Retinitis pigmentosa, Serebellar dejenerasyon</p> <p>3- Miyelodisplazik sendromlar: Aplastik anemi</p> <p>4- İskemik hasarlar: Myokard infarktüsü, İnme, Reperfüzyon hasarı</p> <p>5- Toksik nedenli karaciğer hasarı</p>

2.10.8. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn: aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in

kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler;

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. Immunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmünolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

1.Morfolojik görüntüleme yöntemleri

I. Işık mikroskobu kullanımı:

- A. Hematoksilen-Eozin boyama
- B. Giemsa boyama

II. Floresan mikroskobu / Lazerli konfokal mikroskop kullanımı

III. Elektron mikroskobu

IV. Faz kontrast mikroskobu

2. Histokimyasal yöntemler:

I. Anneksin V Yöntemi

II. TUNEL Yöntemi:

TUNEL; Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling kelimelerinin kısaltmasıdır.

Apoptotik hücelere ait DNA'lar hızla parçalanarak, birdenbire hücre içerisindeki kromatin ağ, bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir. Hücrede terminal deoxynucleotidyl transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin dUTP'yi, parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına transfer eder. Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları ortama FITC gibi floresans veren bir madde ile bağlanmış avidin eklendiğinde görünür hale gelirler. Bu yöntem tek tek hücrelerde insitu apoptozisi gösterebildiği için hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir. Kan hücreleri gibi sayıca çok olan hücrelerde kantitatif sonuçlar elde etmek için, aynı TUNEL tekniği flow-Cytometry'ye uygulanabilmektedir. Tek farkı floresans okuma sisteminin flow-Cytometry'de olmasıdır (146).

III. M30 Yöntemi

IV. Kaspaz-3 Yöntemi

3. Biyokimyasal Yöntemler

L. Agaroz Jel Elektroforezi

II. "Western" Blotting

III. "Flow" Sitometri

4. İmmünolojik Yöntemler

L. ELISA

II. Flourimetrik Yöntem

5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

I. DNA Microarrays

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamızda yaşları 5–6 aylık olan ve 200 - 250 gr ağırlığında, toplam 32 adet dişi Sprague Dawley türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıbbi Cerrahi Araştırma Merkezi (TICAM) tarafından sağlandı. Hayvanlara yapılacak uygulamalar için ESOĞÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 13.05.2009 tarihli, 19 sayılı ve 111 karar numaralı kurul onayı alındı.

Sıçanlar deney süresince 12 saat aydınlık/karanlık ışıklandırması olan, ısısı $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ve nemi $\%55\pm 5$ olarak ayarlanmış ortamda yaşatıldı. Hayvanlar deneye başlamadan 1 hafta önce polikarbon şeffaf kafeslere konularak ortam koşullarına adaptasyonları sağlandı. Yiyecek ve su ihtiyaçları sınırsız ve günlük olarak sağlandı ve kontrol edildi. Sağlık durumları ve besin ihtiyaçları günlük olarak temin edildi. Her grupta 8 rat olacak şekilde kontrol, sham ve 2 ayrı tedavi deney gubu oluşturuldu.

3.1. Kimyasal Maddeler ve Uygulamaları

Deneyde kimyasal maddeler olarak dimetilsülfoksit (DMSO), alfa lipoik asid (ALA) ve Silymarin kullanıldı. Gruplara ALA ve silymarin DMSO içinde çözdürülerek 1 ay boyunca intraperitoneal (i.p.) olarak verildi. Dozların miktarları ön çalışma ile belirlendi. Her bir hayvan için ayrı enjektörler kullanıldı ve enjeksiyonlar her gün aynı saatte (10 -12 arasında) yapıldı.

3.2. Deney Grupları

Araştırmamızda sıçanlar rasgele seçilerek her grupta 8'er hayvan bulunacak şekilde toplam 4 grup oluşturuldu;

Grup 1: Kontrol grubu (n=8).

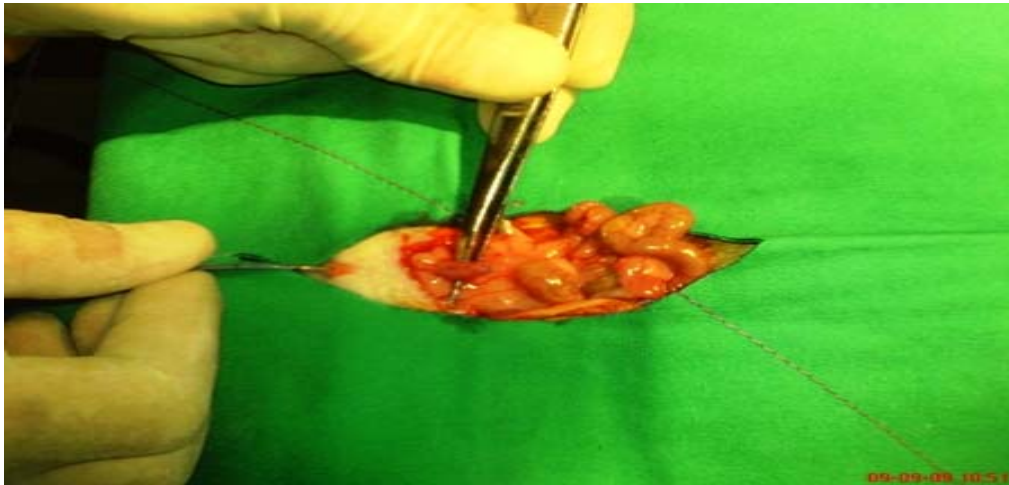
Grup 2: Sham grubu (mesane çıkım obstrüksiyonu oluşturuldu). Bu gruptaki hayvanlara sadece DMSO (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) 0,02 ml i.p. olarak verildi (n=8).

Grup 3: Mesane çıkım obstrüksiyonu (MÇO) + Alfa Lipoik Asid (ALA) grup (n=8). Bu gruptaki hayvanlara 100mg/kg ALA (T5625-5G, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) DMSO içinde çözdürülerek 0,02 ml i.p. olarak verildi (153).

Grup 4: MÇO + Silymarin grup (n=8). Bu gruptaki hayvanlara 25 mg/kg silymarin (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) DMSO içinde çözdürülerek 0,02 ml i.p. olarak verildi (154).

3.3. Deney Protokolü

Ratlar 12 saatlik açlığı takiben Ketamine Hcl (*Ketalar 500mg enjektabel flakon, Pfizer*) 75mg/kg. intraperitoneal ve Xylazine (*Rompun, Bayer*) 15mg/kg. intraperitoneal enjeksiyon ile anestezi protokolü uygulanarak genel anestezi sağlandı. Ratlar anestezi sonrası supin pozisyonunda operasyon masasına alınarak cerrahi kesi yapılacak alan traş edildikten sonra povidon iyod ile temizlendi, alt abdominal suprapubik median laparotomi uygulandı.



Şekil 3.1. Rat üretrasından 1,2 mm çapında kateter yerleştirildikten sonra mesane ve mesane boynunun ortaya konulması.

Grup 1: Kontrol Grubu

Bu gruptaki ratlara alt abdominal suprapubik median laparotomi uygulandıktan hemen sonra mesaneye ulaşıldı hiçbir işlem yapılmadan 3/0 ipek ile batın katları steril olarak tekrar kapatıldı ve povidon iyod ile pansumanı yapıldı.

Grup 2: Sham Grubu

Bu gruptaki ratlara öncelikle üretral yoldan mesaneye ulaşarak 1,2mm çapında kateter yerleştirildi. Daha sonra kontrol grubundaki gibi suprapubik insizyonla batin açılıp mesaneye ulaşıldıktan sonra mesane boynu açığa çıkarıldı vezikoüretral bileşkeden 3/0 ipek sütür mesane boynuna yerleştirildi. Önceden kateter yerleştirilen üretra 3/0 ipekle mesane boynunun hemen distalinde bağlanarak kateter çıkarıldı ve mesane çıkım obstrüksiyonu oluşturuldu. Batin ön duvarı ve cilt tam kat 3/0 ipek sütür ile kapatılarak povidon iyod ile pansumanı yapıldı.

Grup 3: Alfa Lipoik Asid + Mesane Çıkım Obstrüksiyonu Oluşturulan Grup

Bu gruptaki ratlara da yine sham grubundaki gibi cerrahi prosedürler uygulanarak mesane çıkım obstrüksiyonu oluşturulduktan sonra 4 hafta boyunca günlük alfa lipoik asid 100mg/kg intraperitoneal enjeksiyon olarak uygulandı.

Grup 4: Silymarin + Mesane Çıkım Obstrüksiyonu Oluşturulan Grup

Bu gruptaki ratlara da yine sham grubundaki gibi cerrahi prosedürler uygulanarak mesane çıkım obstrüksiyonu oluşturulduktan sonra 4 hafta boyunca günlük silymarin 25mg/kg intraperitoneal enjeksiyon olarak uygulandı.

Deney sonunda Tüm ratlar 12 saatlik açlığı takiben Ketamine (75mg/kg, intraperiton) ve Xylazine (15mg/kg, intraperiton) anestezi protokolü kullanılarak genel anestezi uygulandı. Alt abdominal suprapubik median laparotomi ile hızlıca mesaneye ulaşıldıktan sonra mesane dokusu, üretrovezikal bileşkeden ipek sütürle bağlanan kesimin proksimalinden mesane boynu kesilerek dışarı alındı. Kan örnekleri ise hızlı bir şekilde enjektörle intrakardiyak olarak alındı. Deney sonunda ratlardan yüksek miktarda kan alınarak hayatlarına son verildi. Mesane ağırlıkları tartıldı ve daha sonra mesane kubbeden mesane boynuna doğru olacak şekilde üç eşit parçaya kesildi. Histolojik inceleme için mesane 1/3'lük kısmı, Tip 1 ve 3 kollajen, apoptozis ve kollagen-detrüsör kas oranı parametrelerindeki değişimi ortaya koymak için alındı. Bu aşamada alınan örnekler Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki iki öğretim elemanı tarafından direk mikroskopi, immün boyama ve TUNEL gibi yöntemler kullanılarak değerlendirildi. Mesane dokusunun 1/3'lük kısmı ve kan örnekleri biyokimyasal parametrelerin çalışılması için alındı. Biyokimya Anabilim

Dalı tarafından mesane dokusu ve serumda MDA (Malonil Dialdehit), İL-6 ve TNF- α gibi iskemi-reperfüzyon parametreleri çalışıldı. Fizyoloji Anabilim Dalı tarafından mesane dokusunun kalan 1/3 kısmında iNOS gen ekspresyonu real-time PCR ile değerlendirildi. Tüm sonuçlar daha sonra Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.4. Histolojik İnceleme

Mesane ağırlıkları hassas terazide dikkatli bir şekilde tartıldı. Mesane tartım işleminden sonra bir kısım doku formaldehit fiksatifine alındı. İşlemler organların otoliz olmaması için hızlı bir şekilde yapıldı. Fiksasyon işleminden sonra alınan dokulara uygun takip işlemi yapılarak parafin blokları hazırlandı.

Parafin blokları hazırlanan dokuların her birinden 5 μ m kalınlığındaki seri kesitler alındı. Kesitlerde genel yapı özelliklerini belirlemek için /hematoksin ve eozin(H&E), düz kas/kollajen lif oranının tespiti için Masson'un trikrom boyası uygulandı. Ayrıca apoptoz tespiti için TUNEL ile kollajen tipleri belirlemek için kollajen tip 1 ve tip 3 boyası yapıldı. Mesane örneklerinde düz kas / kollajen oranı BAB Bs 200 ProP image analiz sistemiyle belirlendi. Bu sistemde Masson'un trikrom boyasıyla uygulanan mesane kesitlerinde X40 büyütme ile pembe-kırmızı boyalı düz kas alanıyla mavi-yeşil boyalı kollajen lif alanının yüzdeleri hesaplandı.

TUNEL için hazırlanan her preparat tek histolog tarafından DP70 Kamera takılı Olympos PM10ADS foto mikroskoptan oküler mikrometrisi yardımıyla X40 büyütme ile 10 kesitte 25 alanda apoptotik hücreler sayılarak değerlendirilmiştir.

3.4.1. Mesane İçin Uygulanan Doku Takibi

- Dokular önce 18-24 saat süreyle nötral formalinde fikse edildi. Daha sonra aşağıda belirtildiği şekilde artan alkol derecelerinden geçirildi.
- 30°'lik alkol : 1 saat
- 70°'lik alkol : 30 dk.
- 80°'lik alkol : 30 dk

3.4.4. İmmünohistokimya

TUNEL Boyama Yöntemi

Kullanılan kit: Apoptag plus peroxidase in situ apoptosis detection kit (S7101- Chemicon international) kullanıldı.

Kollagen Tip 1

Bu boyama yapılırken tüm basamaklarda kesitler oda ısısında, nemli ve karanlık bir ortamda gerçekleştirildi. İmmunohistokimyasal boyama için Primar antikör collagen tıp 1 (abcam ab292 rabbit polyclonal) kullanıldı.

Kollagen Tip 3

Bu boyama yapılırken tüm basamaklarda kesitler oda ısısında, nemli ve karanlık bir ortamda gerçekleştirildi. İmmunohistokimyasal boyama için Primar antikör collagen tıp 3 (abcam ab6310 mouse monoclonal) kullanıldı.

3.5. Biyokimyasal İnceleme

3.5.1. Serum ve Doku Malondialdehid (MDA) Düzeylerinin Belirlenmesi

MDA düzeyleri Ohkawa ve arkadaşlarının MDA' nın asit ortamda thiobarbitürik asitle (2- Thiobarbituric acid, Merck kGaA 64271, Darmstad, Germany) oluşturduğu rengin 532 nm' de absorbansının ölçülmesi prensibine dayanan yöntemin uygulanması ile manuel olarak çalışıldı.

3.5.2. Rat İnterlökin-6 (IL-6) Düzeylerinin Belirlenmesi

Rat doku ve serum IL-6 konsantrasyonları, Rat IL-6 Platinum (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Cat. Nr. BMS625) ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) test kitiyle kantitatif olarak belirlendi. ELISA test kitinin üretici tarafından belirlenmiş analitik duyarlılığı 12pg/ml'dir. Kitin ölçüm için

kesinlik göstergesi olarak değişkenlik/değişim katsayısı –CV (%) (coefficient of variation) değeri %5.0 ölçümler arası kesinlik göstergesi olarak CV(%) değeri ise %10'dur.

3.5.3. Rat Tümör Nekrozis Faktör-Alfa (TNF- α) Düzeylerinin Belirlenmesi

Rat doku ve serum TNF- α konsantrasyonları, Rat TNF- α Platinum (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Cat. Nr. BMS622) ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) test kitiyle kantitatif olarak belirlendi. ELISA test kitinin üretici tarafından belirlenmiş analitik duyarlılığı 11.2pg/ml'dir. Kitin ölçüm için kesinlik göstergesi olarak değişkenlik/değişim katsayısı –CV (%) (coefficient of variation) değeri %5, ölçümler arası kesinlik göstergesi olarak CV (%) değeri ise %10'dur.

3.6. Fizyolojik İnceleme

3.6.1. Real Time-PCR (RT-PCR) Tekniği İle iNOS Tayini

Deney süresi sona erdiğinde her bir gruba ait sıçanlardan mesane dokusu hızlı bir şekilde çıkarıldı. Real-Time PCR çalışmaları için dokular RNA later solüsyonu (Qiagen, Manheim, Germany) içinde muhafaza edildi.

3.6.2. RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu için RNA easy mini kit 50 ve cDNA sentezi için QuantiTect Reverse Transcription cDNA kiti (Qiagen, Manheim, Germany) kullanılmıştır.

1. Mesane dokusu eppendorf tüp içerisine alındı ve tüm dokuyu kaplayacak şekilde RNA Later stabilizasyon solüsyonu ilave edildi. Doku içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacı ile 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra -20°C'de muhafaza edildi.
2. Dokular RNA later içerisinden çıkartılarak 600 μ l Buffer RLT+6 μ l β -mercaptoethanol (β -ME) çözeltisi ile birlikte içerisinde 1 adet steril çelik bilye

bulunan plastik tüplere konuldu ve bir homojenizasyon cihazı (Tissue Lyser) ile 2 dakika 30 Hz olacak şekilde homojenize edildi.

3. Homojenizasyon işleminden sonra süpernatant yeni bir ependorf tüp içerisine alındı ve 3 dakika 13.000 rpm devirde santrifüj edildi.

4. Santrifüjden sonra süpernatant yeni bir eppendorf tüpe alındı ve üzerine 600 µl %70'lik etanol eklendi. Daha sonra pipetle dikkatli bir şekilde karıştırıldı.

5. Ependorf tüpü içerisindeki süpernatantın 700 µl'si kolonlara (RNeasy mini spin colon 2 ml) yüklendi. Daha sonra 20 saniye 8.000 g de santrifüj edildi ve alttaki toplama tüpünde kalan süzüntü döküldü. Süpernatantın geri kalanı tekrar kolonlara yüklendi ve yeniden 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

6. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpü değiştirildi kolonlara (RNeasy mini spin colon) 700 µl Buffer RW1 eklendi. Böylece kolon istenmeyen parçalardan temizlenmiş oldu. Sonra 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

7. Alttaki toplama tüpü döküldü ve kolon üzerine 500 µl Buffer RPE eklenip 20 saniye 8.000 g devirde santrifüj edildi.

8. Aynı işlem tekrarlanarak 2 dakika 8.000 g devirde santrifüj edildi.

9. Alttaki toplama tüpü döküldü ve kuruması için 1 dakika en yüksek hızda santrifüj edildi.

10. Alttaki toplama tüpü atıldı ve kolon yeni temiz ependorf tüpü içerisine yerleştirildikten sonra üzerine 40µl RNase Free Water tam orta kısma gelecek şekilde dikkatlice eklendi ve 1 dakika 8.000 g devirde santrifüj edildi.

11. Ependorf tüpü içerisinde elde edilen RNA -80° C de saklandı.

3.6.3. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla 1 µl RNA nanometrede (Thermo Scientific, Nanodrop 1000, USA) 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı.

3.6.4. cDNA Sentezi

Önce genomik DNA(gDNA) uzaklaştırmak için tablo 3.1'de gösterildiği gibi toplam hacim 14 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve Thermal Cycler PCR' da

(Qiagen, Manheim, Germany) 42°C da 2 dk olacak şekilde programlanıp gDNA uzaklaştırıldı.

Tablo 3.1. gDNA uzaklaştırmak için reaksiyon hazırlanması.

Karışım	Miktar (µl)
gDNA wipeout	2
Örnek RNA'sı	X
RNAase free water	12- X
Toplam	14

gDNA'sı uzaklaştırılmış örnekler, tablo 3.2'de gösterilen oranlarda hazırlanan karışımdan 6 µl eklenerek Thermal Cycler PCR' da 42 °C da 15 dk ve 4°C da 10 dk olacak şekilde programlanıp cDNA oluşturuldu.

Tablo 3.2. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.

Karışım	Miktar(µl)
Quantiscrypt Reverse Transcriptase	1
Quantiscrypt RT Buffer 5X	4
RT primer mix	1

Thermal cyclers koşulları;

42 °C' da 15 dk

4° C'de 10 dk

RT- PCR

iNOS (hedef gen) ve GAPDH (referans gen) mRNA düzeyleri, Dual Label (Taqman prob) kullanılarak Real Time PCR Rotor Gene 6000 (Qiagen, Manheim,

Germany) ile ölçüldü. RT-PCR için tablo 3.3'deki karışım hazırlanıp reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.3. RT PCR için miks içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
Reconstituted primer /probe miks (iNOS veya GAPDH)	1
2X qPCR Mastermiks	10
PCR-Grade water	4
cDNA	5
Toplam	20

Toplam 20 µl RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi:

95° C'de	10 dk	} 50 döngü
95° C'de	20 sn	
55° C'de	30 sn	
72° C'de	20 sn	

Çalışmanın sonuçları Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 kullanılarak analiz edildi.

3.6.5. Primer Dizilerinin Hazırlanması

iNOS (hedef gen) ve GAPDH (referans gen) primer dizileri Gene Research laboratories (PrimerDesign, U.K) tarafından dizayn edildi. NCBI Gene veritabanı erişim numaraları ve ampikon uzunlukları tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan iNOS primerinin dizileri, Tm dereceleri.

Gen	No		Oligonükleotid Dizisi	Tm
iNOS	NM_012611	Sense	CACCACCCTCCTTGTTCAAC	56,7
		Anti-Sense	CAATCCACAACCTCGCTCCAA	56,5

3.6.6. RT- PCR Ürünlerinin Jel Elektrofrez ile İncelenmesi

Real-Time PCR reaksiyonu sonrası amplifikasyon ürünlerinin sadece hedef gene (iNOS) özgü olup olmadığını tespit etmek amacıyla % 1.5 agaroz jel (1×TBE içerisinde) hazırlanarak (5 µl Ethidium Bromide eklendi) jelde yürütüldü. 10 µl üründen alınıp, üzerine 2 µl yükleme boyasından konarak karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi ve 100 volta yürütüldü. Elektrofrez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme ve dökümantasyon sistemi ile incelenerek görüntüsü alındı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Her gruptan birer örnek olmak üzere seçilmiş PCR ürünlerinin jel görüntüsü. Sırasıyla 1. kuyucuk marker, kontrol, silymarin, sham, ALA.

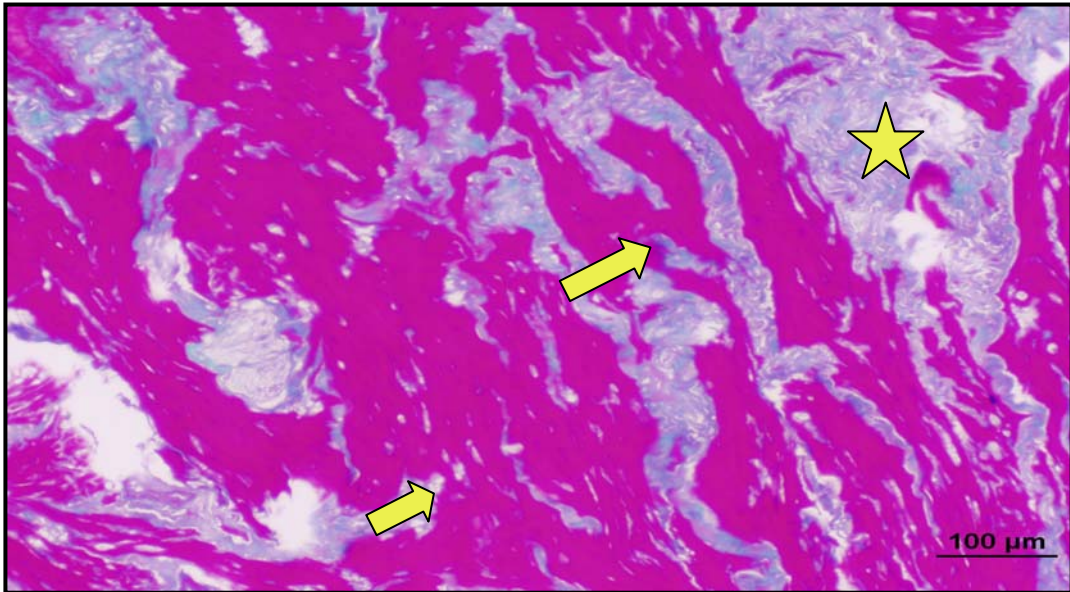
3.7. İstatiksel İnceleme

Çalışmamızdaki tüm veri analizleri için SPSS 15.0 ve SigmaStat 3.1 paket programları kullanıldı. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak, nitel veriler ise n ve oran olarak ifade edildi. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren sürekli veriler, grup sayısına bağlı olarak, One Way Anova. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım göstermeyen değişkenlere ise grup sayılarına bağlı olarak Kruskal-Wallis testi ile analiz edildi, ayrıca değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile Correlations analizinden yararlanıldı. $P < 0.05$ olasılık değerleri önemli olarak kabul edildi.

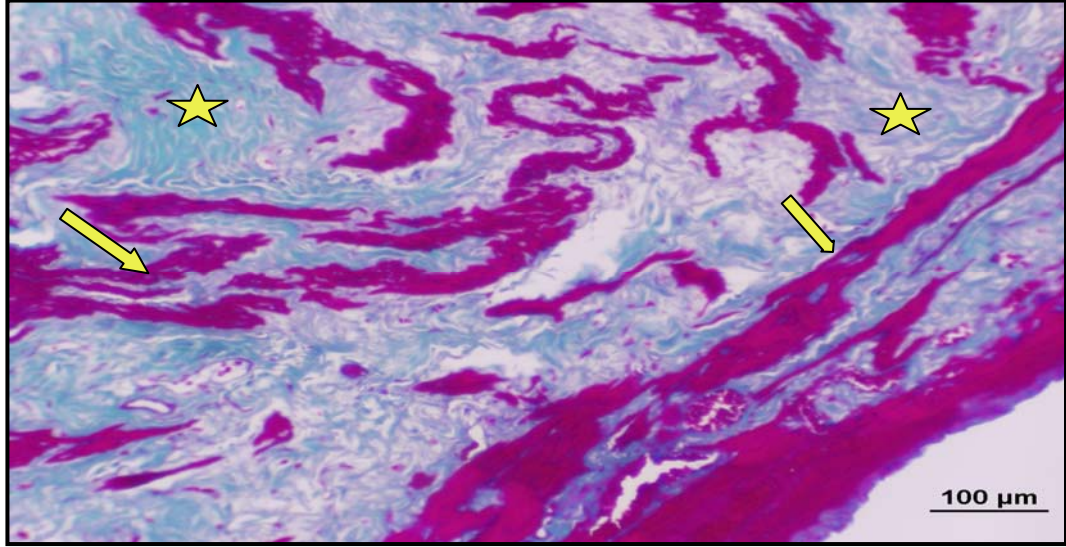
4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait mesane kesitlerinde lümeden itibaren tunika mukozayı oluşturan çok katlı değişici epitel ve altında gevşek bağ doku tabakası olan lamina proprianın yer aldığı gözlemlendi. Tunika muskularis tabakasında düz kas demetlerinin bağ dokusu ile kesintiye uğradığı belirlendi. Masson trikrom ile boyanmış kesitlerde düz kas demetleri (pembe-kırmızı renkte boyanmış) ile kollajen liflerin (mavi-yeşil renkte boyanmış) oranının eşit olduğu gözlemlendi. En dışta ise tunika adventisiya gözlemlendi (Şekil 4.1). Dört hafta süre ile MÇO oluşturulan sham grubunda, mesane duvar kalınlığı kontrol grubuna göre artmış olarak görüldü. Epitelde düzensizlik, ayrılmalar ve hafif ödem belirlendi. Düz kas demetlerinin arasında ve tüm katlarda bağ dokusu artışı dikkat çekiciydi. Buna karşın düz kas miktarının azaldığı belirlendi. Ayrıca bağ dokusu elemanlarından fibroblastlarda da artış görüldü (Şekil 4.2).



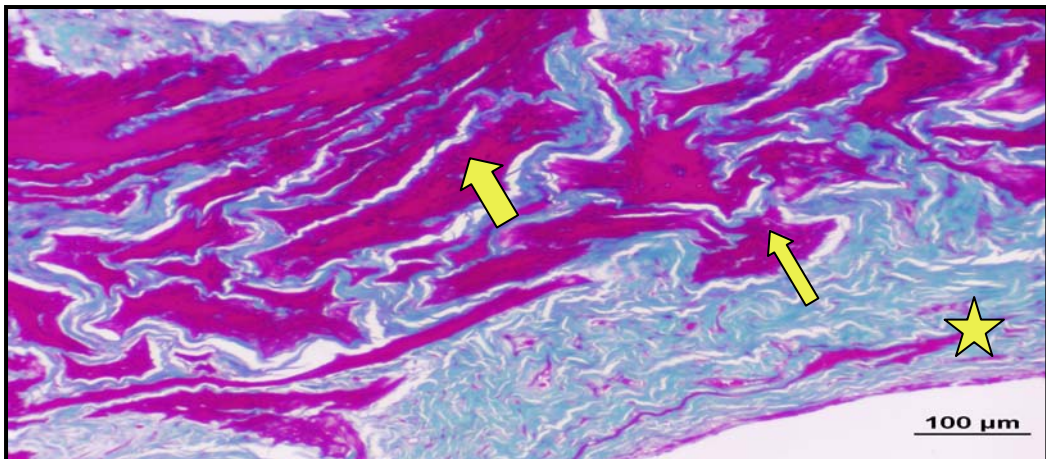
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde pembe-kırmızı renkte (oklar) düz kas demetleri arasında az miktarda mavi yeşil renkte kollajen (yıldız) gözlenmektedir. Masson trikrom, Bar 100 µm.



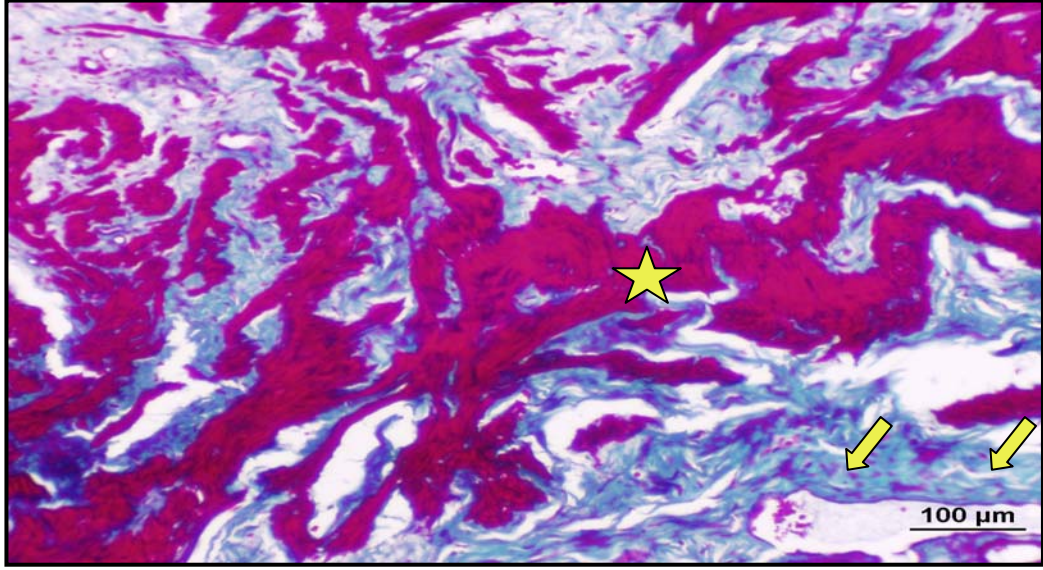
Şekil 4.2. Sham grubuna ait mesane kesitinde düz kas demetlerinin azaldığı (oklar), kollajen liflerinin (yıldız) ise oldukça arttığı gözlenmektedir.

Masson trikrom, Bar 100 μm .

MÇO + Silymarin grubunda, sham grubuyla benzer bulgular olduğu görüldü. Kollajen lifler, düz kas demetleri arasında yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 4.3). MÇO + ALA grubunda ise kontrol grubuyla benzer olarak, kollajen ve düz kas demetleri arasındaki oranın kısmen eşit olduğu belirlendi. Ancak epitelde ödem ve düzensizlik vardı (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. MÇO + Silymarin grubuna ait mesane kesitinde sham grubuna göre kısmen artmış düz kas demetleri arasında (oklar), kollajen lifleri (yıldız) görülmektedir. Masson trikrom, Bar 100 μm .



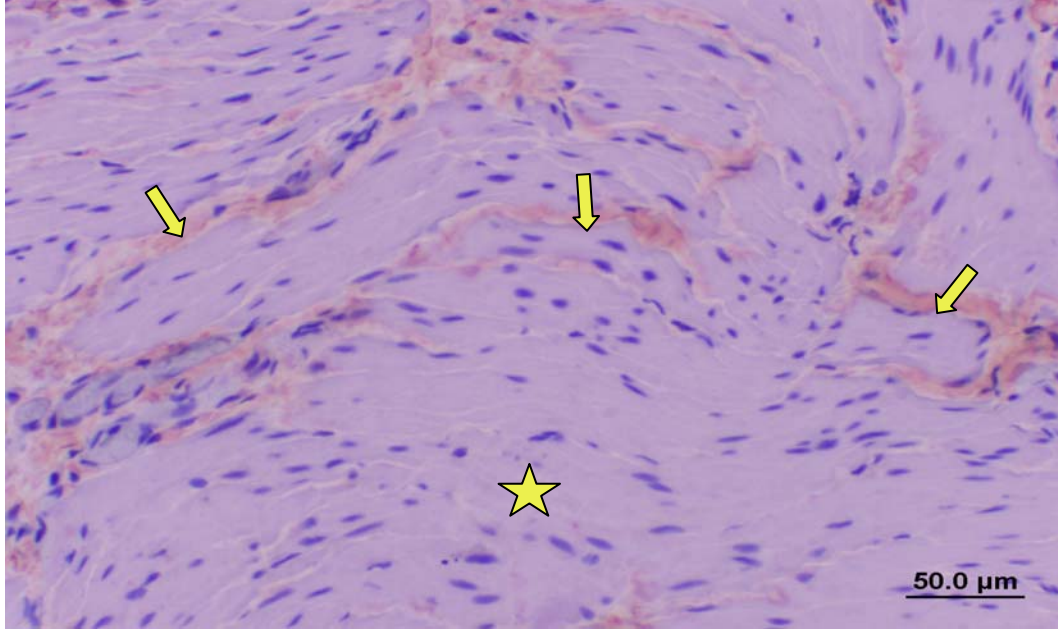
Şekil 4.4. MÇO + ALA grubuna ait mesane kesitinde sham grubuna göre korunmuş düz kas demetleri arasında (yıldız), az miktarda kollajen lifleri (ok) görülmektedir. Masson trikrom, Bar 100 µm.

4.1.1. İmmünohistokimyasal İnceleme

Tip 1 ve Tip 3 Kollajen:

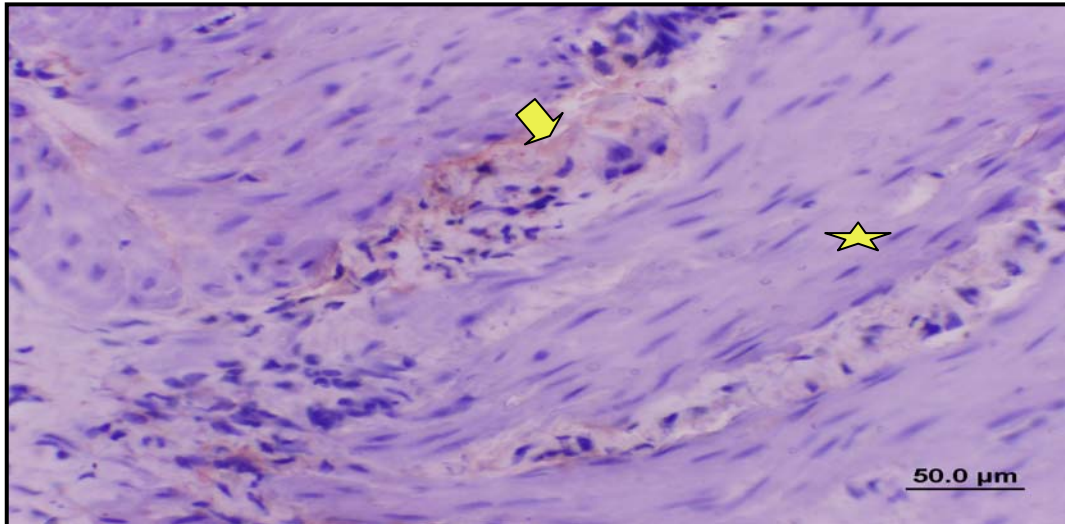
Kollajen tip 1 ve tip 3'ün dağılımı, 2 araştırmacı tarafından kör olarak değerlendirildi. Değerlendirme, boyanma şiddetine göre, hafif boyama (+), orta boyama (++) ve kuvvetli boyama (+++) şeklinde yapıldı (155).

Kontrol grubunda tip 1 kollajen boyanması genel olarak lamina propria tabakasında görüldü (Şekil: 4.5) gözlemlendi.



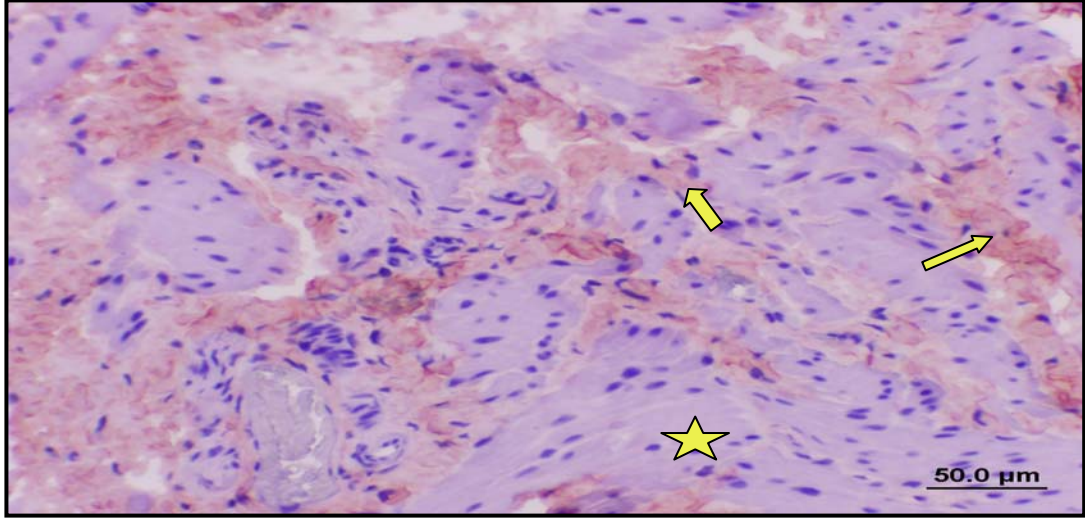
Şekil 4.5. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde düz kas demetleri (yıldız) arasında tip 1 kollajen (oklar) dağılımı gözlenmektedir. Masson trikrom,
Bar 100 μm.

Kontrol grubuna ait kesitlerde tip 3 kollajen boyanması genel olarak lamina propria tabakasında gözlemlendi (Şekil: 4.6).

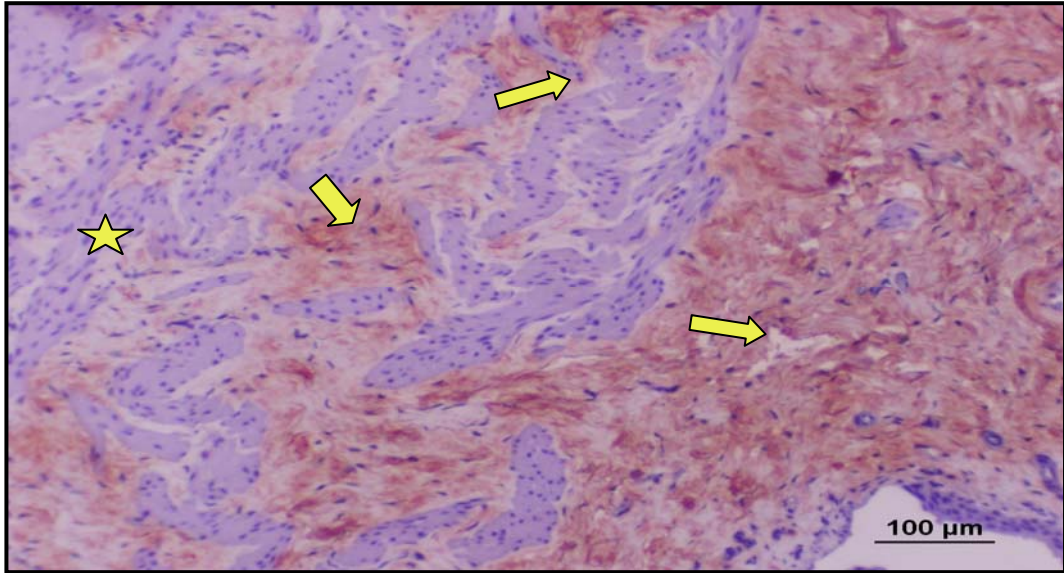


Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde düz kas demetleri (yıldız) arasında tip 3 kollajen (oklar) dağılımı görülmektedir.
Masson trikrom, Bar 100μm.

Tip 3 kollajen, Sham grubunda kontrol grubuna göre oldukça kuvvetli boyandığı gözlendi. Ayrıca sham grubunda tip 3 kollajen, tip 1 kollajene göre de daha kuvvetli boyandığı gözlendi (Şekil: 4.7 ve Şekil: 4.8).



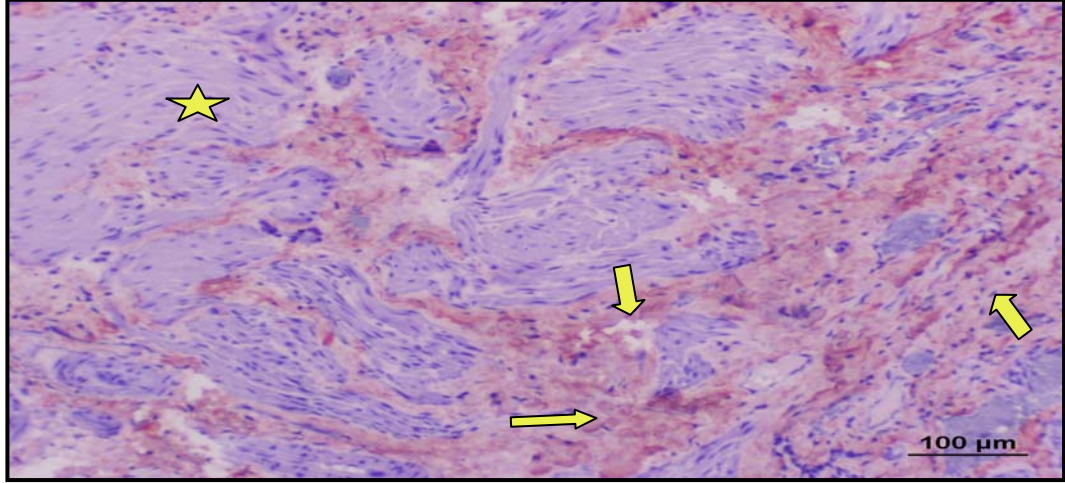
Şekil 4.7. Sham grubuna ait mesane kesitinde tip 1 kollajen dağılımı gözlenmektedir. Düz kas demetleri (yıldız) arasında tip1 kollajen liflerinin (ok) artmış olduğu dikkat çekmektedir. Masson trikrom, Bar 100 µm.



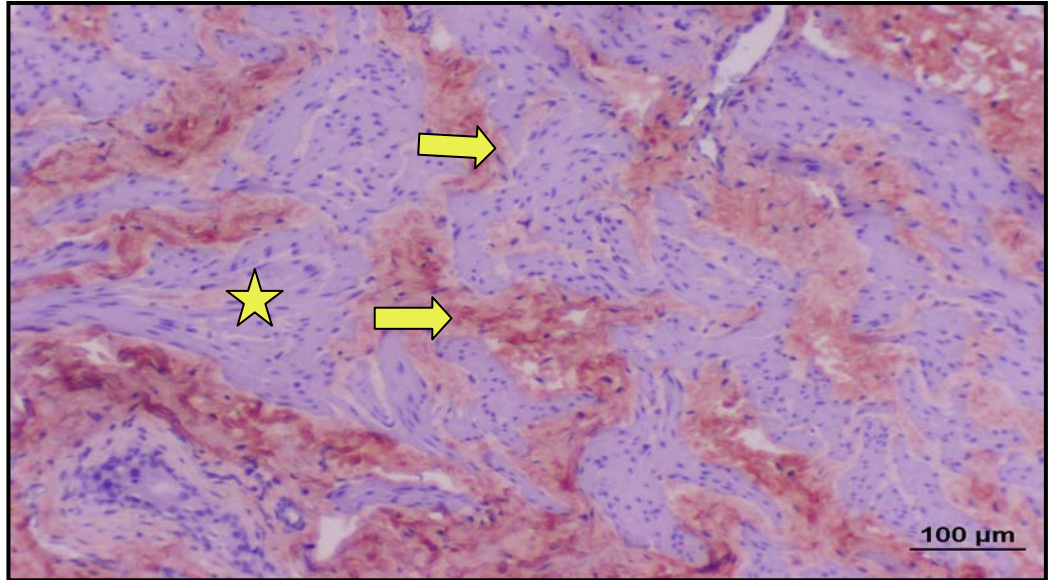
Şekil 4.8. Sham grubuna ait mesane kesitinde düz kaslar (yıldız) arasında oldukça artmış tip 3 kollajen (oklar), dağılımı görülmektedir.

Masson trikrom, Bar 100 µm.

MÇO + silymarin uygulanan grupta sham grubuyla benzer şekilde tip 3 kollajen dağılımı görüldü (Şekil: 4.9 ve Şekil 4.10). Silymarinin tip 3 kollajen artışı önlemede yeterli etkisinin olmadığı görüldü.

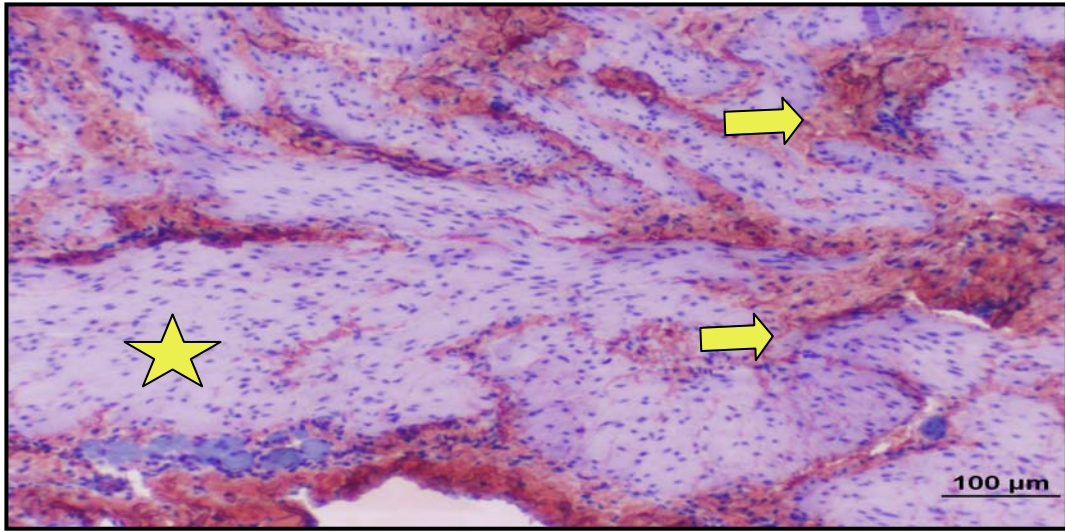


Şekil 4.9. MÇO + Silymarin grubuna ait mesane kesitinde tip 1 kollajen dağılımı gözlenmektedir. Düz kas demetleri (yıldız) arasında, artmış tip1 kollajen (ok) dağılımı dikkat çekmektedir. Masson trikrom, Bar 100 µm.

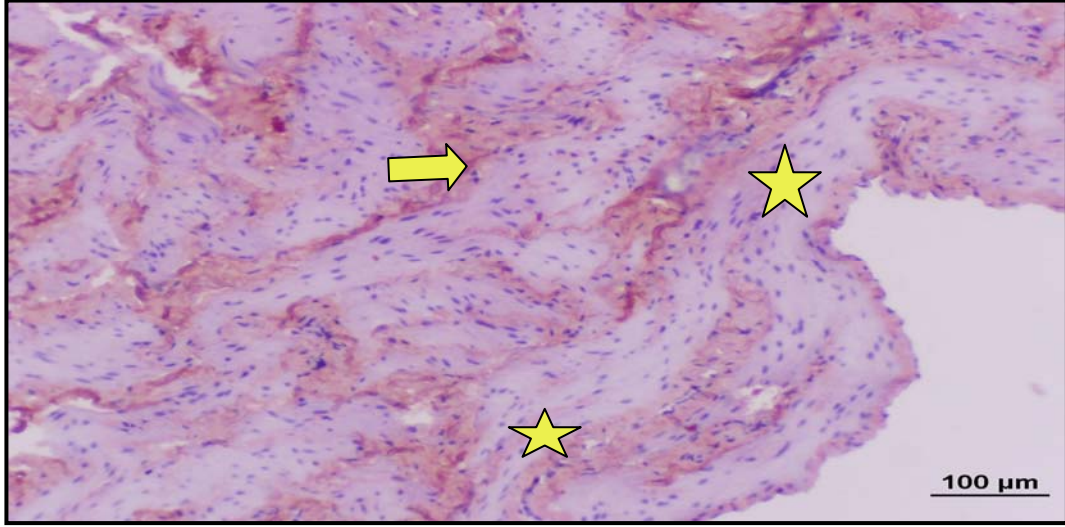


Şekil 4.10. MÇO + Silymarin grubuna ait mesane kesitinde, düz kas lifleri (yıldız) arasında, artmış tip3 kollajen (ok) dağılımı görülmektedir. Masson trikrom, Bar 100 µm.

MÇO + ALA grubunda ise sham grubuna göre daha az tip 1 ve tip 3 kollajen boyanması belirlendi. Özellikle tip 3 kollajen boyanmasının belirgin olarak azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). ALA' nın MÇO' da İ/R hasarını önleyerek mesane ağırlığını ve tip 3 kollajen miktarını azalttığını dolayısıyla mesane fonksiyonlarında bozulmayı engellediğini histolojik inceleme sonucunda görmekteyiz.



Şekil 4.11. MÇO + ALA grubuna ait mesane kesitinde mavi renkte düz kaslar (yıldız) arasında azalmış kahverengi görünümde tip 1 kollajen (ok) dağılımı gözlenmektedir. Tip 1 kollajen boyası, Bar 50 µm.



Şekil 4.12. MÇO + ALA grubuna ait mesane kesitinde düz kas lifleri (yıldız) arasında azalmış tip 3 kollajen (ok) dağılımı gözlenmektedir.

Tip 3 kollajen boyası, Bar 100 μm.

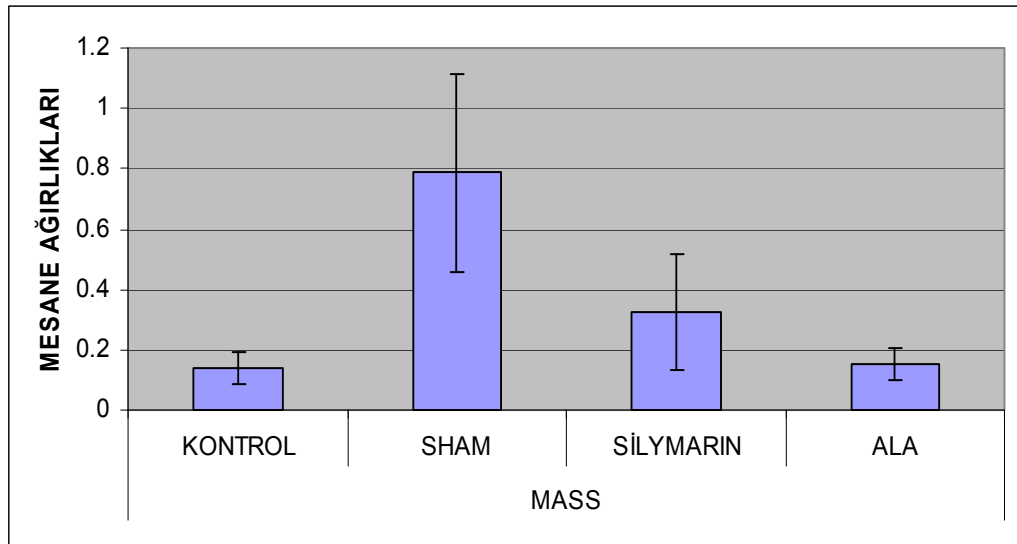
4.1.2. Mesane Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

MÇO' da İ/R hasarına bağlı olarak mesane duvar kalınlığı ve ağırlığı artmaktadır. Kollajen birikimi ve düz kas hipertrofisi mesane ağırlık artışının asıl nedenidir. Sham grubunda, kontrol grubuna göre mesane ağırlığındaki artışın ileri düzeyde önemli farklılık ($p < 0,001$) gösterdiği ve mesane ağırlığının ortalama 6 kat arttığı görüldü. ALA ve Silymarin gruplarında mesane ağırlıklarının korunduğu ve sham grubuna göre bu farkın ileri düzeyde anlamlı olduğu görülmektedir ($p < 0,001$). İstatistiksel ve histolojik olarak ALA' nın silymarine göre mesane ağırlığını korumada daha etkin olduğu tespit edildi (Tablo 4.1 ve Şekil 4.13).

Tablo 4.1. Mesane ağırlıklarının gruplara göre dağılımı (gm).

	Gruplar	N	Mean	Std.	25	Median	75	p
MESANE AĞIRLIKLARI	KONTROL	8	0,13	0,05	0,1	0,1	0,2	p<0.001
	SHAM	8	0,78	0,32	0,6	0,6	1,17	
	SİLYMARIN	8	0,32	0,19	0,2	0,2	0,47	
	ALA	8	0,15	0,05	0,1	0,15	0,2	

Kruskal Wallis



Şekil 4.13. Mesane ağırlıklarının (mass) grafiksel karşılaştırılması (gm).

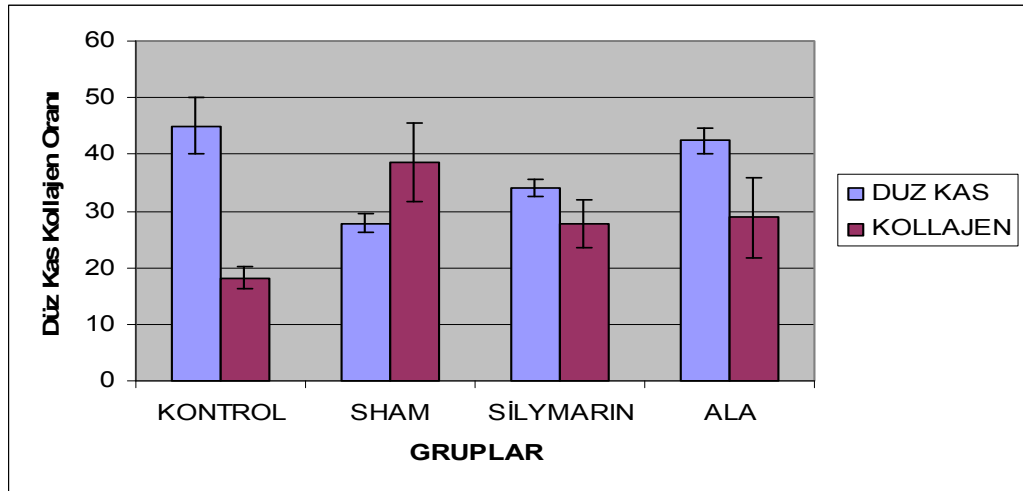
4.1.3. Düz Kas ve Kollajen Oranı

Kontrol grubunda düz kas oranı ortalama % 45 iken MÇO sonrası sham grubunda ortalama %27 olup düz kas oranı azalmıştır. Azalan düz kasın yerine kollajen birikmiştir. Kontrol grubunda ortalama kollajen oranı % 18 iken sham grubunda ortalama % 38'dir. Mesane kasılabilirlik fonksiyonlarının korunması ve devamı açısından düz kas/kollajen oranı önemlidir. ALA ve silymarinin, düz kas yüzdesini koruduğu, kollajen artışını önlediği ve bunun istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı ($p<0,001$) olduğu görülmüştür (Şekil 4.14 ve Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Düz kas ve kollajen oranı (%).

	Gruplar	N	Mean	Std.	25	Median	75	p
**DÜZ KAS	KONTROL	8	45,06	4,91	40,8	44,5	47,2	p<0.001
	SHAM	8	27,86	1,77	26,7	27,0	29,3	
	SİLYMARIN	8	34,03	1,56	33,4	34,7	35,0	
	ALA	8	42,38	2,34	41,2	43,1	43,9	
*KOLLAJEN	KONTROL	8	18,22	2,07	16,6	18,1	20,2	p<0.001
	SHAM	8	38,49	6,98	36,3	41,8	42,2	
	SİLYMARIN	8	27,79	4,20	24,5	25,4	32,4	
	ALA	8	28,86	7,03	22,5	26,4	36,4	

One Way Anova. ** Kruskal Wallis.



Şekil 4.14. Düz kas ve kollajen oranının grafiksel olarak gösterilmesi (%).

4.1.4. Tip 1 ve Tip 3 Kollajen Oranlarının Değerlendirilmesi

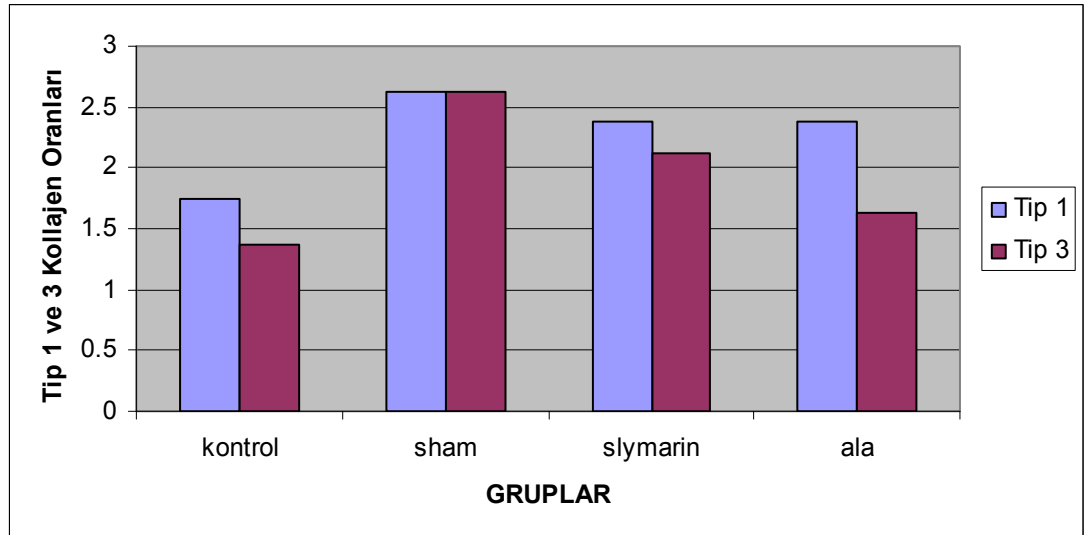
Sham grubunda, kontrol grubuna göre tip 1 ve 3 kollajen oranları artmıştır. Tip 3 kollajendeki artışın istatistiksel olarak çok önemli düzeyde olduğu ($p<0.01$) görülmektedir (Şekil 4.15 ve Tablo 4.3). Sham grubunda kontrol grubuna göre tip 1 kollajen oranında artış olmakla birlikte bu oran istatistiksel olarak anlamlı değildir

($p>0.05$). MÇO'da tip 1 kollajen artışının önemli düzeyde olmadığı söylenebilir. ALA ve silymarinin tip 1 kollajen artışını azalttığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı ($p>0.05$) görülmektedir. ALA'nın tip 3 kollajen artışını sham grubuna göre çok önemli düzeyde önlediği ($p<0.01$) görülmektedir (Şekil 4.15 ve Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Tip 1 ve tip 3 kollajen oranları.

	Gruplar	N	Mean	Std. D.	25	Median	75	p
TİP1 KOLLAJEN *	KONTROL	8	1,75	0,70	1	2	2	$p>0.05$
	SHAM	8	2,62	0,51	2	3	3	
	SİLYMARIN	8	2,37	0,74	2	2,5	3	
	ALA	8	2,37	0,51	2	2	3	
TİP 3 KOLLAJEN **	KONTROL	8	1,37	0,51	1	1	2	$p<0.01$
	SHAM	8	2,62	0,51	2	3	3	
	SİLYMARIN	8	2,12	0,83	1.5	2	3	
	ALA	8	1.62	0.51	1	2	2	

* One Way Anova ** Kruskal Wallis



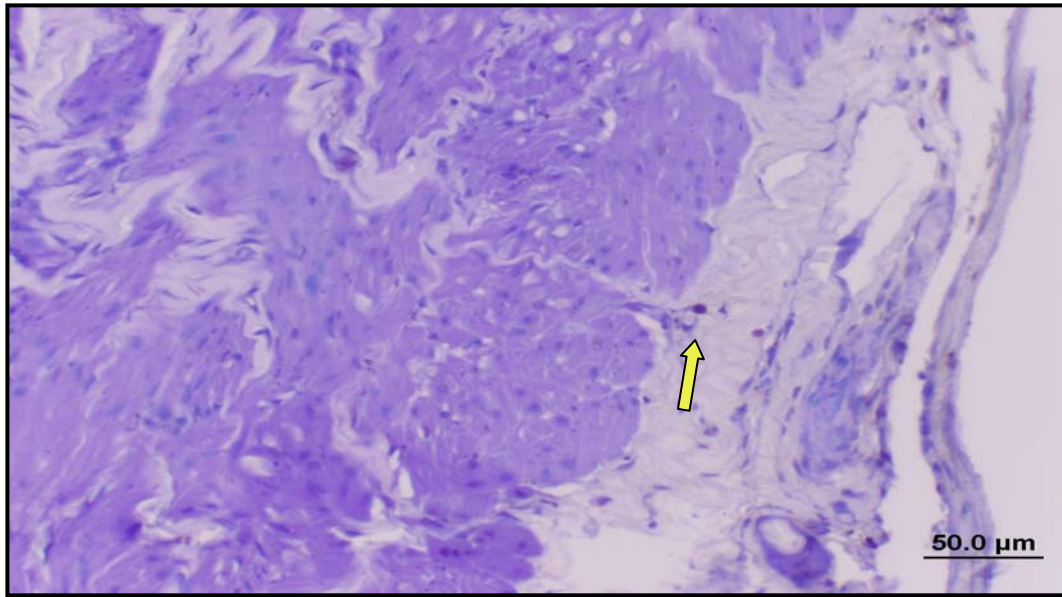
Şekil 4.15. Tip 1 ve tip 3 kollajen oranlarının grafiksel değerlendirilmesi.

4.1.5. TUNEL

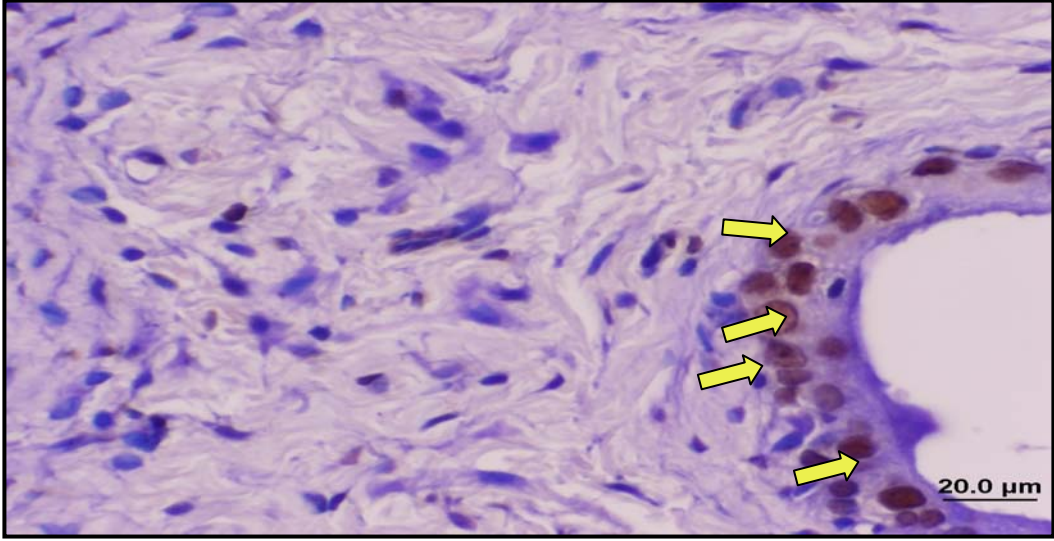
Histolojik İnceleme

TUNEL değerlendirmesi 2 araştırıcı tarafından kör olarak yapılmıştır. İncelemeler rastgele seçilmiş 25 kesitte ve X40 büyütmede en az 20 alanda değerlendirildi. Bu alanlardaki TUNEL (+) hücreler sayılarak indeks oluşturuldu. Deney gruplarına ait mesane kesitlerinde apoptoza giren hücreler, TUNEL (+) hücreler olarak değerlendirildi.

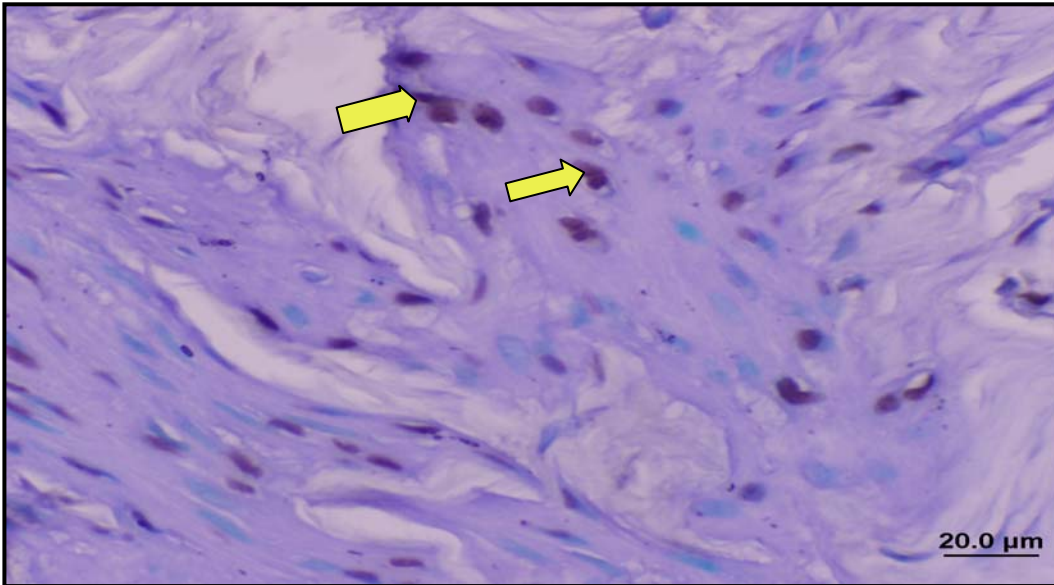
Kontrol grubunda epitel ve bağ dokusu arasında az sayıda, sham grubunda ise düz kaslar ve epitel içerisinde çok sayıda TUNEL (+) hücreler görüldü. MO + Silymarin grubunda sham grubuna benzer yerlerde ve şekilde çok sayıda TUNEL (+) hücreler görüldü. MO + ALA grubunda ise kontrol grubuna benzer şekilde az sayıda TUNEL (+) hücreler görüldü (şekil 4.16 - 4.20).



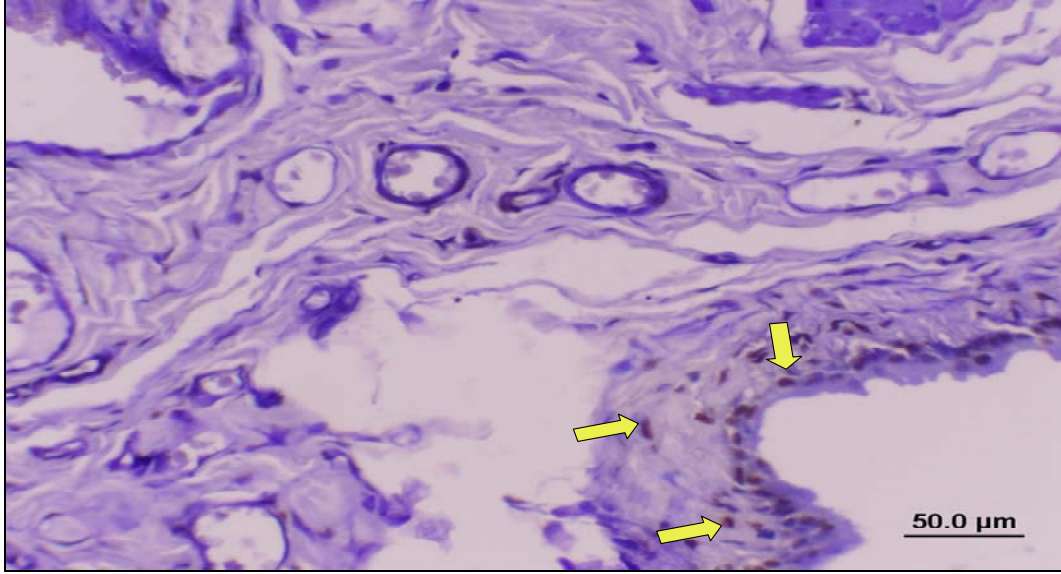
şekil 4.16. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde TUNEL (+) (ok) hücre görülmektedir. TUNEL, Bar 50 µm.



Şekil 4.17. Sham grubuna ait mesane kesitinde epitelyumda çok sayıda TUNEL (+) (oklar) hücreler görülmektedir. TUNEL, Bar 20 µm.

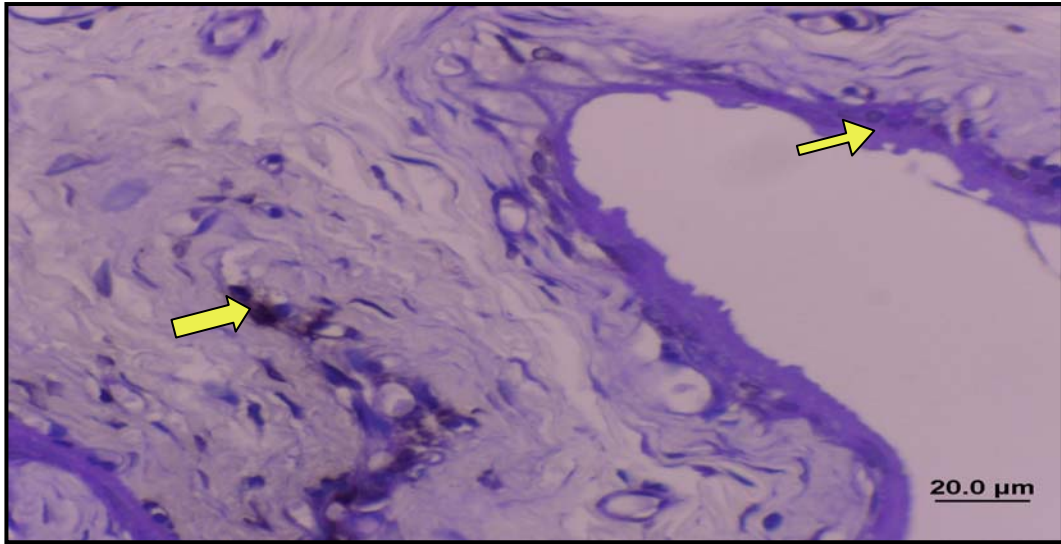


Şekil 4.18. Sham grubuna ait mesane kesitinde kas hücreleri arasında epitelyumda çok sayıda TUNEL (+) (ok) hücreler görülmektedir. TUNEL, Bar 20 µm.



Şekil 4.19. MÇO + Silymarin grubuna ait mesane kesitinde epitelyumda ve lamina propriyada çok sayıda TUNEL (+) (oklar) hücreler görülmektedir.

TUNEL, Bar 50 μm .



Şekil 4.20. MÇO + ALA grubuna ait mesane kesitinde epitelyumda ve lamina propriyada az sayıda TUNEL (+) (oklar) hücreler görülmektedir.

TUNEL, Bar 20 μm .

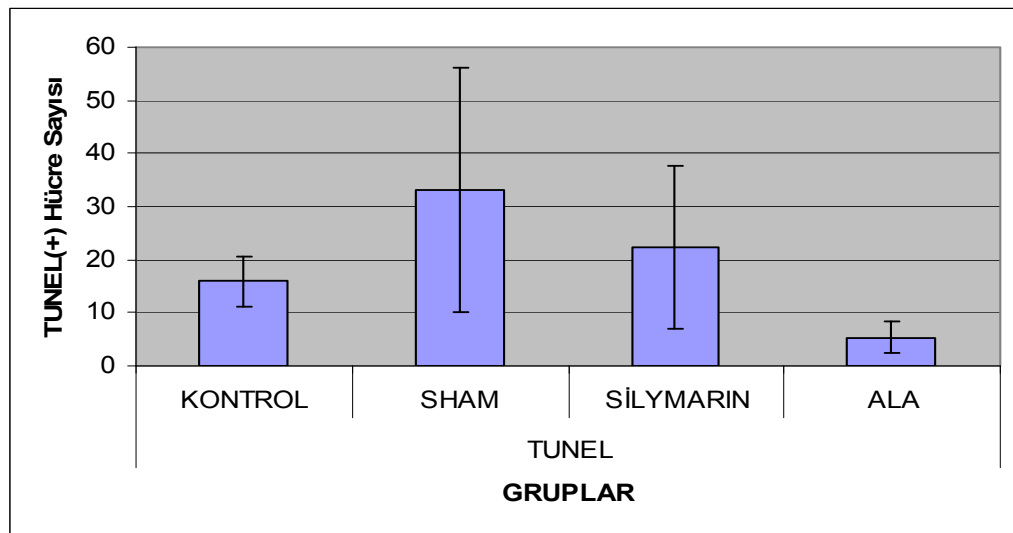
TUNEL İstatiksel Değerlendirme

Mesane İ/R hasarına bağlı gelişen patolojik süreçte apoptozisin aktif hücre hasarı ve ölümünde önemli rolü mevcuttur. Sham grubunda, kontrol grubuna göre TUNEL(+) hücrelerin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı ($p<0.001$) olduğu görülmüştür (Tablo 4.4 ve Şekil 4.21). ALA ve Silymarin kullanılan gruplarda TUNEL(+) hücrelerin azaldığı ancak silymarin grubunda bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. ALA grubunda TUNEL(+) hücrelerdeki azalmanın istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı ($p<0.001$) olduğu görülmüştür. ALA'nın apoptozisi azaltmada etkin olduğu bulunmuştur (Tablo 4.4 ve Şekil 4.21).

Tablo 4.4. TUNEL(+) hücrelerin gruplara göre dağılımı.

		N	Mean	Std.	25	Median	75	p
TUNEL	KONTROL	8	15,87	4,79	11,2	15,5	19	p<0.001
	SHAM	8	33,12	23,02	19,5	23	44,5	
	SİLYMARIN	8	22,37	15,30	11,2	18	30,5	
	ALA	8	5,37	2,92	2,25	5,5	7,7	

Kruskal Wallis



Şekil 4.21. TUNEL(+) hücrelerin gruplara göre dağılım grafiği.

4.2. Biyokimyasal İncelemeler

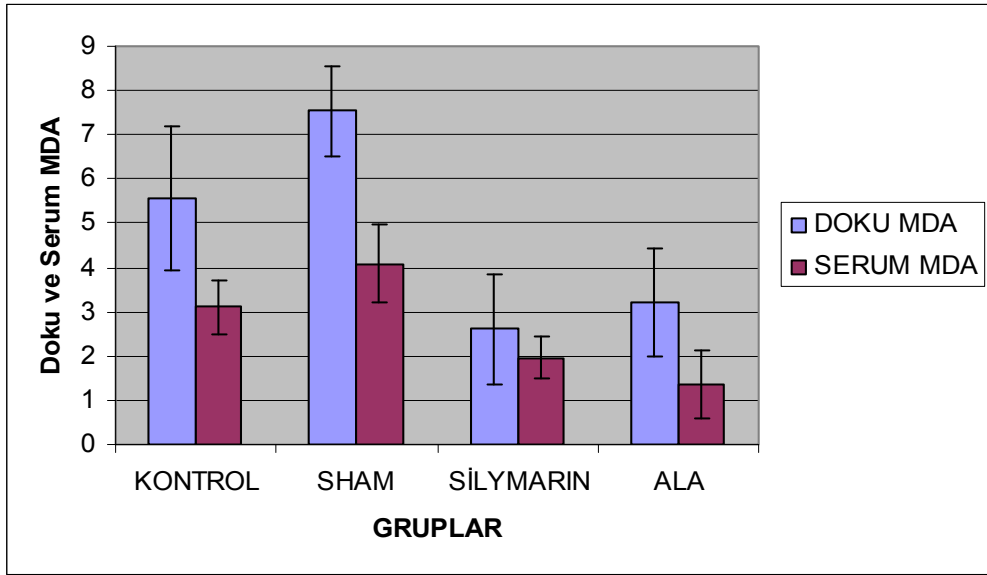
4.2.1. Doku ve Serum MDA Düzeyleri

Uzun süre iskemik kalan dokuda ATP yapımı durmakta ve sonrasında sağlanan reperfüzyon ile süperoksit radikali meydana gelmektedir. Reaktif oksijen metabolitleri ise hücre zarında lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünü olan MDA reperfüzyon hasarını ölçmek için kullanılmaktadır. Kontrol grubuna göre MÇO oluşturulan sham grubunda doku ve serum MDA düzeylerinin artışı ileri düzeyde anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). ALA ve Silymarin gruplarında ise sham grubuna göre doku ve serum MDA düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlıdır ($p<0,001$). ALA ve silymarinin MÇO'da İ/R'ye bağlı gelişen hücre membran hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğu görülmektedir (Şekil 4.22 ve Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Doku ve serum MDA düzeyleri (Doku: nmol/mg protein, Serum: nmol/ml protein).

		N	Mean	Std.	25	Median	75	p
DOKU MDA	KONTROL	8	5,57	1,63	4,7	5,5	7,0	p<0.001
	SHAM	8	7,53	1,00	6,6	7,5	8,4	
	SİLYMARIN	8	2,60	1,22	1,5	2,2	3,4	
	ALA	8	3,21	1,21	2,4	3,4	3,7	
SERUM MDA	KONTROL	8	3,1	0,59	2,6	2,9	3,7	p<0.001
	SHAM	8	4,08	0,89	3,2	4,2	4,7	
	SİLYMARIN	8	1,96	0,47	1,7	1,9	2,3	
	ALA	8	1,36	0,77	0,8	0,9	2,0	

One Way Anova



Şekil 4.22. Doku ve serum MDA düzeylerinin grafiksel gösterimi (Doku: nmol/mg protein Serum: nmol/ml protein).

4.2.2. Doku ve Serum TNF- α Düzeyleri

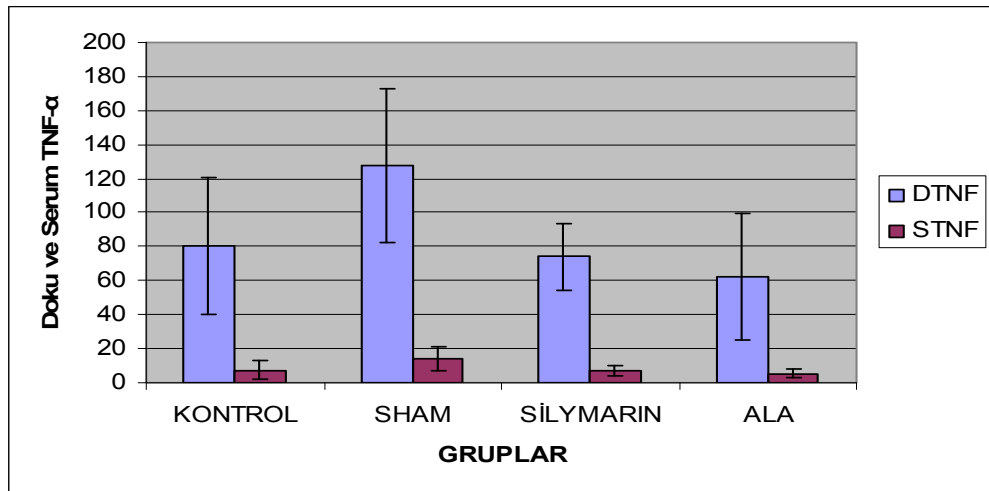
İskemi sonrası gelişen reperfüzyon evresinde yapımı artan SOR, TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar mediatörlerin nötrofil aracılı doku hasarı gelişiminde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Doku TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna göre sham grubunda arttığı görülmektedir. ALA ve silymarin gruplarında ise TNF- α istatistiksel olarak çok önemli düzeyde ($p < 0.01$) azalmıştır (Tablo 4.6 ve Şekil 4.23).

Serum TNF- α düzeyleri kontrol grubuna göre sham grubunda artmıştır. ALA ve silymarin gruplarında ise TNF- α düzeylerinin azaldığı ve bu farkın istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.05$) olduğu görülmüştür (Tablo 4.6 ve Şekil 4.23).

Tablo 4.6. Doku ve serum TNF- α düzeylerinin, gruplara göre ortalama ve standart sapma değerleri (Doku: pg/mg protein, Serum: pg/ ml protein).

		N	Mean	Std.D.	25	Median	75	p
DOKU TNF-α	KONTROL	8	80,27	40,23	53,2	68,1	116,1	p<0.01
	SHAM	8	127,62	44,80	85,2	124,0	159,5	
	SİLYMARIN	8	74,02	19,69	56,7	66,8	93,9	
	ALA	8	62,31	37,41	35,4	55,5	80,5	
SERUM TNF-α	KONTROL	8	7,17	5,50	2,1	5,9	12,9	p<0.05
	SHAM	8	14,17	6,88	10,3	14,8	19,3	
	SİLYMARIN	8	7,05	3,31	4,8	7,1	8,5	
	ALA	8	5,31	2,39	4,0	6,3	6,9	

One Way Anova



Şekil 4.23. Doku TNF- α (DTNF) ve serum TNF- α (STNF) düzeylerinin gruplara göre dağılımı (Doku: pg/mg protein, Serum: pg/ ml protein).

4.2.3. Doku ve Serum IL-6 Düzeyleri

Doku ve serum IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre sham, ALA ve silymarin gruplarında artmıştı. Serum IL-6 düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı olmakla

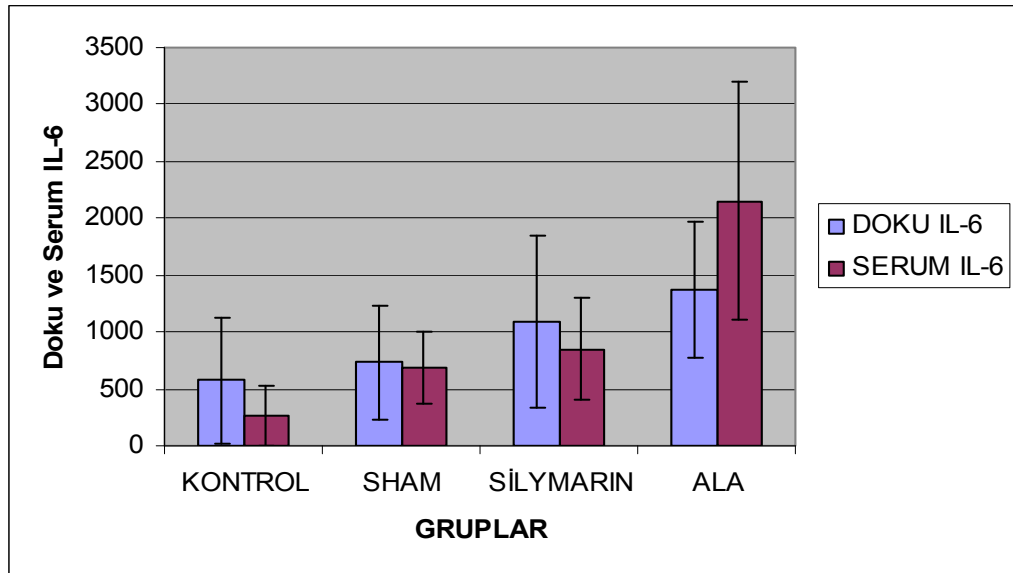
beraber doku IL-6 düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu (Şekil 4.24 ve Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Doku ve serum IL-6 düzeyleri (Doku: pg/mg protein, Serum: pg/ml protein).

		N	Mean	Std.	25	Median	75	P
*DOKU IL-6	KONTROL	8	576,2	552,8	197,6	309,3	1001,6	p>0.05
	SHAM	8	731,3	503,2	450,6	599,7	803,0	
	SİLYMARIN	8	1094,1	757,7	442,3	943,3	1646,1	
	ALA	8	1369,4	595,3	707,2	1486,5	1941,2	
**SERUM IL-6	KONTROL	8	264,6	264,6	55,4	223,6	307,2	p<0.001
	SHAM	8	678,4	315,6	452,7	524,8	1057,9	
	SİLYMARIN	8	847,1	446,4	519,5	909,9	1244,7	
	ALA	8	2151,4	1049,1	1011,0	2515,7	2996,0	

* One Way Anova

** Kruskal Wallis



Şekil 4.24. Doku ve serum IL-6 düzeylerinin grafiksel olarak gösterilmesi (Doku: pg/mg protein, Serum: pg/ml protein).

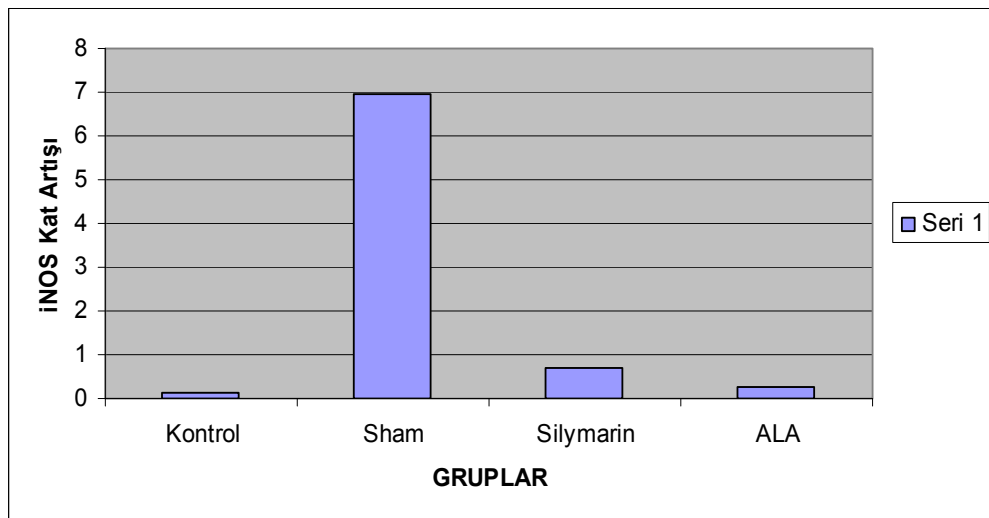
4.3. Fizyolojik Bulgular

Çalışmamızdan elde ettiğimiz iNOS yüzde kat artışı sonuçlarının tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi sonucunda ALA + MÇO ile sham grupları arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0.001$). Gruplar kendi içerisinde birbirleri ile Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırıldıklarında ALA + MÇO grubunda iNOS kat artış yüzdesinin sham grubuna göre azaldığı ($p < 0.001$) ve kontrol grubu değerlerine yaklaştığı görülmektedir (Tablo 4.8 ve şekil 4.25). Sham grubuna göre silymarin + MÇO grubunda ise iNOS yüzde kat artışının azaldığı ancak bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p > 0.05$) görülmektedir (Tablo 4.8 ve Şekil 4.25).

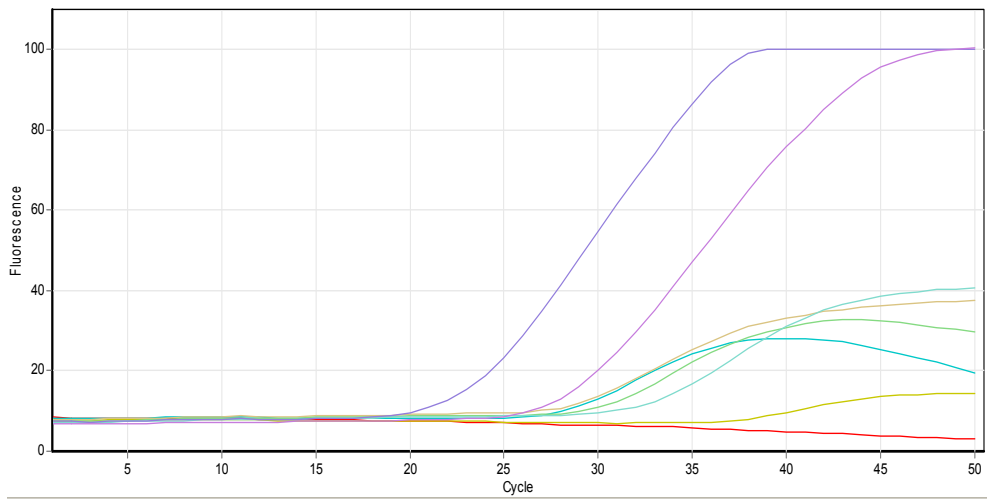
Tablo 4.8. Gruplara göre iNOS mRNA düzeyi kat artışı (%).

Gruplar	N	Mean	Std Dev	Median	25%	75%	p
Kontrol	8	0,117	0,0271	0,12	0,095	0,135	p<0.001
Sham	8	6,95	2,434	7	5,55	9	
Silymarin	8	0,676	0,294	0,725	0,62	0,875	
ALA	8	0,246	0,223	0,18	0,135	0,24	

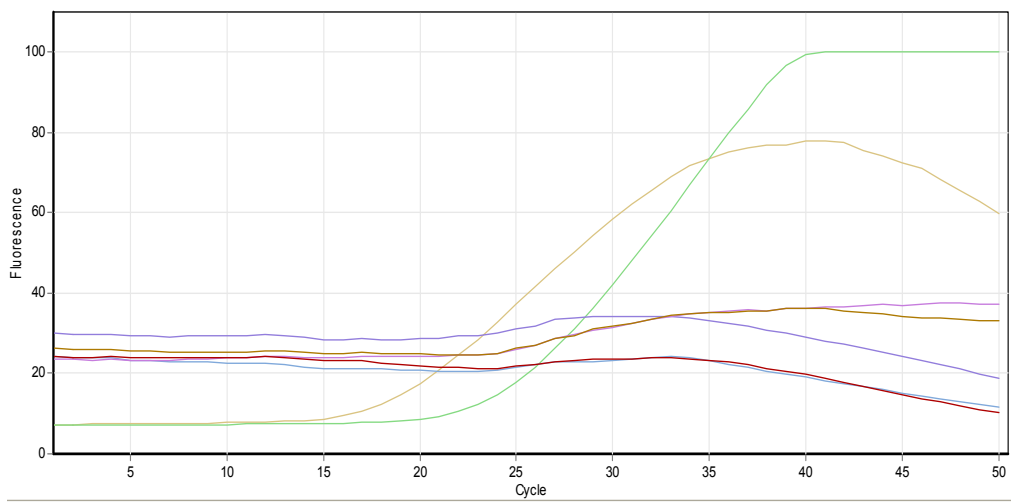
Kruskal Wallis



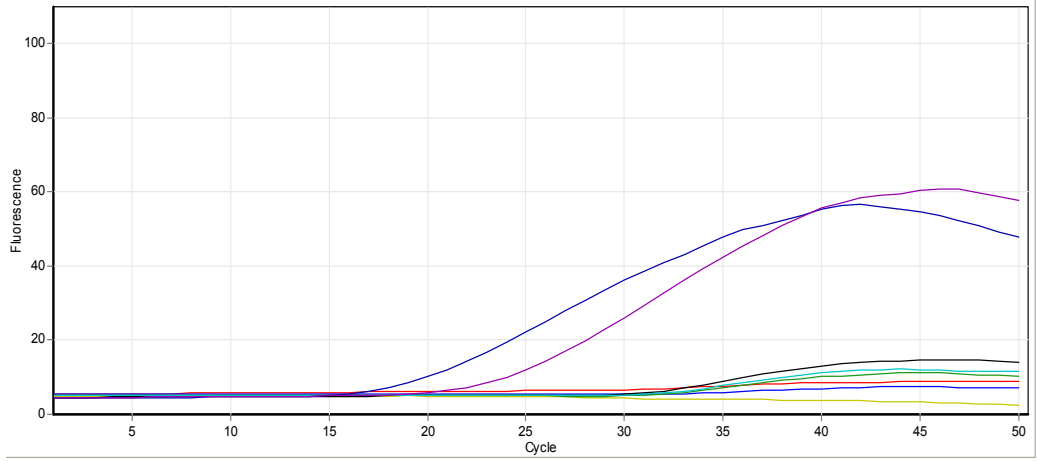
Şekil 4.25. Gruplara göre iNOS mRNA düzeyleri ve kat artışı ilişkisi.



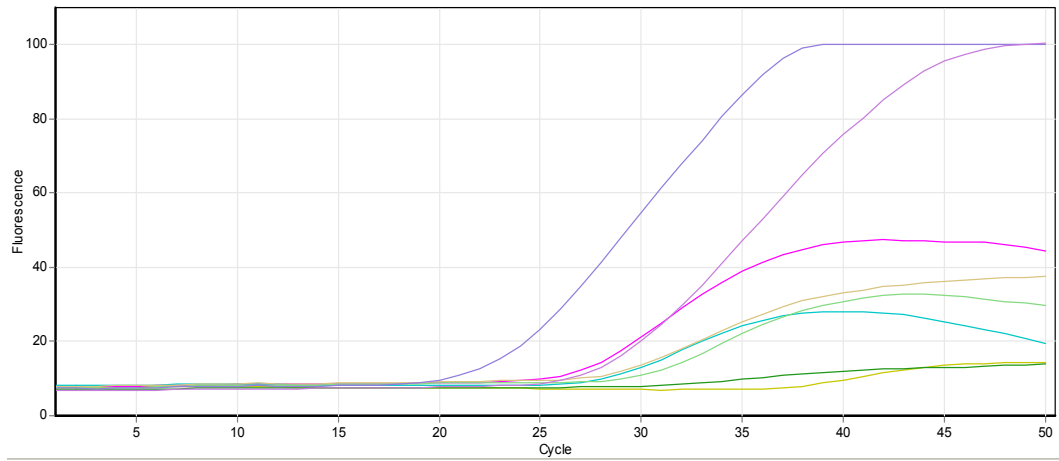
Şekil 4.26. Kontrol grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.



Şekil 4.27. Sham grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.



Şekil 4.28. Silymarin grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.



Şekil 4.29. ALA grubuna ait iNOS geni RT-PCR verileri.



Şekil 4.30. Her gruptan birer örnek olmak üzere seçilmiş RT-PCR ürünlerinin jel görüntüsü. Sırasıyla 1. kuyucuk marker, kontrol, silymarin, sham, ALA.

5. TARTIŞMA

Mesane çıkım obstrüksiyonu (MÇO), üriner sistemin sık rastlanan medikal ve cerrahi problemlerinden biridir. Benign prostat hiperplazisi'ne (BPH) sekonder gelişen MÇO, 50 yaş ve üzeri erkek hasta populasyonun yaklaşık %80'inde değişik derecelerde görülmektedir (1). BPH sık görülen MÇO nedeni olmakla birlikte diğer etiolojik faktörler ise; karsinoma, mesane boynu fibrozisi veya sklerozisi, üretral darlık, üretral valv ve düz kas sfinkter dissinerjisidir (2). Normal mesane fonksiyonları; mesanenin otonomik innervasyonu, hücre yapısı, metabolizmanın integrasyonu ve dolaşım sistemi ile sağlanan oksijen ve besin maddelerinin yeterliliği ile sağlanır (3). Yapılan araştırmalarda mesane çıkımının parsiyel obstrüksiyonun, farklı türdeki hayvanlarda mesane kan akımında azalma ve hipoksi gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (4).

MÇO'nun mesane fonksiyonlarına olan etkileri, farklı hayvan türleri üzerinde çalışılmıştır. Bunlar arasında; tavşan (156,157), Gine domuzu (158), rat (159,160), kedi (161), primat (162), domuz (163) ve ayrıca birtakım fetal modeller (164,165) bulunmaktadır. Parsiyel MÇO oluşturma yöntemleri olarak çalışmalarda; mesane boynu çevresine sütür koyma, üretral yoldan kateter yerleştirdikten sonra mesane boynunu sütür ile bağlama, jewellers ring, silastik kuff ve intraüretral enjeksiyonlar bulunmaktadır. Biz de çalışmamızda, ratlarda üretral yoldan kateter yerleştirdikten sonra mesane boynunu üretral bileşkedeki çevreye sütürle bağlayarak MÇO oluşturduk.

Greenland ve arkadaşları, domuzlarda normal işeme sırasında iskemi ve hipoksi periyodunun devam ettiğini gözlemişlerdir (166). İskemi oluşturulmuş mesane fonksiyonlarındaki değişikliklerin değerlendirilmesinde, *invivo* ve *invitro* iskeminin önemli derecede mesane disfonksiyonuna neden olduğunu ve her türlü stimülasyonda mesane kontraktil cevabının azalmasına yol açtığını belirtmişlerdir (4,167,168). MÇO sonucu mesane fonksiyonlarındaki bu değişimler; işeme basıncının azalmasına, idrar akımının (flow) azalmasına ve işeme sonrası rezidüel idrarın artmasına neden olur. Mukozadaki iskemik hasar ise mukozal permeabilite artışına, sensöryel sinirlerde aktivite artışına ve sonuçta detrüsör aşırı aktivitesine (DAA) yol açar (169). Öte yandan iskemi izole bir olay değildir; geçici ve reversible

olduğundan, arkasından reperfüzyon gelir. Bratslavsky ve arkadaşları, çalışmalarında sıçan mesanesinde reperfüzyonun tek başına iskemini oluşturduğu hasardan daha fazla hasar oluşturduğunu göstermişlerdir (5).

İ/R'ye bağlı doku hasarını başlatan en önemli faktör, serbest oksijen radikalleridir (SOR). Aerobik canlılar, metabolizmaları sırasında fizyolojik olarak oksidatif strese maruz kalırlar. Dokuların tükettiği oksijenin büyük bir kısmı (%95) aerobik metabolizma için kullanılırken, %5'inin SOR'e çevrildiği tahmin edilmektedir. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-), peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$) vardır. Bu radikaller membran hasarı, DNA yıkımı, proteaz aktivasyonu, lipid ve protein peroksidasyonu, takiben apoptozis ve nekrozla sonuçlanan hücre ölümüne neden olmaktadır (14). Biz de çalışmamızı planlarken mesanedeki hasarın asıl sorumlusu olan ve reperfüzyon aşamasında ortaya çıkan serbest oksijen radikallerini (SOR) önlemek için antioksidan ajanları seçtik.

Mesane iskemisi ve sonrasında reperfüzyonu; idrar retansiyonu, ateroskleroz, vazospazmlar, emboli ve tromboz gibi yaşla ilişkili bozukluklarda da görülebilir (170). Bu hastalıklar sonrası gelişen İ/R, mesane disfonksiyonuna neden olabilir (170). Bununla beraber akut overdistansiyon veya retansiyondan sonra yapılan dekompresyon ya da kateterizasyon sonucu görülen mesane disfonksiyonunun, İ/R'ye bağlı geliştiği bildirilmiştir (7,8). MÇO'nun mesane duvarı kan akımında (iskemi) ve oksijen basıncında (hipoksi) azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (5). Birçok çalışmada, MÇO'nun mesane kütlesi ve duvar kalınlığında artışa neden olduğu belirtilmiştir (9,10,11). Mesane duvar kalınlığındaki artış, her işeme ve inhibe edilemeyen kontraksiyon süresince siklik İ/R hasarını geliştirir. İşeme ve inhibe edilemeyen sürekli kontraksiyonlar nedeniyle kan akımı ve doku oksijenasyonunda azalma artarak devam eder (9). Reperfüzyon ve reoksijenasyon olarak adlandırılan bu olayda ortaya çıkan reaktif oksijen radikallerinin, hücre membranlarında lipid peroksidasyonu yolu ile membran hasarına neden olabilecekleri önceki çalışmalarda saptanmıştır (6,9,12). Aynı şekilde, membran hasarının sürekliliği MÇO ile ilgili progresif mesane disfonksiyonunun temelini de oluşturabilir (6). Çalışmamızda membran hasarını değerlendirmek için doku ve serumda MDA düzeylerini ölçtük.

Parekh ve arkadaşları, serbest radikaller yoluyla oluşan hücre membran düzeyindeki hasarın engellenmesinde yağda çözünen ve güçlü bir antioksidan olan vitamin E uyguladıkları tavşanlarda, dört haftalık obstrüksiyon sonucunda vitamin E uygulanan grupta mesane kontraktilesinin korunabildiğini saptamışlardır (6). Ayrıca Das ve arkadaşları, parsiyel MÇO oluşturulmuş rat mesanesinde bir alfa bloker olan *doksazosin* kullandıkları çalışmada, obstrüksiyona bağlı kas kütleindeki artışı engellemişlerdir. *Doksazosin* kan akımında yarattığı artışla, mesanede hipertrofiyi azalttığı ve kontraktilite özelliklerinin korunabildiğini bildirmişlerdir (171).

Güler ve arkadaşları, akut idrar retansiyonunda mesanede oluşan İ/R hasarının reaktif oksijen metabolitleri üzerine olan etkilerini değerlendirmek ve farklı antioksidan ajanlarla bu gelişen hasarı nasıl önleyebileceklerini görmek için yaptıkları deneysel çalışmada, retansiyon grubunda dekompresyon sonucu mesanede hasar oluştuğunu ve bu hasardan lökositlerin de rolünün olduğunu belirtmişlerdir. Endojen antioksidan ajanlardan hem *allopurinol*' ün hem de *verapamil*' in bu hasarı önlemede etkili olduğunu bildirmişlerdir (172). Şu ana kadar yapılan mevcut çalışmalarda, mesane I/R hasarında IL-6 ve TNF- α ' nın rolü hakkında herhangi bir veri bulamadık. Çalışmamızda İ/R hasarında lökositlerden salınan IL-6 ve TNF- α ' nın hasarı ölçme ve tedavi etkinliğini belirlemede bir parametre olabileceğini düşünerek mesane dokusu ve serumda IL-6, TNF- α düzeylerini değerlendirdik.

Saito ve arkadaşları, mesane İ/R hasarında mikrosirkülasyondaki rüptür sonucu olarak şiddetli eritrosit ekstravazasyonu ve lökosit infiltrasyonu gibi histopatolojik değişikliklerin özellikle düz kas ve submukozal alanda görüldüğünü fakat mukozada görülmediğini, *L-NAME* tedavisiyle de İ/R hasarına bağlı gelişen bu histopatolojik değişikliklerin önlendiğini bildirmişlerdir (173). Tavşan mesanesinin mukoza ve düz kas tabakasının anoksiye verdiği cevabın karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise, anoksik/iskemik hasara mukozanın düz kas hücrelerine oranla daha duyarlı olduğunu rapor etmişlerdir (174). Yenilmez ve arkadaşları tarafından mesane İ/R hasarına karşı *Ginkgo biloba*'nın etkisinin araştırıldığı çalışmada, mukozada oluşan histopatolojik değişiklikleri tanımlayarak *Ginkgo biloba*'nın İ/R hasarına karşı koruyucu olduğunu, histopatolojik ve mesane kontraktilesinde olumlu etkilerin görüldüğünü bildirmişlerdir (175). Benzer olarak Toklu ve arkadaşları

tarafından rat mesanesinde İ/R hasarı sonrası histopatolojik olarak ürotelyumda (mukoza) ülser alanlar, ürotelyal hücre kaybı ve şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu olduğunu, *resveratrol* tedavisinin bu hasarı düzelttiğini bildirmişlerdir (176). Biz de yaptığımız çalışmada tüm deney grupları mesane kesitlerinde histopatolojik incelemeler yaparak mesane tabakalarındaki değişimleri gösterdik.

MÇO oluşturulmuş hayvan modellerinde ideal, eşsiz ve evrensel antioksidan olan ALA'nın mesanede tip 1 ve tip 3 kollajen oranı, iNOS aktivitesi, apoptozis ve oksidatif hasardan sorumlu olan TNF α ve IL-6 gibi sitokinlere etkileri ile ilgili çalışmaya rastlayamadık. MÇO'da gelişen I/R hasarın tanımlanması ve antioksidan ajanların nasıl bir etkinlik göstereceğini bulabilmek için bu parametrelerin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Silymarin karaciğer ve safra hastalıklarına karşı koruyucu olup antikarsinogenik, antiapoptotik, antioksidan etkinlik gösterir. Hücre çoğalmasını arttıran, nörotoksin ve kardiyotoksinlere karşı koruyucu, östrojenik ve antiöstrojenik özellikleri vardır (105,106). Bir fitoöstrojen olan silymarin ve silybinin ultraviyolenin tetiklediği oksidatif stres, inflamasyon, immün cevap ve DNA hasarı gibi tehlikeli etkileri baskılamaktadır. PGE2, PGF2, PGD2 (prostoglandin metabolitlerinin) ve COX-2 (cyclooxygenase-2) ekspresyonunun inhibe ettiği, mitokondriyal apoptoz mekanizmalarını, kaspaz aktivasyonunu ve MAPK sinyallerinin modulasyonunu sağladığı bildirilmiştir (106, 118, 119).

Manna ve arkadaşlarının 1999 tarihinde hücre kültüründe çeşitli hücre tipleri kullanarak yaptığı bir çalışmada, silymarinin TNF- α 'nın tetiklediği MAPK'nın ve c-Jun terminal kinazın aktivasyonunu inhibe ettiği ve TNF- α 'nın tetiklediği sitotoksiteyi ve kaspaz aktivitesini ortadan kaldırdığı ve Bcl ve Bax oranını da arttırdığı belirlenmiştir (177). Yoo ve arkadaşlarının 2004 tarihinde insan endotelial ECV304 hücrelerindeki yaptığı bir araştırmada silymarinin kaspaz, Bcl2 ailesi ve NF- κ B'nin düzenlenmesi ve endotelial apoptoz indüksiyonu ile oluşan anjiyogenezi inhibe etmesi sonucu kanseri önleyici etki gösterdiği anlaşılmıştır (178, 179, 180). Silymarinin birçok doku ve organdaki koruyucu özelliklerine rağmen mesanedeki etkisiyle ilgili yapılmış hiçbir çalışmaya rastlayamadık.

Biz bu çalışmada antioksidan özellik gösteren ALA ve silymarin kullanarak MÇO sonucu gelişen İ/R hasarını engellemeyi, mesane fonksiyonlarını korumayı

amaçladık. Çalışmamızda MÇO oluşturmak için Tadatoshi ve arkadaşları ile Hanai ve arkadaşlarının tanımladıkları cerrahi yöntemi uyguladık (181,182). Üretral yoldan 1,2mm çapında kateter yerleştirdikten sonra üretrayı çepeçevre 4/0 ipek sütür ile bağlayıp kateteri çıkardık ve böylece deneysel MÇO oluşturduk.

MÇO' da, mesane duvar kalınlığı ve ağırlığında artış olduğu, yapılan hayvan deneylerinde gösterilmiştir (183). Mesane, obstrüksiyona erken dönemde sanki yara iyileşmesindeki gibi bir cevap vermektedir (184,185). Bu cevabı başlatmadaki etkenin mesanenin gerilmesi sonucu mesane duvarında gelişen travmanın rol aldığı düşünülmektedir. Böylece birtakım inflamatuvar olayların başlamasıyla birlikte mesanede proliferatif süreç gelişmektedir (185). Nielsen ve arkadaşları tarafından yapılan hayvan deneylerinde obstrüksiyon oluşturulduktan sonra bir hafta geçmeden mesane duvarında kalınlaşma tespit edilmiş (186). Mesane duvarındaki bu kalınlaşma, orijinal mesane duvarının 12 katına kadar artabilmektedir. Bu artış ne kadar fazla olursa, mesane kompliansı o kadar azalmakta, bu da mesanenin idrar boşaltma kabiliyetinde azalmaya yol açmaktadır (187). Bu artış, mesane düz kasında hipertrofiye ve destek dokusunda kollajen ile elastin birikmesine bağlıdır (188). MÇO olan insanlarda da aynı değişikliklerin olduğu histopatolojik olarak gösterilmiştir (189,190). Proliferasyon devam ettiği sürece ilk üç gün içinde mesane ağırlığı yaklaşık 2-3 misli artmakta ve duvar kalınlığında artış gözlenmektedir. Kompanzasyon döneminde, obstrüksiyonu izleyen birinci haftadan itibaren mesane ağırlığındaki artış hızı azalmaktadır (191). Dekompanzasyon döneminde, mesane ağırlığında yine hızlı bir artış olmakta ve bu dönemde kollajen sentezinin de hızlandığı göze çarpmaktadır (192).

Yapmış olduğumuz çalışmada, dört haftalık MÇO sonrasında kontrol grubuna göre sham grubunda makroskobik olarak mesane hacminde artış olduğunu gözlemledik. Hassas terazi ile mesane ağırlıklarını ölçtüğümüzde ise kontrol grubuna göre sham grubunda yaklaşık 6 kat ağırlık artışı mevcuttu. Gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığı zaman kontrol grubuna göre sham grubunda mesane ağırlığı artışında ileri derecede fark ($p<0,001$) olduğu görüldü. Alfa lipoik asid (ALA) ve silymarini tedavi olarak verdiğimiz gruplarda ise mesane ağırlığı sham grubuna göre ileri düzeyde anlamlı ($p<0,001$) olarak azalmıştı. ALA tedavisi verdiğimiz grupta mesane ağırlığı, kontrol grubundaki mesane ağırlığına oldukça yakındı.

Juan ve arkadaşları 2008 yılında yapmış oldukları çalışmada, tavşanlarda 4 ve 7 haftalık MÇO sonrasında mesane ağırlığının artmış olduğunu, alfa lipoik asid ve koenzim Q10 tedavisi verilen gruplarda ise mesane ağırlığının 7 haftalık obstrüksiyon grubuna göre anlamlı olarak azaldığını bulmuşlardır (193). Alfa lipoik asid ve koenzim Q10 ile yapılan bu çalışma ile MÇO’da mesane ağırlığının korunması yönünden bizim çalışmamızla benzer sonuçlar bulmuşlardır. MÇO’da siklik İ/R hasarına bağlı gelişen mesane disfonksiyonu ve klinikte alt üriner sistem semptomları (AÜSS) gelişmekte olup AÜSS azaltmak için PDE-5 inhibitörleri de kullanılabilir. Matsumoto ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ratlarda 4 haftalık obstrüksiyon sonrasında PDE-5 inhibitörü olan *vardenafil* tedavisi verdikleri grupta mesane ağırlığının kontrol grubuna göre artmış olduğunu ancak mesane kasılabilirlik fonksiyonlarının korunduğunu gözlemişlerdir (194). PDE-5 inhibitörü olan *vardenafilin* sadece mesane kan akımını iskemik fazda arttırdığını ancak reperfüzyon fazında serbest radikallere karşı koruyucu antioksidan özelliği olmaması nedeniyle mesane kas hipertrofisini ve kollajen birikimini engellemediğini, dolayısıyla mesanenin dekompanzasyon evresine gidişi engellemeyebileceğini düşünmekteyiz.

İlginç olarak, bazı antioksidanlarla yapılmış olan çalışmalarda ise MÇO’da mesane ağırlığındaki artışı önlemediğini görmekteyiz. Levin ve arkadaşlarının antioksidan ajan olan *tadenon* ile yapmış oldukları çalışmada, MÇO yapılmış gruba göre mesane ağırlığındaki artışı (hipertrofi/hiperplaziyi) engellemediğini ancak mesane kasılabilirliğinin korunabildiğini bulmuşlardır (195). Biz; uzun dönemde mesane duvar kalınlığındaki artışın, siklik İ/R hasarını devam ettirmesi nedeniyle mesane kasılma fonksiyonlarında da bozulmaya neden olabileceğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla mesanedeki etkisi daha belirgin olan antioksidanların seçilmesi gerektiğine inanmaktayız.

Mitesh ve arkadaşlarının antioksidan olan E vitamini ile Juan ve arkadaşlarının 2009 yılında antioksidan olan *antrodia camphorata* ile yapmış oldukları çalışmada, E vitamininin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmamakla beraber mesane ağırlığındaki artışı önlediği, *antrodia camphorata*’nın ise anlamlı düzeyde mesane ağırlığındaki artışı önlediği gösterilmiştir (196,197). Yapılan çalışmalarda, kullanılan birtakım tedavi ajanlarının sadece mesane kasılabilirlik

fonksiyonlarını koruduğunu ancak mesane duvar kalınlığı ve ağırlığındaki artışı engellemediğini görmekteyiz. Güncel bilgilerimize göre mesane dekompanzasyon evresi öncesinde sınırdaki da olsa kasılma fonksiyonlarını devam ettirdiğini ancak mesane duvar kalınlığındaki artışın I/R hasarının devam etmesine neden olduğu için mesanenin dekompanzasyon evresine gidişi önlemeyeceğini düşünmekteyiz. ALA ve silymarinin, diğer bazı antioksidan ajanlara göre MÇO'da İ/R hasarına bağlı gelişen mesane duvar kalınlığı ve ağırlık artışını korumada daha üstün olduklarını görmekteyiz.

Uzun süre iskemik kalan dokuda ATP yapımı durmakta ve sonrasında sağlanan reperfüzyon ile süperoksit radikali meydana gelmektedir. Oluşan bu süperoksit radikali diğer oksijen radikallerinin de oluşumuna sebep olmaktadır. Böylece oluşan ROM (reaktif oksijen metabolitleri) hücre zarında lipid peroksidasyonuna neden olarak doku hasarına yol açmaktadır (198-200). ROM çok kısa ömürlü oldukları için direkt yöntemlerle ölçümleri zor olmaktadır. Bu nedenle indirekt yöntemler tercih edilmekte, bu amaçla da genellikle lipid peroksidasyon ürünü olan MDA (malonildialdehid) bakılmaktadır (201). Bizim yaptığımız çalışmada mesanede oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarında ROM'un etkisini belirlemek için doku MDA düzeylerine bakılmıştır. Matsumoto ve arkadaşları, akut idrar retansiyonu sonrası meydana gelen İ/R sonrası oluşan mesane disfonksiyonunda lipid peroksidasyonunun önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Burada oluşan mesane disfonksiyonu ve lipid peroksidasyonunu, bir antioksidan olan *edaravone* verilmesiyle önlenebileceğini belirtmişlerdir. *Edaravone* gibi serbest radikal temizleyicilerin ve diğer nöron koruyucu ilaçların akut ve kronik retansiyonlu hastalarda meydana gelen hasarın onarılmasında etkili olabileceklerini göstermişlerdir (202). Taş ve arkadaşları, spinal kord hasarı oluşturulmuş ratlarda ALA ve metilprednidozolon kullanmışlardır. ALA'nın spinal kord hasarında lipid peroksidasyonuna karşı metilprednidozolonla kıyasla daha etkili ve koruyucu olduğunu bulmuşlardır (203).

Saito ve arkadaşları ratlarda akut üriner retansiyon sonrası gelişen İ/R hasarında lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için MDA düzeyini ölçtükleri çalışmalarında, reperfüzyon sonrası grupta MDA düzeyinin artmış olduğunu ve reperfüzyonla beraber serbest radikallerin açığa çıkarak mesane disfonksiyonuna

neden olduğunu göstermişlerdir (204). Shimizu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise rat mesanesinde serbest radikal koruyucusu olan *edaravone*' un akut üriner retansiyon sonrası lipid peroksidasyonunu ve oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisini incelemişlerdir. *Edaravone*' un mesanede oksidatif hasara karşı koruyucu olduğunu ve MDA düzeyini azalttığını bulmuşlar (205). Üstüner ve arkadaşları 2010 yılında yapmış oldukları çalışmada, diabetik rat mesanesinde oksidatif strese karşı antioksidan olan vitamin E' nin koruyuculuğunu değerlendirmişlerdir. Diabetik grupta MDA düzeyinin anlamlı olarak yüksek olduğunu ve E vitamini verilen grupta ise MDA düzeyinin kontrol grubuna yakın düzeyde azaldığını göstermişlerdir. E vitaminin diabetik sistopatiye karşı koruyucu olabileceğini belirtmişlerdir (206). Motawi ve arkadaşları, rat myokardiumu, testis ve mesanesinde cylophoshamide ile oluşturdukları oksidatif hasarı engellemek için lipoik asid ve *squalene* kullanmışlardır. Çalışmalarında doku MDA düzeyinin lipoik asid kullanılan grupta anlamlı olarak azaldığını ve lipoik asidin oksidatif hasara karşı koruyucu olduğunu bulmuşlardır (207).

Yapmış olduğumuz çalışmada doku ve serum MDA düzeyi sham grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık ($p<0,001$) göstererek artmıştı. ALA ve silymarin gruplarında ise sham grubuna göre doku ve serum MDA düzeyi ileri düzeyde anlamlı ($p<0,001$) olarak azalmıştı. ALA ve silymarin MÇO'da İ/R'ye bağlı gelişen lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla hücre hasarını önlediğini tespit ettik.

Yapılan deneysel çalışmalarda, obstrüksiyona maruz kalan mesanede ekstrasellüler matriks yapısında bazı değişikliklerin olduğu gözlenmiştir. Gerilime cevap olarak, matrikste tip1/ tip 3 kollajen oranında tip 3 lehine bir artış olur. Kollajendeki bu değişim üretimdeki artıştan çok metalloproteinaz doku inhibitörleri ile ilişkili olup, kollajenin çeşitli formlarının yıkımı ile ilgilidir. Böylece daha az yıkımla, kollajenin sabit üretiminin sürmesi sonucu tip 3 kollajende tip 1 kollajene göre mutlak ve göreceli bir artış olur. Bunun sonucunda mesane duvarında; mukoza, submukoza, detrüör ve serozayı kapsayan proliferasyon görülmekte ve mesane duvarında komplians azalmaktadır. Tüm bu değişiklikler mesane duvarının doluma karşı cevabına (komplians) ve mesanenin etkin kontraksiyonuna açıkça etki etmektedir (208-210).

Kollajen, mesanede ekstrasellüler matrixin ana bileşenidir. Kondo ve Susset mesanedeki kollajenin, mesane duvarının pasif özelliğini desteklediğini öne sürmektedir (211). Mesanedeki değişik tipteki kollajen varlığı ve karakterleri tanımlanmıştır (212). Tip 1 ve tip 3 kollajen alt üriner traktın biyolojik fonksiyonunu belirgin olarak etkileyen belirgin kollajen tipleri olarak görülmektedir. Tip 1 kollajen doku gerginliğini sağlarken, tip 3 kollajen ise ana stromal matrixin gergin fibrilleri ile ilişkilendirilmiştir (213). Mesane duvar kollajeninin çoğu kas lifleri dışında bağ dokusunda bulunur. Bu nedenle mesane duvarında, kas ve kas olmayan doku oranları arasındaki değişiklik, kollajen konsantrasyonunu etkilemektedir. Birçok farklı kollajen tipi belirlenmiştir. Mesanede en sık tip 1,3 ve 4 görülmektedir (214). Landau ve arkadaşları, iki ana tipini (tip 1 ve 3) ölçebilecek morfometrik ve histokimyasal teknik geliştirdiler. Bu metodlar mesane ultrasütrüktürünün üç parametresi hakkında fikir verir: **1-** bağ dokusu hacminin yüzdesi, **2-** bağ dokusunun düz kasa oranı, **3-** tip 3 kollajenin tip 1'e oranı. Bu parametrelerin, patolojik mesaneleri normallerle kıyaslandığında anormal yüksek olduğu gösterilmiştir (215). Mesane fonksiyonlarını değerlendirirken düz kas ve tip 1-3 kollajen oranına mutlaka bakılması gerektiğine inanılmaktadır. Farelerde infravezikal obstrüksiyon ya da mesanenin denervasyonu mesane düz kasında hipertrofiye, bunun karşılığında da kollajen konsantrasyonunda artmaya yol açar (216). Yaşlanma ile hem erkekte hem de kadında düz kasın bağ dokusuna oranı düşer (217,218). Bu, yaşlanma ile birlikte submukozal kollajen depolanmasında artmaya bağlı olabilir. Antioksidan tedavi ile düz kas kollajen oranını koruyabilirsek, mesane yaşlanmasının önüne geçerek ileriki yıllarda gelişebilecek işeme sorunlarını da engelleyebiliriz.

Juan ve arkadaşları, tavşanda MÇO oluşturarak lipoik asid ve koenzim Q10'un koruyucu etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında 4 ve 7 haftalık mesane çıkım obstrüksiyonu oluşturdukları gruplarda düz kasın ileri derecede hipertrofiye olarak düz kas/kollajen oranının arttığını göstermişler. Lipoik asid, koenzim Q10 uyguladıkları grupta ise düz kas kollajen oranının düştüğünü bulmuşlardır. Bu çalışmalarıyla antioksidan olan lipoik asid ve koenzim Q10'un parsiyel çıkım tıkanıklığında mesane disfonksiyonuna karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir (195). Bu çalışmada, düz kas fonksiyonlarını bozan esas patolojinin düz kas hipertrofisi mi yoksa kollajen oranındaki değişim mi olduğu net olarak ortaya

konulmamıştır. Vincenzo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; benign prostat hiperplazisine bağlı olarak MÇO olan hastalarda mesane saat 9 ve 3 hizasında yapılan tam kat biopsiler sonucunda, obstrüktif grupta detrüsör kollajen oranı %48 kollajen lehine artış gösterirken, non-obstrüktif kontrol grubunda ise %17 kollajen lehine artış bulunmuştur (219). Düz kas lifleri arasındaki kollajen artışı düz kas oranını azaltmakta olup dolayısıyla mesane kasılma fonksiyonlarını bozmaktadır. Bizce, hangi tip kollajen artışının daha belirgin olduğu incelenseydi obstrüksiyona bağlı mesane disfonksiyonu gelişimindeki patoloji daha iyi anlaşılabilirdi.

Bizim yaptığımız çalışmada ise dört hafta süre ile mesane çıkım obstrüksiyonu oluşturulan sham grubunda, mesane duvar kalınlığı kontrol grubuna göre artmış olarak görüldü. Düz kas demetlerinin arasında ve tüm katlarda bağ dokusu artışı dikkat çekiciydi. Buna karşın düz kas miktarının azaldığı belirlendi. Yapmış olduğumuz literatür taramasında da obstrüksiyon oluşturulan gruplarda mesanede benzer değişikliklerin meydana geldiğini görmüştük. MÇO + silymarin grubunda, sham grubuyla benzer bulgular olduğu görüldü. Kollajen lifler, düz kas demetleri arasında yoğun olarak gözlendi. MÇO + ALA grubunda ise kontrol grubuyla benzer olarak, kollajen ve düz kas demetleri arasındaki oranın kısmen eşit olduğu belirlendi. Kontrol grubunda tip 1 kollajen boyanması genel olarak lamina propriyada gözlendi. Sham grubunda ise tip 1 kollajen boyanmasını, mesanenin tüm tabakalarında özellikle düz kas demetleri arasında görüldü. Kontrol grubunda tip 3 kollajen boyanması genel olarak lamina propriyada gözlendi. Tip 3 kollajenin sham grubunda, kontrol grubuna göre oldukça kuvvetli boyandığı gözlendi. Ayrıca sham grubunda tip 3 kollajenin, tip 1 kollajene göre daha kuvvetli boyandığı gözlendi. MÇO + silymarin grubunda sham grubuyla benzer şekilde tip 3 kollajen dağılımı görüldü. MÇO + ALA grubunda ise sham grubuna göre daha az tip 1 ve tip 3 kollajen boyanması belirlendi. Özellikle tip 3 kollajen boyanmasının belirgin olarak azaldığı gözlendi.

Çalışmamızda kontrol grubunda düz kas oranı ortalama % 45 iken MÇO sonrası sham grubunda ortalama %27 olup düz kas oranı azalmıştır ($p<0,001$). Azalan düz kasın yerine kollajen birikmiş olup kontrol grubunda ortalama kollajen oranı % 18 iken sham grubunda %38'dir ($p<0,001$). ALA ve silymarin gruplarında düz kas yüzdesinin korunduğu, kollajen artışının azaldığı ve bunun istatistiksel olarak

ileri düzeyde anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$). Artan kollajen tipini incelediğimizde sham grubunda kontrol grubuna göre tip 1 ve 3 kollajen oranlarının arttığı ancak tip 3 kollajendeki artışın istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu ($p<0.05$) görülmektedir. ALA ve silymarinin, tip 1 kollajen oranını azalttığı ancak istatistiksel düzeyde anlamlı olmadığı ($p>0.05$), ALA' nın tip 3 kollajen oranını önemli düzeyde azalttığı ($p<0.05$) görülmektedir.

Yaptığımız literatür çalışmalarında; özellikle tip 3 kollajen miktarındaki artış ve düz kas lifleri arasında artmış kollajen oranı mesane disfonksiyonun temel nedenidir. Aynı zamanda yaşlanan mesanede de I/R hasarına bağlı olarak benzer değişimler gelişmektedir. Yaptığımız bu deneysel çalışmada literatür sonuçlarına benzer olarak mesane düz kas oranının korunduğunu, kollajen artışının azaldığını dolayısıyla düz kas kollajen oranının korunduğunu bulduk. MÇO' da kollajen tiplerinden asıl artışın tip 3 kollajende olduğu ve tip 1 kollajende artışın anlamlı olmadığını görmekteyiz. Dolayısıyla mesane fonksiyonlarındaki bozulmanın asıl nedeninin düz kas oranındaki azalmanın yanı sıra tip 3 kollajen oranındaki artıştan kaynaklandığını ve tip 1 kollajenin etkisinin olmadığını söyleyebiliriz. MÇO' ya bağlı gelişen I/R hasarında antioksidanların oksidatif hasarı önlemesiyle mesane düz kas yapısının korunduğunu gördük. Böylece mesane kompliansı ve kasılabilirlik fonksiyonlarının devamının sağlanabileceğini düşündük. Çalışmamızda ALA'nın silymarine göre düz kas/ kollajen oranının korunduğunu ve mesane fonksiyonlarının devamında daha etkin olduğunu ve ALA'nın antioksidan özellikleri bakımından silymarine göre daha güçlü olduğunu görmekteyiz. Silymarin ile ilgili yapılmış mesane çalışması olmaması nedeniyle silymarinin farklı dozlardaki etkinliği hakkında bilgi sahibi değiliz. Silymarinin MÇO'da daha yüksek dozlarda kullanımı ile ilgili yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sitokinler, polipeptid yapıda olup inflamasyonda en önemlileri interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktör-alfadır (TNF- α). Özellikle IL-6 ve TNF- α birçok ortak biyolojik özellikleri paylaşır. Her ikisi de aktive monosit, makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından oluşturulur ve pro-inflamatuar sitokinler olarak adlandırılırlar. Nötrofil ve endotel hücre etkileşimleri İ/R' ye bağlı mikrovasküler hasarın önkoşuludur. İskemi sonrası gelişen reperfüzyon evresinde yapımı artan SOR, TNF- α , IL-6 ve PAF gibi inflamatuvar mediatörlerin nötrofil aracılı doku hasarı

gelişiminde önemli rolü olduğu düşünülmektedir. PNL'ler sitokinler tarafından aktive edildiğinde yüksek konsantrasyonda nitrik oksit ve süperoksit üretebilirler; bu da hücre hasarına neden olur (220). Ayrıca nötrofillerin inflamatuvar bağırsak hastalığı, romatoid artrit, kanser ve reperfüzyon hasarında, hasardan sorumlu major ajanlar olduğu düşünülmektedir.

Şehirli ve arkadaşları, ratlarda ALA'nın böbrek I/R hasarına karşı koruyuculuğunu araştırırken IL-1, IL-6, TNF- α ve MDA düzeyini değerlendirmişlerdir. Pro-inflamatuvar mediatörler olan IL-1, IL-6, TNF- α 'nın reperfüzyon aşamasında arttığını ve ALA tedavisi sonrasında ise bu mediatörlerin azaldığını göstermişlerdir. Dolayısıyla organ hasarından sorumlu olan pro-inflamatuvar mediatörler ve oksidatif hasarın öncüsü olan MDA'nın azalması ALA'nın I/R hasarına karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir (221). Silymarinin belirgin anti-inflamatuvar etkinliği en belirgin olarak karaciğer dokusunda tanımlanmıştır. Geçmişte yapılan çalışmalarda, silymarinin etkinliğini; nötrofil migrasyonunun inhibisyonu, kupffer hücrelerinin inhibisyonu, belirgin olarak lökotrien inhibisyonu ve prostoglandin sentezini inhibe ederek göstermektedir (222-224).

Böbrek (221), ince bağırsak (225), mide (226), karaciğer (227) gibi birçok organda TNF- α I/R hasarının bir göstergesi olarak çalışılmış. Ancak mesanenin I/R hasarında TNF- α ve IL-6 ile ilgili bir çalışma bulamadık. Çalışmamızda mesanede I/R hasarının göstergelerinden biri olarak TNF- α ve IL-6 seviyelerini değerlendirdik. Kontrol grubuna göre sham grubunda obstrüksiyona bağlı gelişen I/R hasarı sonucunda mesane dokusunda ve serumda TNF- α , IL-6 seviyeleri artmıştı. MÇO + ALA ve MÇO + silymarin gruplarında doku TNF- α seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p < 0.01$) sham grubuna oranla azaldığını, kontrol grubu seviyelerin altında olduğunu gördük. Serum TNF- α düzeyi ise MÇO + ALA ve MÇO + silymarin gruplarında sham grubuna göre önemli düzeyde azaldığı ($p < 0.05$) görülmüştür. Literatürlerdeki farklı organlarda yapılan I/R çalışmalarının sonuçlarıyla bizim sonuçlarımız uyumluydu. IL-6 seviyesi ise kontrol grubuna göre sham grubunda anlamlı düzeyde yükselmişti, ancak tedavi gruplarında düşme olmadığı ve hatta sham grubuna göre IL-6 seviyesi daha da artmıştı. TNF- α , mesane I/R hasarında karaciğer, böbrek ve bağırsakta olduğu gibi belirteç olarak

kullanılabilir. Antioksidanların, pro-inflamatuar mediatörlerin salınımını azaltarak mesaneyi koruyabileceğini bu çalışmayla göstermekteyiz.

Programlı hücre ölümü anlamına gelen “apoptozis”, hem hücresel homeostazisin devamlılığı hem de hücre çoğalması ve farklılaşmasında çok önemli olan hücre eliminasyonu için gerekli fizyolojik bir işlemdir. Apoptotik süreci başlatan, indükleyen ve baskılayan birçok faktör tanımlanmıştır. Apoptozis ile organizmada hasar görmüş veya tehlike potansiyeli olan hücreler, çevreye zarar vermeksizin ortadan kaldırılır. SOR’ un orta düzeyleri birçok farklı hücrede apoptoze neden olur. Mesane İ/R hasarına bağlı gelişen patolojik süreçte apoptozisin aktif hücre hasarı ve ölümünde önemli rolünün olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur (228).

Apoptoz ve mesane kontraktilesinin incelendiği güncel bir çalışmada, Aikawa ve arkadaşları tavşanlara ooferektomi ve östrodiol tedavisi uygulayarak mesane kontraktilesini ve apoptozis oluşumunu araştırmışlardır. Bu çalışmada, araştırmacılar, ooferektomize tavşanlarda östrodiol uygulaması ile apoptozun engellendiğini, bunun sonucunda da kontraktilesinin agonistlerle daha etkili olarak oluştuğunu ya da korunduğunu bildirmişlerdir (229).

Saito ve arkadaşlarının rat mesanesinde İ/R tarafından başlatılan apoptozis üzerine bir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan *N(G)-nitro-L-arginine methylester (L-NAME)*’nin etkisini araştırdıkları çalışmada tedavi uygulanan grupta histopatolojik görünümde düzelme ve apoptotik hücre sayısında azalma olduğunu bildirilmiştir (228). Yenilmez ve arkadaşlarının *Ginkgo Biloba*’nın rat mesanesinde İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada da kontrol grubuna göre İ/R grubunda apoptotik hücrelerin anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir. Tedavi grubunda ise apoptotik hücre sayılarının azaldığını ve *Ginkgo Biloba*’nın ani-apoptotik etkinlikte olduğunu belirtmişlerdir (175). Juan ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada, tavşanlarda MÇO ile İ/R hasarı oluşturarak *antrodia camphorata* adlı antioksidan ajanın koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada, mesane fonksiyonlarının korunduğunu ve apoptozisin kontrol ve İ/R gruplarına göre tedavi verilen grupta daha düşük olduğunu göstermişlerdir (199). 2010 yılında Emmez ve arkadaşları, tavşanlarda spinal kord İ/R hasarı oluşturdukları çalışmada ALA’nın anti-apoptotik etkisini incelemişlerdir. Apoptozisin göstergesi olarak caspase-3

düzenini immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir. Çalışmalarında ALA tedavisinin spinal kord İ/R hasarında apoptozis üzerine etkisinin olmadığını söylemişlerdir (230).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada ise ALA'nın mesanede anti-apoptotik etkisinin olduğu ancak silymarinin aynı etkiyi göstermediğini tespit ettik. Üstüner ve arkadaşları 2010 yılında diabetik ratlarının mesanesinde antioksidan olan vitamin-E'nin apoptozis üzerindeki koruyucu etkisini araştırmışlar. TUNEL yöntemiyle apoptozisin değerlendirildiği çalışmada vitamin-E'nin anti-apoptotik etkisinin olduğunu göstermişlerdir (206). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada sham grubunda, kontrol grubuna göre TUNEL(+) hücrelerin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı ($p<0.001$) olduğu görülmüştür. ALA ve Silymarın kullanılan gruplarda TUNEL(+) hücrelerin azaldığı ancak silymarın grubunda bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. ALA grubunda TUNEL(+) hücrelerdeki azalmanın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı ($p<0.001$) olduğu ve ALA'nın antiapoptotik özelliğinin olduğunu gösterdik.

iNOS (indüklenebilir Nitrik Oksid Sentaz) büyük oranda enflamatuvar süreç nedeniyle meydana gelir ancak son zamanlarda elde edilen veriler, iskemik hasarda da iNOS'un rolü olabileceği yönündedir (231). Obstrüksiyona sekonder mesane disfonksiyonu patogeneğinde iskemik primer etiyolojik nedenlerden birisi olduğundan mesanedeki iNOS seviyesi obstrüksiyondan hemen sonra değişebilir (232). Son zamanlarda hipoksiye akut cevapta iNOS'un retina, beyin ve kardiyak modellerinde iskemik sonrası doku disfonksiyonu gelişiminde rolünün olduğu gösterilmiştir (231, 233, 234).

Deneyssel olarak İ/R sonucu oluşan böbrek hasarında, serbest oksijen radikallerinin hücrede direkt hasara yol açtığı ve bu hasarın şiddetine göre hücre ya apoptoza ya da nekroz ile ölüme gittiği gösterilmiştir (235). Vinas ve arkadaşları böbrek İ/R hasarından sonra apoptoz (+) hücre sayısında artış olduğunu göstermiştir. Bunların yanısıra İ/R hasarında iNOS geninin de olaya karıştığı bilinmektedir. Böbreklerde, I/R hasarı oluşturularak immünohistolojik çalışmalar yapılmış ve sonuçta apoptotik hücrelere ilaveten iNOS mRNA düzeyinin de arttığı gösterilmiştir (235). Ancak Mark ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmalarda iskemik ve iskemik olmayan böbrek dokusunda iNOS gen ifadesinin benzer olduğunu ancak bölgesel

birtakım farklılıklar oluşturabildiğini belirtmişlerdir (236). Dolayısıyla İ/R ile oluşturulan böbrek hasarında apoptotik hücre sayısı artmakla birlikte iNOS gen ifadesi düzeyinde çelişkili bilgiler vardır. NO' nun çeşitli dokularda İ/R hasarı süresince hücreleri hasardan koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (237). Aynı zamanda NO'ya bağlı olarak süperoksit ve peroksinitritin doku ve hücreler üzerine ciddi zararlı etkisi olduğu da bildirilmiştir (238,239). Böylece NO için çelişkili olmakla birlikte, hücre ve dokularda hem koruyucu hem de zararlı etkisinin olduğu anlaşılmıştır. NO' nun böbrek hasarı sürecindeki rolü halen tartışmalıdır. Yapılan çalışmalarda NO' nun bu süreçte hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik etkileri gösterilmiştir (240). Bu yüzden patolojik süreçte NO toksik veya koruyucu bir rol üstlenebilmektedir.

Bae ve arkadaşlarının 2008 yılında böbrek iskemisi reperfüzyon hasarında ALA' nın etkilerini inceledikleri çalışmalarında ALA tedavisi verilen grupta kontrol ve İ/R grubuna göre iNOS'u azalttığı ve böbrekte koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (241). Mesanede yapılan çalışmalarda ise iNOS'un inhibe edilmesinin mesane disfonksiyonunu önlemede etkili olduğu belirtilmiştir. Connors ve arkadaşları, parsiyel MÇO'ya sekonder gelişen İ/R hasarında, NO'nun rolü ve *L-NAME* tedavisiyle bu hasarın ne kadarını önleyebileceklerini görmek için tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında İ/R sonrası NO seviyesinin arttığını görmüşlerdir. *L-NAME* verilen grupta ise NO seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir. Böylece *L-NAME* tedavisinin serbest radikallerin salınımını azaltarak mesaneyi NO salınımına bağlı hasardan koruduğunu ileri sürmüşlerdir (242). Lemack ve arkadaşları farelerde MÇO süresince iNOS'un indüklendiğini belirtmişlerdir (243). Felsen ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, iNOS gen eksikliği olan ratlarda ve iNOS inhibitörü olan *aminoguanidine* tedavisi verilen ratlarda MÇO oluşturduktan sonra mesane fonksiyonlarını incelemişlerdir. iNOS'un inhibe edildiği gruplarda mesane fonksiyonlarının korunduğunu sistometrik ve histopatolojik olarak göstermişlerdir (244). Bizim yaptığımız çalışmada, MÇO oluşturulan sham grubunda iNOS' un kontrol grubuna göre ileri düzeyde anlamlı ($p<0.001$) olarak kat yüzdesinin arttığı görülmektedir. Literatür verilerine paralel olarak farklı dokulardaki I/R sonrasında iNOS düzeyindeki artışın bizim çalışmamızdaki MÇO'ya bağlı siklik I/R'de de arttığını görmekteyiz. Yayınlarda iNOS'la ilgili çelişkili bilgiler olmakla birlikte

bizim yapmış olduğumuz çalışmanın tüm parametrelerini değerlendirdiğimiz zaman iNOS artışının mesane hasarıyla ilgisi olduğunu görmekteyiz. ALA + MÇO grubunda sham grubuna göre iNOS düzeyindeki kat artışını ALA'nın istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı ($p<0.001$) olarak önlediğini tespit ettik. NO'ya bağlı olarak süperoksit ve peroksinitritin MÇO'da doku ve hücreler üzerinde ciddi zararlı etkisi olduğu ve ALA kullanımı ile bu zararlı etkileri önleyebileceğimizi düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar:

1. Dört hafta süre ile mesane çıkım obstrüksiyonu (MÇO) oluşturulan grupta, mesane duvar kalınlığı kontrol grubuna göre artmış olarak görüldü. Düz kas demetlerinin arasında ve tüm katlarda bağ dokusu artışı dikkat çekiciydi. Buna karşın düz kas miktarının azalmış olduğu belirlendi. MÇO + Silymarin grubunda, sham grubuyla benzer bulgular olduğu görüldü. Kollajen lifler, düz kas demetleri arasında yoğun olarak gözlemlendi. MÇO + ALA grubunda ise kontrol grubuyla benzer olarak, kollajen ve düz kas demetleri arasındaki oranın kısmen eşit olduğu belirlendi. ALA mesane düz kas oranını korumakta olup silymarinin ise aynı derecede etkinlik göstermediğini görmekteyiz.

2. Sham grubunda tip 3 kollajen, tip 1 kollajene göre de daha kuvvetli boyandığı gözlemlendi. MÇO + silymarin uygulanan grupta sham grubuyla benzer şekilde tip 3 kollajen dağılımı görüldü. Silymarinin tip 3 kollajende ki artışı engellemede yeterli etkisinin olmadığı görüldü. MÇO + ALA grubunda ise sham grubuna göre daha az tip 1 ve tip 3 kollajen boyanması belirlendi. Özellikle tip 3 kollajen boyanmasının belirgin olarak azaldığı gözlemlendi. ALA MÇO'da tip 3 kollajen artışını önleyerek mesanenin dekompanzasyon evresine gidişini önleyebilir.

3. Sham grubunda, kontrol grubuna göre mesane ağırlığındaki artışın ileri düzeyde önemli farklılık ($p<0,001$) gösterdiği ve mesane ağırlığının ortalama 6 kat arttığı görüldü. ALA ve Silymarin gruplarında mesane ağırlıklarının korunduğu ve sham grubuna göre bu farkın ileri düzeyde anlamlı olduğu görülmekte ($p<0,001$). ALA ve silymarin mesane duvar kalınlığı ve ağırlığını azaltarak siklik İ/R hasarını önleyebilir.

4. Kontrol grubunda düz kas oranı ortalama % 45 iken MÇO sonrası sham grubunda ortalama %27 olup düz kas oranı azalmıştır. Azalan düz kasın yerine kollajen birikmiş olup kontrol grubunda ortalama kollajen oranı % 18 iken sham grubunda ortalama % 38'dir. ALA ve silymarin gruplarında düz kas yüzdesinin korunduğu, kollajen artışının azaldığı ve bunun istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,001$). ALA düz kas/ kollajen oranını koruyarak mesane kasılma

fonksiyonlarının devamını sağlamakla birlikte yaşanan mesanelerde zaman içinde gelişebilecek mesane disfonksiyonlarını önleyebilir.

5. Sham grubunda kontrol grubuna göre tip 1 ve 3 kollajen oranlarının arttığı ancak tip 3 kollajendeki artışın istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu ($p<0.05$) görülmektedir. ALA ve silymarinin tip 1 kollajen oranını azalttığı ancak istatistiksel düzeyde anlamlı olmadığı ($p>0.05$), ALA'nın tip 3 kollajen oranındaki artışı önemli düzeyde önlediği ($p<0.05$) görülmektedir. Literatürlerde mesane disfonksiyonun önemli bileşeni olan tip 3 kollajen artışı ALA tedavisi ile önlenir. Dolayısıyla mesane fonksiyonlarının devamı sağlanabilir.

6. MÇO + Silymarin grubunda sham grubuna benzer yerlerde ve şekilde çok sayıda TUNEL (+) hücreler görüldü. MÇO + ALA grubunda ise kontrol grubuna benzer şekilde az sayıda TUNEL (+) hücreler görüldü. ALA ve Silymarin kullanılan gruplarda TUNEL(+) hücrelerin azaldığı ancak silymarin grubunda bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. ALA grubunda TUNEL(+) hücrelerdeki azalma istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıdır ($p<0.001$.) ALA MÇO'da apoptozisi engellemede oldukça etkindir.

7. Kontrol grubuna göre MÇO oluşturulan sham grubunda doku ve serum MDA düzeylerinin artışı ileri düzeyde anlamlı olarak görülmektedir ($p<0,001$). ALA ve Silymarin gruplarında ise sham grubuna göre doku ve serum MDA düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı olarak görülmüştür ($p<0,001$). ALA ve silymarin İ/R da SOR'a bağlı lipid peroksidasyonuna bağlı hücre hasarı gelişmesini önleyebilir. ALA ve silymarin İ/R da mesane hasarı gelişmesinde önleyici olabilir.

8. Doku TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna göre sham grubunda arttığı görülmekte ve ALA, silymarin gruplarında ise istatistiksel olarak çok önemli düzeyde azaldığı ($p<0.01$) görülmekte. Serum TNF- α düzeylerinin kontrol grubuna göre sham grubunda arttığı ve ALA, silymarin gruplarında ise azaldığı ve bu farkın istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.05$) olduğu görülmektedir. TNF- α diğer dokularda olduğu gibi mesane I/R hasarını değerlendirmede kullanılabilir. ALA ve silymarin İ/R'de pro inflamatuvar sitokinlerin artışını azaltarak mesane hasarını önlemektedir.

9. Doku ve serum IL-6 düzeyleri kontrol grubuna göre sham, ALA ve silymarin gruplarında artmıştı. Serum IL-6 düzeyindeki artış istatistiksel olarak anlamlı olmakla beraber doku IL-6 düzeylerinde gruplar arasında anlamlı farklılık yoktu.

10. MÇO' da iNOS düzeyinin arttığını ve I/R hasarından sorumlu etkenlerden birisi olduğunu görmekteyiz. ALA'nın iNOS yüzde kat artışını önleyerek ($p<0,001$) serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkışını azaltmakta ve dolayısıyla MÇO' da koruyucu etkisinin olduğunu düşünmekteyiz. Silymarin + MÇO grubunda ise iNOS yüzde kat artışını sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasada azalttığını bulduk

Öneriler:

MÇO, mesane yapı ve fonksiyonlarında bozulmaya yol açar. Üst üriner sistemi etkilemesiyle birlikte azotemi ve enfeksiyon gibi ciddi klinik bir tabloya neden olabilir. İnfravezikal obstrüksiyona sekonder mesane distansiyonu ve sonrasında uygulanan kateterizasyonda ve hatta her miksiyon siklusunda İ/R hasarına bağlı SOR'lar, dokuda hücre zedelenmesine neden olabilmektedir. Alfa bloker gibi medikal veya cerrahi yöntemlerle obstrüksiyon nedenleri giderilmeye çalışılsa da süreç içerisinde mesanede geri dönüşü olmayan hasarlar oluşabilmektedir. İ/R hasarıyla beraber mesane kasılabilirlik fonksiyonlarının bozulmasıyla birlikte dekompanzasyon evresinin gelişmesi sonrası MÇO'yu gidermeye yönelik cerrahi girişimler tatmin edici olmamaktadır.

MÇO' da ALA ve silymarin kullanarak mesane fonksiyonlarını I/R hasarına karşı korumayı amaçladık. ALA'nın mesane fonksiyonlarını korumada oldukça etkili olduğunu gördük. ALA'nın MÇO'da cerrahi tedavi öncesi veya cerrahi açıdan yüksek riski olup cerrahi işlem uygulanamayacak hastalarda ve alfa bloker tedavilerle kombine kullanımı önerilebilir. Geriatrik hasta grubunda yaşlanmaya bağlı mesane fonksiyonlarındaki azalmayı önlemek için koruyucu olarak kullanılması düşünülebilir. Silymarinin mesane fonksiyonları üzerine etkisiyle ilgili olarak ilk çalışmayı biz yaptık. Silymarinin, mesane fonksiyonlarını korumada yeterli düzeyde olmadığını bulduk. Ancak farklı yüksek dozlarda silymarinle ilgili çalışmalar yapılırsa etkinliği bulunabilir.

İdrar kontinansı, bireyin hayat konforunu ve yaşam standardını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Ortalama yaşam süresinin arttığı günümüzde BPH (Benign prostat hiperplazi) gibi infravezikal obstrüksiyonda ve yaşlanmayla birlikte

azalan mesane fonksiyonları sonucu mesane disfonksiyonu sık görülmektedir. MÇO'ya bağlı olarak mesane dekompanzasyonu, azotemi, detrüsr aşırı aktivitesi (DAA), üriner enfeksiyonlar gelişebilmektedir. Bu komplikasyon ve hastalıkların tedavisi için diyaliz, antikolinerjik, antibiyotik ve sürekli kateter kullanmak gerekebilir. Sağlık giderlerininin azaltılmasının ülkemiz ekonomisi açısından önemini düşünecek olursak ALA tedavisinin sağlık maliyetlerini azaltması yönünden önemi daha da artacaktır. Bu nedenle ALA koruyucu veya tedavi amacıyla mesane disfonksiyonunu önlemede kullanılabilcek umut verici bir ajan olabilir.

KAYNAKLAR

1. Grayback J. T, And Kozlowski J. M. Benign prostatic hyperplasia in Adult and Pediatric Urology. Editörler; J.Y. Gillenwater, J.T. Grayhack, S.S. Howards ve J.W. Duckett. Chicago: 1987 yılı basım. Sayfa: 1062–1126.
2. Wein A. J, Levin R. M. and Barrett D. M: Voiding function: relevant anatomy, physiology, and pharmacology. In: Adult and Pediatric Urology. Edited by J. Y. Gillenwater J. T, Grayhack S. S, Howards and Duckett J. W. Chicago: Year Book Medical Publishers, Inc. 1992; pp. 933–999.
3. Zderic SA, Levin RM, Wein AJ. Voiding function and dysfunction: relevant anatomy, physiology, pharmacology, and molecular aspects. In: Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS, Duckett JD (eds) Adult and pediatric urology, 3rd edn. Mosby Year Book, Chicago, 1996; pp 1159–1219.
4. Lin ATL, Chen MT, Yang CH et al. Blood flow of the urinary bladder—effects of outlet obstruction and correlation with energetic metabolism. J Urol. 1993; 149 (Suppl): 384, abstract 685.
5. Bratslavsky G, Kogan BA, Matsumoto S et al. Reperfusion injury of the rat bladder is worse than ischemia. J Urol. 2003;170: 2086–2090.
6. Parekh MH, Lobel R, O'Connor LJ, Leggett RE, Levin RM. Protective effect of vitamin E on the response of the rabbit bladder to partial outlet obstruction. J Urol. 2001 Jul;166(1): 341-6.
7. Lin AT, Chen KK, Yang CH, Chang LS. Mannitol facilitates rabbit urinary bladder recovery from overdistension injury. Urology. 2000;56 (4):702–7.
8. Saito M, Miyagawa I. Bladder dysfunction after acute urinary retention in rats. J Urol. 2001;165(5):1745–7.
9. Greenland JE, Brading AF. Urinary bladder blood flow changes during the micturition cycle in a conscious pig model. J Urol. 1996;156(5):1858–61.
10. Zderic SA, Levin RM, Wein AJ. Voiding function and dysfunction: relevant anatomy, physiology, pharmacology and molecular aspects. Editörler Gillenwater JY, Grayhack JT, Howards SS. Adult and Pediatric Urology.3. Chicago: Mosby Year Book, 1996; 1159.

11. Yanagi K. Effects of nitrit oxide on bladder outlet obstruction in rats. *Yonago Acta medica*. 2002; 19-26.
12. Brading AF. Alterations in the physiological properties of urinary bladder smooth muscle caused by bladder emptying against an obstruction. *Scand J Urol Nephrol Suppl*. 1997; 184: 51-58.
13. Sjuve R, Haase H, Morano I, et al: Contraction kinetics and myosin isoform composition in smooth muscle from hypertrophied rat urinary bladder. *J Cell Biochem*. 1996; 63:86.
14. Sahna E, Deniz E, Aksulu HE. Myocardial ischemia-reperfusion injury and melatonin. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2006; 6(2):163–8.
15. Moini H, Packer L, Saris NL. Antioxidant and prooxidant activities of a-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2002; 182: 84- 90.
16. Packer L, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20: 625-626.
17. Walters MD, Karan MM. *Clinical urogynecology*. Mosby. St. Louis, Missouri 1993; s. 3-16.
18. Copeland LT. *Textbook of gynecology*. W.B. Saunders, Philadelphia 1993; s. 35-47.
19. Langman J. *Medical embriology*. 13th.ed.Williams&Wilkins, Baltimore, 1994; s. 121
20. Andersson KE, Arner A. Urinary bladder contraction and relaxation: pshiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2004; 84: 935-986.
21. Brooks JD. Anatomy of the lower urinary tract and male genitalia. In: Walsh PC, Retik AB Vaughan ED, Wein AJ, editors. *Campbell’s Urology*. Eighth Edition, Volume 1. Philadelphia: Saunders, 2002; p.58–63.
22. Linsenmeyer TA. Neurogenic bladder following spinal cord injury. In: Kirshblum S, Ampagnolo DI, DeLisa JA, eds. *Spinal cord medicine*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002; 181–206.

23. Cabelin MA, Te AE, Kaplan SA. Urogenital physiology. In: Gonzalez EG, Myers SJ, Edelstein JE, Lieberman JS, Downey JA, eds. Downey & Darling's Physiological Basis of Rehabilitation Medicine. 3 th ed. Woburn: Butterworth-Heinemann, 2001; p.191–208.
24. Craggs MD, Vaizey CJ. Neurophysiology of the bladder and bowel. In: Fowler CJ, ed. Neurology of bladder, bowel, and sexual dysfunction. Woburn, MA: Butterworth-Heinemann,1999; 19–32.
25. Walsh PC, Retik AB, Kavoussi LR, Vaughan ED, Novick AC, Wein AJ, Partin AW, Peters CA: Mesane ve üretranın fizyoloji ve farmakolojisi. Campbell Üroloji, 8. baskı, sayfa: 831-887.
26. Harris DR, Marsh KA, Biringham AT, et al: Expression of muscarinic M3-receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis in human detrusor smooth muscle cells. J Urol. 1995;154:1241.
27. De Groat WC, Booth AM: Synaptic transmission in pelvic ganglia. In Maggi CA (ed): The Autonomic Nervous System, Vol 3, Nervous Control of the Urogenital System. London, Harwood Academic, 1993; pp 291-347.
28. Klevmark B: Motility of the urinary bladder in cats during filling at physiologic rates: Intravesical pressure patterns studied by a new method of cystometry. Acta Physiol Scand 1974; 90:565.
29. Langley LL, Whiteside JA: Mechanism of accommodation and tone of urinary bladder. J Neurophysiol 1951;14:147.
30. Macarak EJ, Howard PS: The role of collagen in bladder filling. Adv Exp Med BioH. 1999; 462:215.
31. Chang SL, Chung JS, Yeung MK, et al: Roles of the lamina propria and the detrusor in tension transfer during bladder filling. Scand J Urol Nephrol Suppl 1999; 201: 38.
32. Junqueira L.C, Corneiro. J, Kelley. R. O: Urinary system: Bladder; Basic histology, seventh edition. p: 458-459.

33. Eşrefoğlu M, Genel ve Özel Histoloji: Epitel dokusu, Pelikan yayıncılık Malatya 2004; sayfa 52, 261.
34. Cortivo R, Pagano F, Passerini G, et al: Elastin and collagen in the normal and obstructed urinary bladder. *Br J Urol.* 1981; 53: 134.
35. Macarak EJ, Ewalt D, Baskin L, et al: The collagens and their urologic implications. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 385:173.
36. Murakumo M, Ushiki T, Abe K, et al: Three dimensional Arrangement of collagen and elastin fibers in human urinary bladder: Scanning electron microscopic study. *J Urol.* 1995; 154:251.
37. Inoue T, Gabella G: A vascular network closely linked to the epithelium of the urinary bladder of the rat. *Cell Tissue Res.* 1991; 263: 137.
38. Hossler FE, Monson FC: Microvasculature of the rabbit urinary bladder. *Anat Rec.* 1995; 243: 438.
39. Batista JE, Wagner JR, Azadzo KM, et al: Direct measurement of blood flow in the human bladder. *J Urol,*1996;155:630.
40. Greenland JE, Brading AF: Urinary bladder blood flow changes during the micturition cycle in a conscious pig model. *J Urol.*1996;156:1858.
41. Ohnishi N, Kishima Y, Hashimoto K, et al: A new method of measurement of the urinary bladder blood flow in patienis with low compliant bladder. *Hinyokika Kiyō* 1994; 40: 663.
42. Levin RM, Brendler K, Van Arsdalen KN, Wein AI: Functional response of the rabbit urinary bladder to anoxia and ischaemia. *Neurourol Urodyn.* 1983; 2: 233.
43. Pessina F, McMurray G, Wiggin A, Brading AF: The effect of anoxia and glucose-free solutions on the contractile response of guinea-pig detrusor strips to intrinsic nerve stimulation and the application of excitatory agonis. *J Urol* 1997; 157:2375.
44. Brading AF: A myogenic basis for the overactive bladder. *Urology* 1997; 50: 57.

45. Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N, Temel Üroloji, Alt üriner obstrüksiyonlar (İnfravezikal obstrüksiyon), Üçüncü baskı, Güneş tıp kitapevi, sayfa: 285-287.
46. Gosling JA, Rung LS, Dixon JS, et all: Correlation between the structure and function of the rabbit urinary bladder following partial outlet obstruction. J Urol. 2000; 163:1349.
47. Sjuve R, Haase H, Morano I, et al: Contraction kinetics and myosin isoform composition in smooth muscle from hypertrophied rat urinary bladder. J Cell Biochem. 1996; 63: 86.
48. Sugaya K, Ogawa Y, Nishizawa O, de Groat WC: Decrease in intravesical saline volume during isovolumetric cystometry in the rat. Neurourol Urodyn 1997; 16:125.
49. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. British J of Surgery. 1994; 81: 637–647.
50. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. In: Schwartz SI, ed. Principles of Surgery. 7th Edition, Volume 1. New York: Mc Graw-Hill; 1999. p:13–32.
51. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. Circ Res. 2000; 86: 117–118.
52. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res. 2000; 39: 1529–1542.
53. Aker H. Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu. İç: Çevikbaş U. Temel Patoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2000.s.6–12.
54. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surgical Clinics of North America. 1992; Vol 72: 65–83.
55. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med. 1985; 312 (3):159-63.
56. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. J Pathol. 2000;190: 255–66.

57. Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischaemia and reperfusion. *J Appl.* 1993;74:1515–1520.
58. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in dogs. *J Clin Invest.* 1974; 54: 1496–508.
59. Quiñones-Baldrich WJ, Chervu A, Hernandez JJ, Colburn M, Moore WS. Skeletal muscle function after ischemia: "no reflow" versus reperfusion injury. *J Surg Res.* 1991;51 (1):5–12.
60. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury*. London: Blackwell Science; 1999. p: 3–19.
61. Banda MA, Lefer DJ, Granger DN. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule deficient mice. *Am J Physiol.* 1997; 273: 2721–5.
62. Jerome SN, Kong L, Korthuis RJ. Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle. *J Invest Surg.* 1994; 7:3–16.
63. Bathe OF, Chow AWC, Phang PT. Splachnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery.* 1998;123(1):79–88.
64. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-Reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988; 255: 1269–75.
65. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation.* 1999; 6: 167–78.
66. Teke Z, Kabay B, Özden A. İskemi-Reperfüzyon hasarının patofizyolojisi. *Pamukkale Medical Journal.* 2008;1: 65–72.
67. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury*. London: Blackwell Science; 1999.p. 3–19.
68. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6): 1133–1138.

69. Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg.* 1991;78: 651–5.
70. Davies MG, Juynh TTT, Hagen PO. Endothelial physiology. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury.* London: Blackwell Science;1999. p.157–79.
71. Karasawa A, Guo JP, Ma XL, Tsao PS, Lefer AM. Protective actions of a leukotriene B4 antagonist in splanchnic ischemia and reperfusion in rats. *Am J Physiol.* 1991;261(2 Pt 1):G191–8.
72. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. Effect of a nitric oxid synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(3): 892-6.
73. Bassenge E. Clinical relevance of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Br J Clin Pharmacol.* 1992; 34 (1):37-42.
74. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25 (4-5): 434-56.
75. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell.*1994; 78 (6): 915-8.
76. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* 2002;105 (2): 248-58.
77. Palmer RJM. Damar duvarında nitrik oksidin keşfi. *Cerrahi Arşivi* 1993; 2: 9-15.
78. Davies MG, Juynh TTT, Hagen PO. Endothelial physiology. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury.* London: Blackwell Science;1999. p.157–79.
79. Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant.* 2004; 2(1):174–7.

80. Semenzato G. Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer*. 1990; 61(3):354–61.
81. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation. *Crit Care Med*. 1993; 21(10 Suppl):447–63.
82. Donnahoo KK, Shames BD, Harken AH, Meldrum DR. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury. *J Urol*. 1999;162(1):196–203.
83. Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, Schneiter D, Weder W, Schmid RA. Combined treatment with endothelin- and PAF antagonists reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Heart and Lung Transp*. 1999;9: 862–868.
84. Kubes P, Ibbotson G, Russell J, Wallace JL, Granger DN. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol*. 1990; 259 (2 Pt 1):300–5.
85. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry*. 1984; 222:1–15.
86. Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect*. 1994;102 (Suppl 10):17–24.
87. Kako KJ. Free radical effects on membrane protein in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1987;19: (2): 209–11.
88. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek*. 2004;57 (9–10): 453–5.
89. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*. 2000; 39:1529–1542.
90. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2000; 9:647–652.
91. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):361–370.

92. Navari-Izzo F, Quartacci MF, Sgherri C. Lipoic acid: a unique antioxidant in the detoxification of activated oxygen species. *Plant Physiol. Biochem.* 2002; 40: 463-470.
93. Packer L, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1996; Vol 20: 625-626.
94. Evans J, Goldfine ID. a-lipoic acid: a multifunctional antioxidant that improves insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Technology&Therapeutics*, 2000; Vol: 2: 401-413.
95. Packer L. a-lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kB signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab Rev.* 1998; 30: 245- 275.
96. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition*, 2001; 17: 888-895.
97. Moini H, Packer L, Saris NL. Antioxidant and prooxidant activities of a- lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2002; 182: 84- 90.
98. Jones W, Li X, Qu ZC, Perriott L, Whitesell RR, May JM. Uptake, recycling and antioxidant actions of a-lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33: 83-93.
99. Arner ESJ, Nordberg J, Holmgren A. Efficient reduction of lipoamid and lipoic acid by mammalian thioredoxin reductase. *Biochem Biophys Res Commun.*1996; 225: 268-274.
100. Biewenga GP, Haenen GRMM, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmac.* 1997; 29: 315-331.
101. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology Medicine.* 2001; 31: 1287-1312.

102. Moini H, Packer L, Saris NL. Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2002; 182: 84- 90.
103. Packer L, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 1996; 20: 625-626.
104. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L. Dihydrolipoic acid a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol*. 1992; 44: 1637-1649.
105. Fraschini F, Demartini G. at Esposti D, *Pharmacology of Silymarin*, Clin Drug Invest, 2002, 22(1): 51-65 p.
106. Kren V, at Walterova D, *Silybin and Silymarin-new effects and applications*, Biomed Papers, 2005;149: (1) 29-41 p.
107. Kvasnincka F, Biba B, Sevcik M, Oldrich M. at Kratka J, *Analysis of the active components of silymarin*, Journal of Chromatography A, 2003;990: 239- 245.
108. Morazzoni P, Bombardelli E, 1995, *Silybum marianum (Carduus marianus)*, Fitoterapia 64, 3–42 p.
109. Filburn C.R, Kettenacker R. at Griffin D.W, *Bioavailability of a silybin phosphatidylcholine complex in dogs*. J. Vet. Pharmacol. Therap, 2007;30:132-138.
110. Gazak R, Walterova D. at Kren V. *Silybin and silymarin new and emerging applications in medicine*. Current Medicinal Chemistry. 2007; 14 (3): 315-38
111. Valenzuela A. at Garride A, 1994, *Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin*, Biol. Res, 27: 105-112 .
112. Valenzuela A. at Garride A. *Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin*. Biol. Res, 1994; 27: 105-112 p.

113. Dorai T. at Aggarwal B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy. *Cancer Lett*, 2004;215: 129–140 p.
114. Zi X. at Agarwal R. Silibinin decreases prostate-specific antigen with cell growth inhibition via G1 arrest, leading to differentiation of prostate carcinoma cells: implications for prostate cancer intervention. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96: 7490–7495 p.
115. Kang J.S, Jeon Y.J, Park S.K., Yang K.H. at Kim H.M. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin-1 and prostaglandin E2 synthesis by silymarin. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67: 175–181 p.
116. Kittur S, Wilasrusmee S, Pedersen W.A, Mattson M.P, Straube-West K, Wilasrusmee C, Jubelt B. at Kittur D.S. Neurotrophic and neuroprotective effects of milk thistle (*Silybum marianum*) on neurons in culture. *J Molec Neurosci*. 2002; 18, 265–269 p.
117. Soto C, Recoba R, Barron H, Alvarez C. at Favari L, Silymarin increases antioxidant enzymes in alloxan-induced diabetes in rat pancreas. *Comp Biochem Physiol C*. 2003; 136: 205–212 p.
118. Kang JS, Park SK, Yang KH, Kim HM. Silymarin inhibits TNF- α induced expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Lett*. 2002; 550, 89–93.
119. Mohan S, Dhanalakshmi S, Mallikarjuna GU, Singh RP, Agarwal R. Silibinin modulates UVB-induced apoptosis via mitochondrial proteins, caspases activation, and mitogen-activated protein kinase signaling in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 320: 183–189.
120. Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*. 1997; 21: 88–101.
121. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis; A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239–245.

122. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology*. 1995; 6: 3–16.
123. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*. 1997; 21: 88–101.
124. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol*. 1995;146: 3–15.
125. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*. 1993; 14:133–144.
126. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980;284:555–556.
127. Cohen JJ. Apoptosis. The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*. 1993;15:35–43.
128. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today*. 1993; 14:126–130.
129. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. *Pathology Annual*. 1982;17: 229–59.
130. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96(2):245–54.
131. Cooper GM. Programmed cell death. *The cell*. In: Cooper GM ed. Chapter 14. Washington: ASM Pres;1994.p.592–6.
132. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88:355–65.
133. Perkins AS, Stern DF. Apoptosis. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA eds. *Cancer Principle and Practice of Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997.p.96–100.
134. Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*. 1992;119:493–501.
135. Wyllie AH. What is apoptosis? *Histopathology*. 1986;10:995–8.
136. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267:1456–62.

137. Lewin B. Apoptosis. In: Lewin B (ed). Genes VI, Chapter 36. New York: Oxford University Press; 1997.p.1122–9.
138. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995;267:1449–56.
139. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997; 88:355–65.
140. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994;263:1759–62.
141. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of the tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995;83: 793–802.
142. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:433–5.
143. Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(11):1051–7.
144. Nakamura K, Bossy-Wetzell E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, Opas M, Bleackley RC, Green DR, Michalak M. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol*. 2000;150:731–740.
145. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*. 2001;276: 869–874.
146. Ulukaya E. 11/04/2003. Apoptozis Ders Notları. http://www20.uludag.edu.tr/~biokimya/apoptozis_ders_notu.pdf (08/05/2008)
147. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:14486–91.

148. Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998;187:587–600.
149. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22: 299–306.
150. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 1995; 5: 97–104.
151. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8: 68–75.
152. Hetts SW. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA.* 1998;278: 300–307.
153. Şehirli O, Şener E, Çetinel S, Yüksel M, Gedik N, Şener G. Alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 Mar;35(3): 249-55.
154. Kummer V, Maskova J, Canderle J, Zraly Z, Neca J. at Machala M. Estrogenic effects of silymarin in ovariectomized rats, *Vet. Med. Czech.* 2001; 46 (1): 17-23 p.
155. Cör A, Barbic M, Kralj B. Differences in the quantity of elastic fibres and collagen type I and type III in endopelvic fascia between women with stress urinary incontinence and controls. *Urol Res.* 2003 Jun;31(2):61-5.
156. Brent L. and Stephens F.D.: The response of smooth muscle cells in the rabbit urinary bladder to outflow obstruction. *Invest. Urol.* 1975, Vol; 12; 494.
157. Saito M, Wein A. and Levin R.M. Effect of partial outlet obstruction on contractility: comparison between severe and mild obstruction. *Neurourol. Urodyn.* 1993: Vol; 12: 573.
158. Mostwin J.L, Karim M.A, Van Koeveringe G. and Brooks E.L. The guinea pig model of gradual urethral obstruction. *J. Urol.* 1991. Vol; 145, 854.

159. Malmgren A, Uvelius B, Andersson K.E. and Andersson P. On the reversibility of functional changes induced by infra-vesical obstruction in the rat. *J. Urol.* 1990. Vol; 143: 1026.
160. Saito M, Longhurst P, Tammela T.L.J, Wein A.J. And Levin R.M. Effects of partial outlet obstruction of the rat urinary bladder on micturition characteristics, DNA synthesis and the contractile response to field stimulation and pharmacologic agents. *J. Urol.* 1993 Vol; 150, 1045.
161. Radzinski C, McGuire E.J, Smith D, Wein A.J, Levin R.M, Miller L.F. and Elbadawi A. Creation of a feline model of obstructive uropathy. *J. Urol.* 1991. Vol; 145, 859.
162. Ghoneim G.M., Aertker M.W., Sakr M.A., Shaaban A. M. and Shoukry M.S. A telemetric multichannel computer based system for monitoring urodynamic parameters in awake rhesus monkeys. *J. Urol.* 1997, Vol; 151: 7-4.
163. Speakman M. J, Brading A. F, Gilpin C. J, Dixon J. S, Gilpin S. A. and Gosling J. A, Bladder outflow obstruction-a cause of denervation supersensitivity. *J Urol.* 1987; Vol; 138: 1386.
164. Cendron M, Horton C.E, Karim O.M. A, Takishima H, Haberlik A, Mostwin J.L. and Gearhart J.P. A fetal lamb model of partial urethral obstruction: experimental protocol and results. *J. Ped. Surg.* 1994; Vol;29, 77.
165. Rohrman D, Monson F.C, Damaser M.S, Levin R.M, Duckett J.W. and Zderic S. A. Partial bladder outlet obstruction in the fetal rabbit. *J. Urol.* 1997; Vol; 158 1071.
166. Greenland JE, Hvistendahl JJ, Andersen H et al. The effect of bladder outlet obstruction on tissue oxygen tension and blood flow in the pig bladder. *BJU Int.* 2000; 85: 1109–1114.
167. Bratslavsky G, Whitbeck C, Horan P et al. Effects of in vivo ischemia on contractile responses of rabbit bladder to field stimulation, carbachol, ATP, and KCl. *Pharmacology.* 1999; 59: 221–226.
168. Bratslavsky G, Kogan B, Levin RM. Urethra is more sensitive to ischemia than bladder: evidence from an in vitro rat study. *J Urol.* 2001; 165:2086–2090

169. Azadzoï KM, Tarcan T, Kozłowski R et al. Overactivity and structural changes in the chronically ischemic bladder. *J Urol*. 1999; 162:1768–1778.
170. Gill HS, Monson FC, Wein AJ, Ruggieri MR, Levin RM. The effects of short-term in-vivo ischemia on the contractile function of the rabbit urinary bladder. *J Urol*. 1988;139(6):1350–4.
171. Das AK, Leggett RE, Whitbeck C, Eagen G, Levin RM. Effect of doxazosin on rat urinary bladder function after partial outlet obstruction. *Neurourol Urodyn*. 2002;21(2):160-6.
172. Güler G, Sınık Z, Turan T, Aybek H, Sert S, Tuncay L. Rat mesanesinde akut idrar retansiyonu sonrası gelişen iskemi reperfüzyon hasarının biyokimyasal olarak değerlendirilmesi. *Türk Üroloji Dergisi*. 2004; 30(4): 391-7.
173. Saito M, Miyagawa I. N(G)-nitro-L-arginine methylester, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes apoptosis induced by ischemia-reperfusion in the rat bladder. *Neurourol Urodyn*. 2002; 21(6):566–71.
174. Levin RM, Hypolite JA, Haugaard N, Wein AJ. Comparative response of rabbit bladder smooth muscle and mucosa to anoxia. *Neurourol Urodyn*. 1996;15(1):79–84.
175. Yenilmez A, Kilic FS, Sirmagul B, Isıklı B, Aral E, Oner S. Preventive effects of Ginkgo biloba extract on ischemia-reperfusion injury in rat bladder. *Urol Int*. 2007;78 (2):167–72.
176. Toklu H, Alican I, Ercan F, Sener G. The beneficial effect of resveratrol on rat bladder contractility and oxidant damage following ischemia/reperfusion. *Pharmacology*. 2006; 78 (1):44–50.
177. Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. Silymarin suppresses TNF-induced activation of NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol*. 1999; Vol: 163, 6800–6809 p.
178. Yoo H.G, Jung S.N, Hwang Y.S, Park J.S, Kim M.H., Jeong M, Ahn S.J, Ahn B.W, Shin B.A, Park R.K. at Jung Y.D. Involvement of NF- κ B and caspases in silibinin-induced apoptosis of endothelial cells. *Int J Molec Med*. 2004; Vol: 13, 81–86 p.

179. Kang J.S, Jeon Y.J, Park S.K, Yang K.H. at Kim H.M. Protection against lipopolysaccharide-induced sepsis and inhibition of interleukin- 1 and prostaglandin E2 synthesis by silymarin, *Biochem Pharmacol.* 2004; Vol;67, 175–181 p.
180. Katiyar SK, Korman NJ, Mukhtar H, Agarwal R. Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J Natl Cancer Inst.*1997, Vol;89, 556–66 p.
181. Tadatoshi H, Hiroshi N and Takayuki D. Effects of the selective acetylcholinesterase inhibitor TAK-802 on the voiding behavior and bladder mass increase in rats with partial bladder outlet obstruction. *The J. Urol.* 2005; Vol: 174, 1137-1141.
182. Hanai T, Ma F. H, Matsumoto S, Park Y.C. and Kurita T. Partial outlet obstruction of the rat bladder induces a stimulatory response on proliferation of the bladder smooth muscle cells. *International Urology and Nephrology.* 2002; Vol;34: 37–42.
183. Schröder A, Chichester P, Kogan BA, et al: Effect of chronic bladder outlet obstruction on blood flow of the rabbit bladder. *J Urol*, 2001; Vol; 165: 640-6.
184. Tekgül S, Bagli DJ, Carr M et al: Collagen type I and III localization by in-situ hybridization and immunohistochemistry in partially obstructed young rabbit bladder. 1995 Annual Meeting, American Academy of Pediatrics Section on Urology, Oct 13-16 San francisco, 1995.
185. Buttyan R, Jacobs B, Blaivas JG et al: The early molecular responds to rabbit bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn*,1992; 11: 253.
186. Nielsen KK. Changes in morphology, function and blood flow in mini-pig urinary bladder after chronic outflow obstruction and recovery from obstruction. *Scand J Urol Nephrol.* 1997; Vol; 195: 1-39.
187. Svobodov A, Psotov J, Walterov D. Flavonolignans prevent UVA-induced cytotoxicity in human keratinocytes. *J Photochem Photobiol.* 2005 – *submitted*.

188. Levin RM, Longhurst PA, Monson FC et al. Effect of bladder outlet obstruction on the morphology, physiology of the bladder. *Prostate*. 1990; Vol; 3: 9-26.
189. Levin RM, Haugaard N, O'Connor L, et al: Obstructive response of human bladder to BPH vs. rabbit bladder response to partial outlet obstruction: a direct comparison. *Neurourol Urodyn*, 2000; Vol; 19: 609-629.
190. Lewin RM, Manson FC, Haugaard N et al: Genetic and cellular characteristics of bladder outlet obstruction. *Urol Clin North Am*. 1995; Vol;22: 263.
191. Gilpin SA, Gosling JA, Barnard RJ: Morphological and morphometric studies of the human obstructed, trabeculated urinary bladder. *Br J Urol*. 1985; Vol; 57: 525- 529.
192. Oelke M, Höfner K, Jonas U, et al: Ultrasound measurement of detrusor wall thickness in healthy adults. *Neurourol Urodyn*. 2006; Vol; 25: 308-317.
193. Juan Y.S, Levin R.M, Chuang S.M, Hyderey T, Suning Li, Kogan B, Schuler C, Huang C.H and Mannikarottu A. The Beneficial Effect of Coenzyme Q10 and Lipoic Acid on Obstructive Bladder Dysfunction in the Rabbit. *The J. Urol*. 2008; Vol;180: 2234-2240.
194. Matsumoto S, Hanai T, Uemura H and Levin R.M. Effects of chronic treatment with vardenafil, a phosphodiesterase 5 inhibitor, on female rat bladder in a partial bladder outlet obstruction model. *BJU Int*. 2008; Vol;103: 987 – 990.
195. Levin R.M, Riffaud J. P, Bellamy F, Rohrma D, Habib M and et all. Protective effect of tadenan on bladder function secondary to partial outlet obstruction. *The J. Urol*. 1996; Vol;155: 1466-1470.
196. Mitesh H.P, Lobel R, Laura J. O'Connor, Leggett R.E, and Levin R.M. Protective effect of vitamin E on the response of the rabbit bladder to partial outlet obstruction. *The J. Urol*. 2001; Vol; 166: 341-346.
197. Juan Y.S, Mannikarottu A, Chuang S.M, Li S, Lin A.D, Chang-Chou L, Schuler C, Leggett R.E, Levin R.M. Protective effect of Antrodia Camphorata on bladder ischemia/reperfusion injury. *Int Urol Nephrol*. 2009; DOI 10.1007/s 11255-009-9642.

198. Radzinski C, McGuire EJ, Smith D, et al: Creation of a feline model of obstructive uropathy. *J Urol.* 1991; Vol;145: 859-863, 60.
199. Zimmerman BJ, Granger DN: Reperfusion injury. *Surg Clin N.* 1992; Vol;72: 65-8.
200. Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA: Ischemia reperfusion injury: Role of oxygen derived free radicals. *Acta Physiol Scand.* 1986; Vol;548: 47-51.
201. Sussman MS, Bulkey GB: Oxygen-Derived free radicals in reperfusion injury. *Methods in Enzymology*, 1990; Vol; 86: 711-4.
202. Matsumoto S, Hanai T, Yoshioka N, Shimizu N, Sugiyama T, Uemura H, Levin RM. Edaravone protects against ischemia/reperfusion-induced functional and biochemical changes in rat urinary bladder. *Urology.* 2005; 66 (4): 892-6.
203. Taş N, Bakar B, Kasımcı M.O, Gazyağcı S, Ayva S.K, Kılınç K, Evliyaoğlu Ç. Evaluation of protective effects of the alpha lipoic acid after spinal cord injury. *İnjury Int. J.* 2010; 4303 pages 7.
204. Saito M, Miyagawa I. Bladder dysfunction after acute urinary retention in rats. *J Urol.* 2001 May;165(5): 1745-7.
205. Shimizu S, Saito M, Kinoshita Y, Kazuyama E, Tamamura M, Satoh I and Satoh K. Acute urinary retention and subsequent catheterization cause lipid peroxidation and oxidative DNA damage in the bladder: preventive effect of edaravone, a free-radical scavenger. *BJU Int.* 2009; Vol;104: 713-717.
206. Üstüner M.C, Kabay Ş, Özden H, Güven G, Yücel M, Olgun E.G, Üstüner D, Ünal N, ve Değirmenci İ. The Protective Effects of Vitamin E on Urinary Bladder Apoptosis and Oxidative Stress in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *Bladder Physiology, Urology*, 2010; Vol; 75: 902–906.
207. Tarek M.K. Motawi, Nermin A.H. Sadik, Ayat Refaat. Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: An experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder *Food and Chemical Toxicology*, 2010; Vol; 48: 2326–2336.

208. Matsumoto S, Chichester P, Kogan BA, Levin RM. Structural and vascular response of normal and obstructed rabbit whole bladders to distension. *Urology* 2003; Vol; 62: 1129-33.
209. Tanagho EA. Urinary obstruction and stasis. *Smith's General Urology*, 16. Baskin, Tanagho EA (Ed.), McAninch JW, 2004; p. 175-87.
210. Bauer SB. The effects and challenges of bladder outlet obstruction. *J Urol* 2000; Vol; 163:3.
211. Kondo A, Susset JG. Viscoelastic properties of bladder. *Invest Urol*.1974; Vol; 11: 459–65.
212. Ewalt DH, Howard PS, Blyth B, Snyder HM, Duckett JW, Levin RM, Macarak EJ. Is lamina propria matrix responsible for normal bladder compliance? *J Urol*.1992; Vol;148: 544–9.
213. Linsenmayer TF. Collagen. In: Hay ED, editor. *Cell biology of extracellular matrix*. New York: 1991; Plenum Press. pp 7–44.
214. Macarak EJ, Ewalt D, Baskin L, et al: The Collagens and their urologic implications. *Adv Exp Med Biol* 1995; 385: 173.
215. Landau EH, Jayanthi VR, Churchill BM, et al: Loss of elasticity in dysfunctional bladders: Urodynamic and histochemical correlation. *J. Urol*.1994; 152:702.
216. Uvelius B, Mattiasson A: Detrusor collagen content in the denervated rat urinary bladder. *J. Urol*. 1986;136:1110.
217. Lepor H, Sunayardi I, Hartanto V, Shapiro E: Quantative morphometry of the adult human bladder. *J. Urol*. 1989; 148: 414.
218. Levy BJ, Wight TN: Structural changes in the aging submucosa: New morphologic criteria for the evaluation of the unstable human bladder. *J. Urol*. 1990;144:1044.
219. Mirone V, Imbimbo C, Sessa G, Palmieri A, Longo N, Granata AM, Fusco F. Correlation between detrusor collagen content and urinary symptoms in patients with prostatic obstruction. *J Urol*. 2004; Oct;172 (4 Pt 1):1386-9.

220. Matsubara T, Ziff M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol.* 1986;137:3295–3298.
221. Şehirli O, Şener E, Çetinel S, Yüksel M, Gedik N, Şener G. Alpha-lipoic acid protects against renal ischaemia-reperfusion injury in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008 Mar; 35 (3): 249-55.
222. Luper S. A review of plants used in the treatment of liver disease: part I. *Altern Med Rev* 1998; Vol; 3: 410-21.
223. Dehmlow C, Erhard J, De Groot H. Inhibition of kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 1996; 23: 749 -54.
224. De la Puerta R, Martinez E, Bravo L, et al. Effect of silymarin on different acute inflammation models and on leukocyte migration. *J Pharm Pharmacol* 1996; 48: 968-70.
225. Hacıoglu A, Algin C, Pasaoglu O, Pasaoglu E, Kanbak G. Protective effect of leptin against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *BMC Gastroenterol.* 2005; 5:37.
226. Erkasap N, Uzuner K, Serteser M, Köken T, Yenilmez A. Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats. *Peptides.* 2003; 24(8): 1181–7.
227. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest.* 1990;85(6):1936–43.
228. Saito M, Miyagawa I. N(G)-nitro-L-arginine methylester, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes apoptosis induced by ischemia-reperfusion in the rat bladder. *Neurourol Urodyn.* 2002; 21 (6):566–71.
229. Aikawa K, Sugino T, Matsumoto S, Chichester P, Whitbeck C, M.levin R. The effect of ovariectomy and estradiol on rabbit bladder smooth muscle contraction and morphology. *J Urol.* 2003; 170: 634-637.

230. Emmez H, Yildirim Z, Kale A, Töngge M, Durdağ E, Börcek AO, Uçankuş LN, Doğulu F, Kiliç N, Baykaner MK. Anti-apoptotic and neuroprotective effects of alpha-lipoic acid on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Acta Neurochir (Wien)*. 2010 Sep;152 (9): 1591-600.
231. Liu P Hock CE, Nagele R, Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol*. 1997 May;272(5 Pt 2): H2327-36.
232. Elbadawi A, Meyer S. and Regnier C. H. Role of ischemia in structural changes in the rabbit detrusor following partial bladder outlet obstruction. *Neurourol Urodyn*. 1989; Vol; 8: 151,
233. Bing R. and Suzuki H. Myocardial infarction and nitric oxide. *Mol Cell Biochem*. 1996; Vol;160/161: 303.
234. Hangai M, Yoshimura Y, Hiroi K, Mandai M. and Honda Y. Inducible nitric oxide synthase in retinal ischemia-reperfusion injury. *Exp Eye Res*. 1996; Vol; 63: 501.
235. Vinas L.J, Sola A, Genesca M, Alfaro V, Pi F, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia reperfusion, *Free Radical Biology & Medicine*. 2006; Vol; 40: 992-1003.
236. Mark L.A, Robinson A.V, Schulak J.A. Inhibition of Nitric Oxide Synthase reduces Renal Ischemia/Reperfusion Injury, *Journal of Surgical Research*. 2005; Vol; 129: 236-241.
237. Conger J, Robinette J, Villar A et al. Increased nitric oxide synthase activity despite lack of response to endothelium- dependent vasodilators in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest*. 1995; Vol; 96: 631–638.
238. Darley-USmar V, Wiseman H, Halliwell B et all. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett*. 1995; Vol; 369:131–135.
239. Muijsers RB, Folkerts G, Henricks PA et all. Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci*. 1997; Vol; 60: 1833–1845.

240. Dimmeler S, Zeiher AM: Nitric oxide and apoptosis: Another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1997; Vol; 1: 275–281.
241. Bae EH, Lee KS, Lee J, Ma SK, Kim NH, Choi KC, Frøkiaer J, Nielsen S, Kim SY, Kim SZ, Kim SH, Kim SW. Effects of alpha-lipoic acid on ischemia-reperfusion-induced renal dysfunction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008 Jan; 294 (1): F272–80.
242. Connors W, Whitebeck C, Chicester P, Legget L, Lin AD, Johnson A, Kogan B, Levin R, Mannikarottu A. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes oxidative damage in urinary bladder partial outlet obstruction. *Am j Physiol Renal Physiol*. 2006; 290 (2): 357–63.
243. Lemack G. E, Burkhard F, Zimmern P. E, McConnell J. D. and Lin V. K. Physiologic sequelae of partial infravesical obstruction in the mouse: role of inducible nitric oxide synthase. *J Urol*. 2000;Vol; 161: 1015.
244. Felsen D, Dardashti K, Ostad M, Lemer ML, Gross SS, Chen J, Vaughan ED Jr, Poppas DP. Inducible nitric oxide synthase promotes pathophysiological consequences of experimental bladder outlet obstruction. *J Urol*. 2003 Apr;169 (4): 1569-72.