

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

**MESANEDE İSKEMİ/REPERFÜZYON OLUŞTURULAN
RATLARDA LEPTİN'İN APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Mehmet HAMARAT

**Üroloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ESKİŞEHİR
2008**

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

**MESANEDE İSKEMİ/REPERFÜZYON OLUŞTURULAN
RATLARDA LEPTİN'İN APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Mehmet HAMARAT

**Üroloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Aydın YENİLMEZ**

**ESKİŞEHİR
2008**

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,**

Dr. Mehmet HAMARAT'a ait "Mesanede İskemi/Reperfüzyon Oluşturulan Ratlarda Leptin'in Apoptozis Üzerine Etkisi" isimli tez çalışması Jürimiz tarafından Üroloji Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 27.05.2008

Jüri başkanı	Prof. Dr. Metin KALE Üroloji Anabilim Dalı	İmza
Üye	Prof. Dr. Turgut DÖNMEZ Üroloji Anabilim Dalı	İmza
Üye	Doç. Dr. Aydın YENİLMEZ Üroloji Anabilim Dalı	İmza

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurul'unun 06.06.2008
Tarih ve 24/23 Sayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda almış olduğum uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana destek veren ve tezimin hazırlanmasında her türlü yardımı benden esirgemeyen tez danışmanım Doç.Dr. Aydın YENİLMEZ'e teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım. Bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve eğitimimde büyük emekleri olan sayın hocalarım Prof. Dr. Metin KALE, Prof. Dr. Turgut DÖNMEZ, Doç. Dr. Cavit CAN ve Yrd. Doç. Dr. Mehmet TURGUT'a, ayrıca ihtisas eğitimimin ilk yıllarında birlikte çalışma fırsatı bulduğum değerli hocam Prof. Dr. Yusuf ÖZYÜREK'e, asistanlığın tüm yorucu ve sıkıntılı anlarını beraber paylaştığım değerli asistan arkadaşlarıma ve eğitimim süresince birlikte emek verdiğimiz tüm hemşire ve sağlık personeline teşekkür ederim. Ayrıca tez konumun planlanmasında yardım ve desteğini esirgemeyen Doç. Dr. Nilüfer ERKASAP'a, en zor dönemlerde yardım elini uzatan Prof. Dr. Erinç ARAL'a, biyokimyasal analizleri yapan Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. öğretim üyesi Doç. Dr. Tülay KÖKEN'e ve tezin istatistiksel değerlendirmesini yapan Yrd. Doç. Dr. Canan DEMİRÜSTÜ'ne teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Hamarat M: ‘Mesanede İskemi/Reperfüzyon Oluşturulan Ratlarda Leptin’in Apoptozis Üzerine Etkisi’. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2008. **Amaçlar:** Ratlarda mesane İskemi/Reperfüzyon (İ/R) hasarına leptinin koruyucu etkisini immünohistokimyasal yöntemlerle apoptozis üzerinden değerlendirmek. **Yöntemler:** Bu deneysel çalışmada 24 adet *Sprague-Dawley* cinsi albino ratlar kullanıldı. Deney grupları 8'er adet ratdan oluşmaktaydı.

Grup I (n=8): Kontrol Grubu, **Grup II (n=8):** İ/R Grubu, **Grup III: (n=8):**Leptin + İ/R Grubu

Kontrol grubundaki ratlara herhangi bir işlem uygulanmaksızın alt abdominal kesi ile mesaneleri çıkarıldı. İ/R grubunda iskemi oluşturmak için aort bifurkasyonun hemen üzerinden abdominal aorta 45 dk. oklüze edildi, takiben 60 dk. reperfüzyon yapıldı. L+İ/R grubunda ise iskemi başlatılmadan 30 dk. önce intra-peritoneal leptin uygulandı. Her iki grupta reperfüzyon süresinin sonunda ratlar sakrifiye edilerek mesane dokuları alındı. Doku malondialdehit (MDA) ve TNF- α düzeyleri ile biyokimyasal, ışık mikroskopunda Hematoksilen&Eozin boyama ile histopatolojik, TUNEL ve bcl-2 boyama yöntemleriyle de apoptozis değerlendirildi. **Sonuçlar:** İ/R grubunda artan doku MDA ve TNF- α düzeyleri leptin tedavisi verilen (L+İ/R) grupta önemli derecede azalmıştı ($p<0.01$). Histopatolojik olarak gruplar karşılaştırıldığında leptin verilen tedavi grubunda (L+İ/R), polimorf nüveli lökosit (PNL) infiltrasyonu ve konjesyonda azalma tespit edildi. Ürotelyum, stroma ve kas dokusundaki TUNEL pozitif hücre sayıları İ/R grubunda belirgin olarak arttığı saptanırken, leptin verilen tedavi grubunda ise azalma gözlemlendi ($p<0.01$). Bcl-2 ile yapılan immünohistokimyasal boyama yönteminde İ/R grubunda sık rastlanan apoptotik hücrelerin, L+İ/R grubunda daha az izlendiği saptandı. Verilerimiz leptinin rat mesanesinde İ/R hasarı üzerine koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: İskemi/Reperfüzyon, rat, mesane, leptin, apoptozis

Destekleyen Kurum: T.İ.C.A.M

ABSTRACT

Hamarat M: 'Effects of Leptin on Apoptosis in Rats with Induced Ischemia/Reperfusion in Bladder. Osmangazi University Medical Faculty, Department of Urology, Thesis for Medical Speciality, Eskisehir, 2008.

Objective: To investigate the protective effect of leptin in rats with induced ischemia/reperfusion (I/R) in bladder using immunohistochemical methods for apoptosis and biochemical parameters. **Methods:** In this experimental study, 24 albino rats from *Sprague-Dawley* genus were used. Each experimental group contained 8 rats.

Group I (n=8): Control Group, **Group II (n=8):** I/R Group, **Group III: (n=8):**Leptin + I/R Group

Bladders of rats in control group were removed using lower abdominal incision without performing any procedure. In I/R group, abdominal aorta was occluded just upper side of aortic bifurcation for 45 minutes for inducing ischemia, and then reperfusion was performed for 60 minutes. In L+I/R group, intraperitoneal leptin was administered 30 minutes before inducing ischemia. In both group, rats were sacrificed at the end of the reperfusion and their bladders were removed. Biochemical assessments were performed using tissue malondialdehyde (MDA) and TNF- α levels, histopathological assessments using Hematoxylin&Eosin staining in light microscope, apoptosis assesment using TUNEL and bcl-2 staining. **Results:** Tissue MDA and TNF- α levels were increased in I/R group, but were significantly decreased in group treated with leptin (L+I/R) ($p<0.01$). Histopathological comparison of the groups showed a decrease both in polymorphonuclear leukocytes and congestion in L+I/R group. TUNEL-positive cell counts in urothelium, stroma and muscle tissue were significantly increased in I/R group, but decreased in leptin group ($p<0.01$). With immunohistochemical staining using Bcl-2, apoptotic cells were seen frequently in I/R group, but less frequent in L+I/R group. Our findings showed that leptin had a protective effect on I/R injury in rat bladder.

Key words: ischemia/reperfusion, rat, bladder, leptin, apoptosis

Supporting organisation: T.I.C.A.M.

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLOLAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Mesane Anatomisi	3
2.2. Miksiyon Fizyolojisi	4
2.3. İskemi/Reperfüzyon (İ/R) Hasarı	5
2.4. İ/R Hasarına Karşı Oluşan Savunma Mekanizmaları	14
2.5. Leptin	17
2.6. Apoptozis	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Hayvanlar ve Diet	43
3.2. Deney Protokolü	43
3.3. Biyokimyasal Değerlendirme	45
3.4. Histopatolojik Değerlendirme	45
3.5. İstatiksel Değerlendirme	48
4. BULGULAR	49
4.1. Biyokimyasal Bulgular	49
4.2. Histopatolojik Bulgular	52
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	70
KAYNAKLAR	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	Adrenokortikotropik hormon
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
H₂O₂	Hidrojenperoksit
IL	İnterlökin
İ/R	İskemi/Reperfüzyon
JAK-STAT	Janus Kinases Signal Transducers and Activators of Transcription
KDa	Kilodalton
LH	Lüteinizan Hormon
MDA	Malondialdehit
µgr	Mikrogram
ng	Nanogram
NO	Nitrik oksit
O₂⁻	Süperoksit radikali
OH⁻	Hidroksil radikali
PNL	Polimorf Nüveli Lökosit
SOD	Süperoksit Dismutaz
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. İskemide erken fazdaki değişiklikler.	6
Şekil 2. 2. İskemik dokularda ksantin oksidaz yolu ile SOR üretimi.	8
Şekil 2. 3. Dismutasyon reaksiyonu.	12
Şekil 2. 4. Fenton reaksiyonu, Haber-Weiss reaksiyonu.	12
Şekil 2. 5. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve antioksidan mekanizmalar.	17
Şekil 2. 6. Leptin reseptörünün aktivasyonu.	19
Şekil 2. 7. Leptinin hematopoez ve immun sisteme etkileri.	23
Şekil 2. 8. Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar.	28
Şekil 2. 9. İntrensek ve ekstrensek sinyal yolu tetikleyicileri.	31
Şekil 2. 10. Fas ve TNF ölüm reseptör ve aktivatörleri.	32
Şekil 2. 11. İntrensek apoptotik sinyal yolu.	33
Şekil 2. 12. Apoptozisteki olayların şematik görünümü.	35
Şekil 2. 13. Bax / Bcl-2'nin etki mekanizması.	37
Şekil 4. 1. Gruplara göre doku MDA düzeylerinin ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması.	50
Şekil 4. 2. Gruplara göre doku TNF- α düzeylerinin ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması.	52
Şekil 4. 3. Ürotelyumda apoptotik hücrelerin gruplara göre dağılımının grafiksel karşılaştırılması.	54
Şekil 4. 4. Stromadaki apoptotik hücrelerin gruplara göre dağılımının grafiksel karşılaştırılması.	55
Şekil 4. 5. Kas dokusunda apoptotik hücrelerin gruplara göre dağılımının grafiksel karşılaştırılması.	55
Şekil 4. 6. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde normal görünümlü çok katlı değişici epitel ve lamina propria.	56
Şekil 4. 7. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada çok nadir gözlenen stromal apoptoz gösteren hücre. TUNEL boyama.	57
Şekil 4. 8. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada çok nadir gözlenen bcl-2 pozitif stromal hücre.	57

Şekil 4. 9.	İ/R grubunda çok katlı değişici epitelde bazı hücrelerde dejenerasyon ile lamina propriada çok sayıda PNL infiltrasyonu.	58
Şekil 4. 10.	İ/R grubunda lamina propriada vasküler dilatasyon ve konjesyon.	58
Şekil 4. 11.	İ/R grubunda l.propriada çok sayıda stromal apoptoz gösteren hücreler.	59
Şekil 4. 12.	İ/R grubuna epitelyal ve l.propriada çok sayıda stromal apoptoz gösteren hücreler. TUNEL boyama.	59
Şekil 4. 13.	İ/R grubunda lamina propriada stromal bcl-2 pozitif hücreler.	60
Şekil 4. 14.	İ/R grubunda kas hücreleri arasında bcl-2 pozitif hücreler.	60
Şekil 4. 15.	Leptin+İ/R grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada PNL, vasküler dilatasyon ve konjesyonun azaldığı gözlenmekte.	61
Şekil 4. 16.	Leptin+İ/R grubuna ait mesane kesitinde epitelyal ve lamina propriada az sayıda stromal apoptoz gösteren hücreler. TUNEL boyama.	62
Şekil 4. 17.	İ/R+Leptin grubunda lamina propriada az sayıda stromal apoptotik hücreler. TUNEL boyama.	62
Şekil 4. 18.	İ/R+Leptin grubuna ait mesane kesitinde az sayıda epitelyal ve lamina propriada stromal bcl-2 pozitif apoptotik hücreler.	63

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2. 1. Leptin sentezini etkileyen faktörler.	20
Tablo 2. 2. Nekrozis ve apoptozis ve arasındaki farklılıklar.	29
Tablo 2. 3. Bcl-2 ailesi.	38
Tablo 2. 4. Apoptozis ile hastalıkların ilişkisi .	40
Tablo 4. 1. Doku MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı	49
Tablo 4. 2. Gruplara göre doku MDA düzeylerinin ortalama ve standart hata değerleri.	50
Tablo 4. 3. Doku TNF- α düzeylerinin gruplara göre dağılımı.	51
Tablo 4. 4. Gruplara göre doku TNF- α düzeylerinin ortalama ve standart hata değerleri.	51
Tablo 4. 5. Tüm grupların ürotelyum, stroma ve kas dokularındaki apoptotik hücre sayıları.	53
Tablo 4. 6. Gruplara göre apoptotik hücre sayılarının ürotelyum, stroma ve kas dokusundaki ortalama ve standart hata değerleri.	53

1.GİRİŞ

İskemi/Reperfüzyon (İ/R) hasarı dokularda yeterli oksijen (O_2) sağlanamamasının tetiklediği bir hücrel olaylar dizisidir, sonuçta tüm organlar ve sistemler etkilenir. Son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan konulardan biridir. Klinik olarak İ/R hasarı; organ transplantasyonu, travma, vasküler ve intestinal cerrahide önem kazanmaktadır (1).

Mesane fonksiyonu idrarı depolamak ve uygun bir zamanda boşaltmaktır. Mesane homeostazı ve uygun fonksiyonun devamlılığı için arteriyel akım içerisinde yeterli oksijen ve besin desteğine ihtiyaç vardır, aynı zamanda venöz drenaj ile de atık ürünlerin uzaklaştırılması gerekmektedir (2-4). İdrar retansiyonu, aterosklerozis, vazospazm, embolizasyon ve trombozis gibi yaş ile ilişkili bozukluklarda mesanede iskemik ve reperfüzyon gözlenmiştir (2-7). Ayrıca geniş major pelvik organ cerrahisinin alt üriner sistemde sıklıkla disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir (3,4). Ateroskleroz ya da travmaya bağlı kan akımındaki azalma sonucunda mesane iskemisi gelişir. Bu durum mesane fonksiyonu esnasında kompliyansda bozulmalara ve sonuçta mesane disfonksiyonu gelişmesine sebep olabilir. Mesanede artmış duvar kalınlığının her miksiyonda siklik bir İ/R'na aracılık ettiği gösterilmiştir (8). Akut overdistansiyon ya da retansiyon ile ardından yapılan dekompresyon veya kateterizasyondan sonra görülen mesane disfonksiyonuna İ/R'un neden olduğu bildirilmiştir (9,10). Organ banyo teknikleri ve histolojik çalışmalarla da İ/R'nun mesane fonksiyonunu anlamlı şekilde bozduğu rapor edilmiştir (6,7).

İskemik sonrası reperfüzyon hasarlı dokuların iyileşmesi için bir önkoşul olmasına rağmen hasarı daha da arttırabilmektedir (11). İskemik dokunun reperfüzyonu ve yeniden oksijenizasyonu hücre zarlarının lipid peroksidasyonuna neden olur ve çeşitli hücre fonksiyonlarının değişimine sebep olan serbest oksijen radikallerini (SOR) üretir (4,12). Reperfüzyon ile iskemik dokuda oluşan SOR'nin bu hasardan sorumlu olduğu ortaya konulmuştur (13). Mesane aşırı distansiyondan sonra kateterizasyonun reperfüzyon hasarını başlattığı ve SOR bu hasardaki ana faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir (9,14). Bu sebeple iskemik

sonrası gelişen organ disfonksiyonunu önlemek için SOR'nin azaltılması ile ilk klinik uygulama başlatılmıştır.

Son yapılan çalışmalarda İ/R hasarına bağlı olarak gelişen serbest oksijen radikalleri ve peroksinitritinin düz kas, mukoza ve periferik sinirler gibi mesane bileşenlerini etkileyerek, mesane disfonksiyonuna ve mesane instabilitesine neden oldukları gösterilmiştir. Mannitol ve E vitamini gibi serbest radikal temizleyicilerinin mesane disfonksiyonuna bağlı İ/R hasarından veya parsiyel çıkım tıkanıklığından koruduğu rapor edilmiştir (5,9).

Leptin, obezite (ob) gen ürünü olan 167 aminoasit içeren, 16 kilo Dalton (kDa) molekül ağırlığında, yağ dokusunun yanı sıra birçok dokudan salınan bir polipeptiddir. Leptinin santral ve periferik birçok etkisi vardır (15,16). Sitokinlerin proliferatif aktivitesini arttırdığı ve apoptozisi inhibe ettiği bildirilmiştir (17,18). Leptin ile ilgili son çalışmalar anjiyogenetik özelliğinin yanı sıra endotel hücrelerinden nitrik oksit (NO), salınımını arttırarak vazodilatasyon oluşturması gibi etkileri de olduğu saptanmıştır (19). Leptinin anti-oksidan enzimler olan *katalaz*, *glutasyon peroksidaz* (GSH-Px), *glutasyon redüktaz* düzeylerini arttırarak direkt olmasa da dolaylı yoldan anti-oksidan etkinliği gösterilmiştir (20).

İnce bağırsak (21), mide (22), böbrek (23) gibi birçok dokuda leptinin İ/R hasarına karşı koruyucu etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda İ/R hasarına karşı leptinin koruyucu etkinliği rapor edilmiştir. Ancak mesanedeki İ/R hasarına karşı leptinin koruyucu etkisinin olup olmadığını gösteren herhangi bir çalışmaya literatürde rastlayamadık.

Fizyolojik ya da birçok stres ve hasar tarafından başlatılan programlı hücre ölümü süreci olan apoptozisin, birçok sistemde uygun fonksiyon ve homeostazın devamı için önemli olduğu bilinmektedir (24).

Bu çalışmada mesanede oluşturulan İ/R hasarına karşı leptinin koruyucu etkisini değerlendirmeyi amaçladık. Leptinin koruyucu etkisini gösterebilmek için histopatolojik olarak Hematoksilen-Eozin (H&E), TUNEL ve bcl-2 boyama yöntemlerini, biyokimyasal olarak da doku TNF- α ve MDA düzey ölçümlerini kullandık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Anatomisi

Mesane, büyüklüğü ve şekli kişinin yaşına, cinsine ve içeriğinin miktarına bağlı olarak değişen idrar deposudur. Pelvis boşluğunun tabanında yer alır. Kas ve zarlardan yapılmıştır. Yaklaşık 500 ml kadar idrar depolayabilir. Endodermal kaynaklı düz kas yapısında detrusör adelesi ve mezodermal kaynaklı trigon bölümünden oluşur. 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 uretra 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.

Tunica seroza organın üst yüzünü kaplayan peritondur. Diğer bir deyişle mesane peritonun arkasında kalan retroperitoneal bir organdır. Antero-inferior ve lateralde mesane retropubik bu 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 uretra ön vajinal duvara yaslanır. Erkeklerde ise mesanenin tabanı rektumla, aralarında fasya rektovezikalis (Denonviller fasyası), seminal veziküller ve vaz deferensin ampullası ile terminal üretere komşudur. Mesane boynu pelvik fasyaya sıkı bir şekilde fiksedir ve prostat ile devam eder. Mesanenin kas tabakası (detrusör), içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler seyirli olmak üzere üç katmanlıdır. 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 urethra 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 ureter 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.

2.1.1. 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.

2.1.2. 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) (25).

2.2. Miksiyon Fizyolojisi

Normal miksiyon, duyuusal bilgi mesanenin dolduğunu ilettiğinde fiziksel ve sosyal olarak 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 (26,27). 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

(27). Depolama evresinde düşük mesane içi basınçlarda hipogastrik–pudendal (sempatik) sinirler, yüksek mesane içi basınçlarda (>15 cmH₂O) pelvik–pudendal sinirler aracılığı ile detrüörün refleks inhibisyonu sağlanır (28). Sakral segment arka boynuzuna gelen afferent aktivite ara nöronlar tarafından baskılanabilir. Kapı–kontrol teorisi olarak açıklanan, kalın somatik duysal lifler ile ince mesane afferentleri (A δ ve C) arasındaki inhibitör etkileşim de buna katkıda bulunur. Boşaltma evresinde mesaneden gelen uyarılar ve dorsolateral pons ve mamiller cisimlerde giderek artan aktivite işeme eşiğini düşürür (26). Üretral sfinkter EMG aktivitesi kesilir ve sfinkter basıncı düşer. Sfinkter mekanizmasının sakral işeme merkezine refleks inhibisyonu ortadan kalkar, sempatik aktivite inhibe olur, parasempatik yolaklar aktive olur ve sonuçta detrüör kasılır. Böylece miksiyon gerçekleşir.

2.3 İskemi Reperfüzyon Hasarı

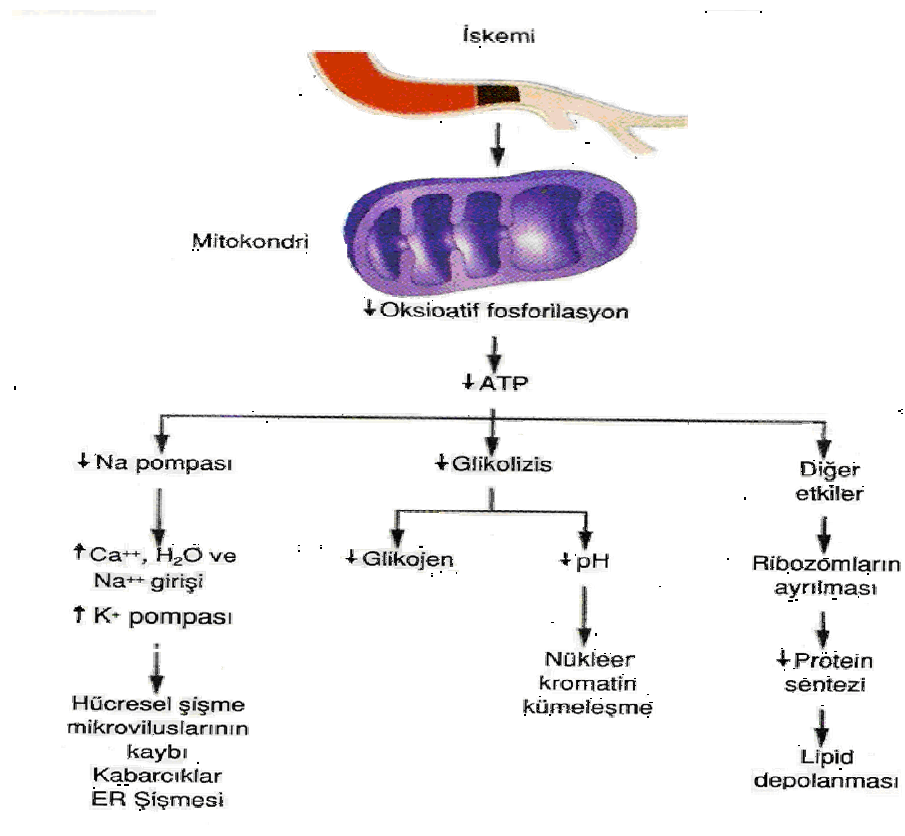
2.3.1 İskemi

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 (29–31).

İskemiye direnç farklı dokularda değişkenlik gösterir. İskelet kası saatlerce iskemiye maruz kalsa bile normale dönebilirken, nöronlar birkaç dakikada irreversibl hasara uğrayabilirler (29). Homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP sentezinin azalması (ya mitokondrial oksidatif fosforilizasyon ya da anaerobik glikoliz yolu ile) intrasellüler metabolit birikmesine ve hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar (31,32).

Öncelikle enerji gerektiren Na-K pompası etkilenirken, Na⁺ iyonları intrasellüler alana geçer ve komşu intertisyel boşlukta osmotik dengeyi sağlamak için bereberinde su çeker. Bunun sonucunda K⁺ iyonları intrasellüler alandan,

ekstrasellüler alana 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 2.1). Kalsiyum iyon dengesi bozulur, hücre dışı Ca^{++} plazma membranından içeriye akışı artarak stoplazmada birikir. Bu olaylar sonucunda sırasıyla mitokondriyal hasar, lizozomlarda şişme, endoplazmik retikulumun dilatasyonu, enzim ve protein kaybı, hücresel kompartmanların bozulması ve otoliz meydana gelir. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder (33).



Şekil 2.1. İskemide erken fazdaki değişiklikler.

2.3.2. 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 (29,34). Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönmesi ile O₂ kaynaklı serbest radikallerin I/R hasarında önemli rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (35–37).

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 (38). 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 (39).

Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır. Reperfüzyon hasarı SOR, endotelyal faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir (40–43).

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

I- Ksantin Oksidaz

II- Polimorf Nüveli Lökosit (PNL) aktivasyonu

III- Endotelyal faktörler

1-Araşidonik asit metabolitleri

a)-Prostasiklin (PGI₂)

b)-Tromboksan A₂ (TxA₂)

c)-Lökotrien B₄

2-Nitrik Oksit

3-Endotelin

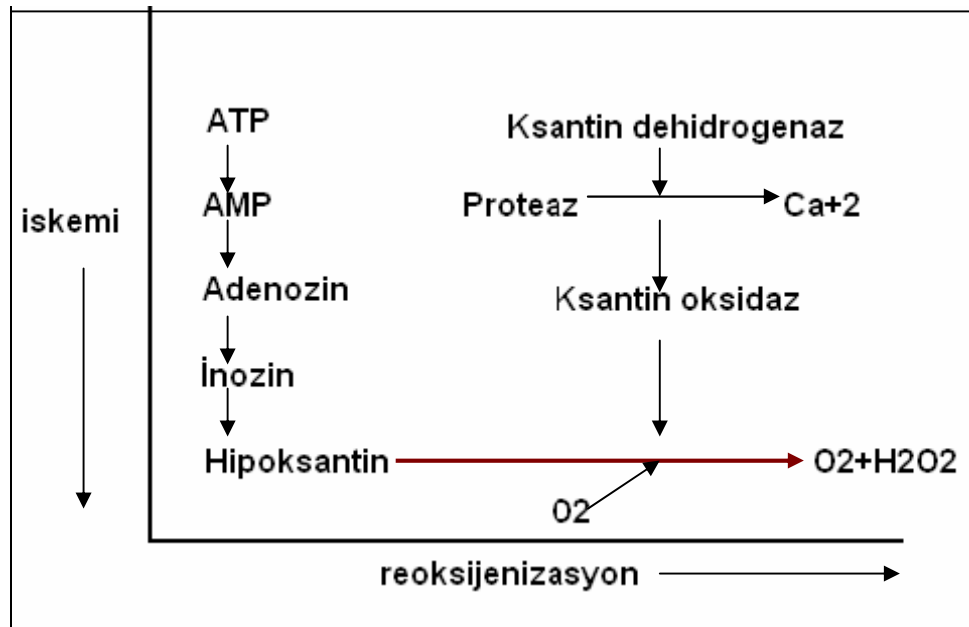
IV- Komplemanlar

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 2.2) (28,44–46).



Şekil 2.2. 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 (40). 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 permeablite artışı ve 5- Sitokin salınımında artıştır (47).

III. Endotelyal Faktörler

Vasküler endotelyal çeper pek çok lokal hormon ve otakoid salgılayarak vasküler düz kas tonusunu düzenler (28,48).

1. Araşidonik Asit Metabolitleri

a) Prostaglandin (PGI₂): Endotel hücrelerinden serbestlenen ilk vazodilatör ajan olan PGI₂ endotelyal yüzeylerde trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatördür. Prostaglandinler membran fosfolipidlerindeki fosfolipaz A₂'nin etkisiyle arşidonik asit oluşumuyla başlar, siklooksijenaz yoluyla prostaglandinlerden oluşur (48,49).

b) Tromboxan A₂ (TXA₂): Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımı ile oluşan TXA₂ trombositleri agregate eder ve vazokonstriktör etkisi vardır. Reperfüzyon, prostaglandin üretiminin en potent uyarandır. TXA₂, iskemi-reperfüzyonda endotelyuma nötrofil adhezyonunu indükleyen güçlü bir kemotaktik maddedir (49).

c) Lökotrien B₄ (LB₄): Lökotrienler, iskemi-reperfüzyon boyunca endotelyal disfonksiyonda önemli rol oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan arşidonik asit metabolitleridir. LB₄ nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Adezyon moleküllerinin aktivasyonunu, endotelyal hücrelere yapışmayı, SOR'nin ve proteazların üretimini sağlar. 3 saatlik iskemik periyodu mukozal LB₄ seviyelerini değiştirmezken, reperfüzyonun izlediği aynı süreli iskemi mukozal LB₄ seviyelerinde %200 ila 600 oranında artışa yol açmaktadır (34,50).

2. Nitrik Oksit (NO)

Endotel türevli nitrik oksit veya relaxing faktör (ENDO, EDRF) olarak da bilinen NO, asetil kolin uyarısı, hipoksi, endotoksin veya hücresel zedelenmeye yanıt olarak dolaşıma salınabilmektedir. NO, sitozolik bir enzim olan nitrik oksit sentetaz (NOS) tarafından endotel hücreleriyle beraber birçok dokuda L-argininin L-sitrüline dönüşümü sırasında oluşan bir maddedir (51). Yarı ömrü birkaç saniye olan, diffüze

olabilen bir maddedir. NO kendiliğinden nitrat ve nitrite ayrışır. Hücrel hasarın yanında büyük miktarlardaki NO parakrin ve otokrin fonksiyonların bozulmasına, bölgesel kan akımında dağılım bozukluğuna yol açar (52). NO süperoksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO^-) yoluyla sekonder sitotoksik ürünler oluşturabilir (51).

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 (49).

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 (29,48).

V. Sitokinler

I/R hasarını takiben dolaşımında 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 (53).

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 adezyon moleküllerinin ortaya çıkışını arttırmak için endotel hücreleri de aktive ederler, bu da aktif lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasına ve daha fazla hasarın oluşmasına yol açar (54).

TNF- α , endotel hücrelerine nötrofil agregasyon ve adezyonuna, süperoksit anyon oluşumuna, nötrofilik fagositoz ve sitotoksik aktivitesinin artmasına neden olur (55). TNF- α 'nın diğer fonksiyonları koagülasyonun aktivasyonu, prostaglandin

E2, platelet aktive edici faktör (PAF), glukokortikoidler ve eikozanoidlerin salınımının artırılması sağlar. Ayrıca lenfositteki IL-2 üretiminin ve hücrelerin IL-2 ye cevabını arttırarak şok benzeri bir tabloya da neden olur (56).

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 (29,57). 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 (29,58).

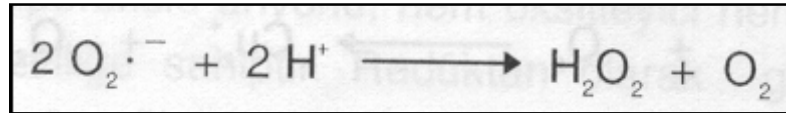
2.3.3. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

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, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede serbest oksijen radikali (SOR) oluşturma eğilimindedir. Kısa ömürlü ve anstabil moleküllerdir (59).

SOR normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve hidroksil radikali (OH[•])'dir. Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali (O₂⁻) oluşur. Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali (H₂O₂) 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

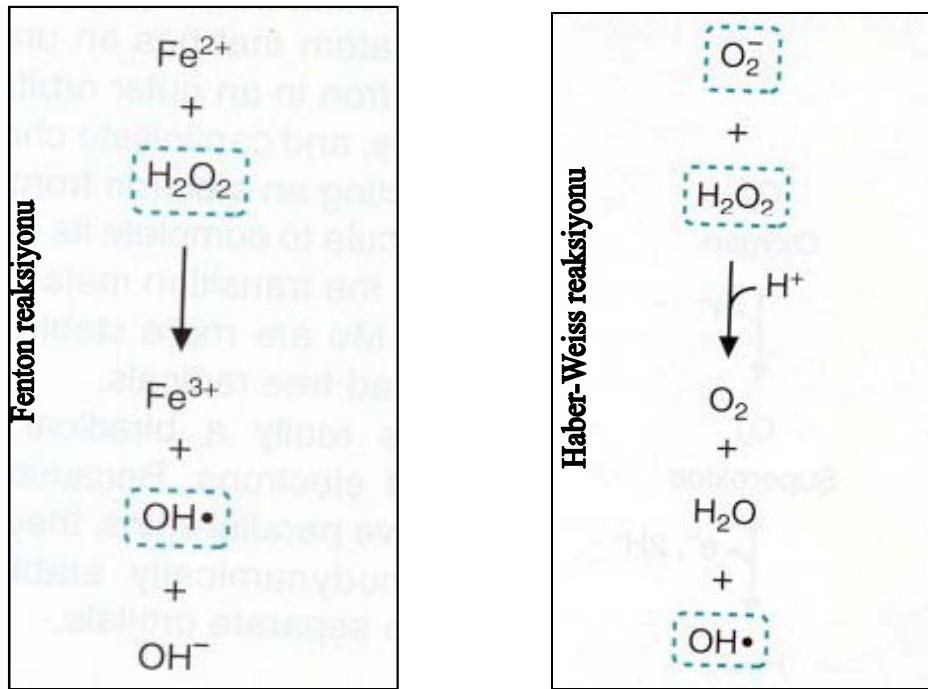
zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Serbest oksijen radikallerinden en aktif olanı OH^\bullet radikalidir (59).

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin (O_2^-) dismutasyonu ile olur (Şekil 2.3). Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir.



Şekil 2.3. 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^\bullet) oluşturur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Fenton reaksiyonu

ve

Haber-Weiss reaksiyonu

Süperoksit radikalının lipid solubilitesi sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit lipid solubldur. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu 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 (60). 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^*) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO^*) 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 (61).

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 (62).

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 hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemogloblin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemogloblinin süperoksit radikali (O_2^-) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemogloblin oluşumuna neden olur (62,63).

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 (64,65).

2.4. 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.

2.4.1. Endojen Antioksidanlar

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

Enzim olan endojen antioksidanlar

- 1) Süperoksit dismutaz (SOD)
- 2) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)
- 3) Glutasyon 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) Glutasyon
- 9) Sistein
- 10) Metiyonin

- 11) Ürat
- 12) Laktoferrin
- 13) Albümin

2.4.2. 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:

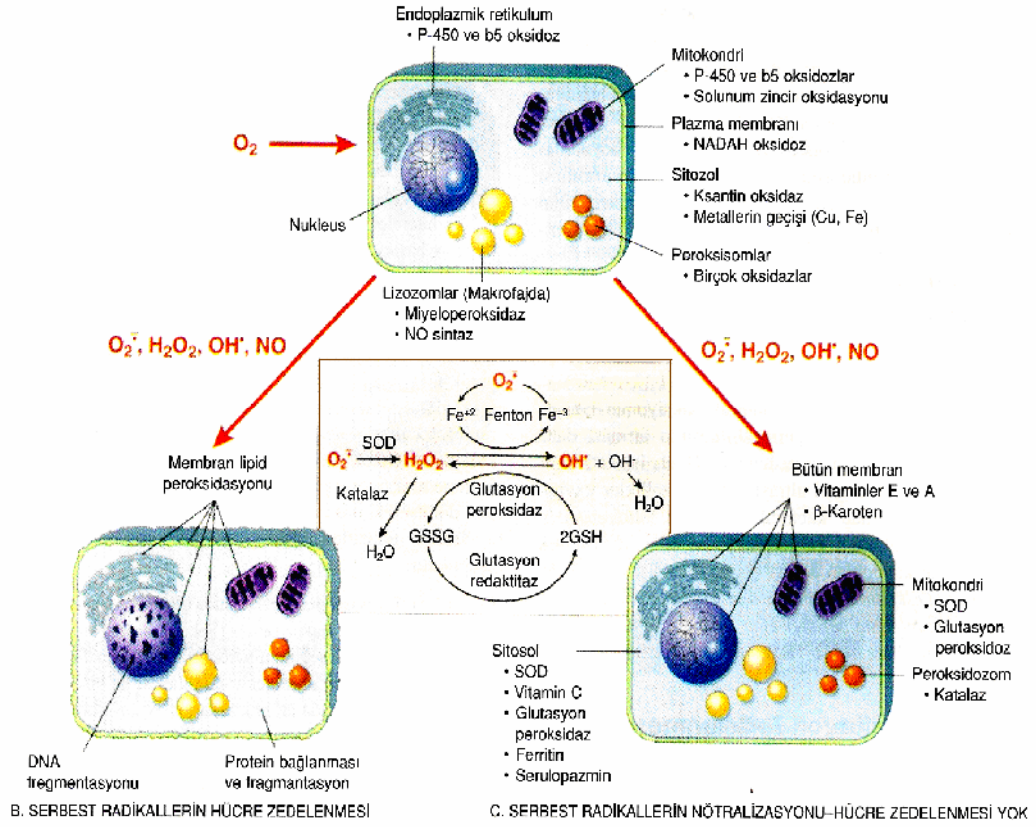
- 1) Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten)
- 2) NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestetikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenyline iodonium)
- 3) Rekombinant süperoksit dismutaz
- 4) Trolox-C (vitamin E analogu)
- 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 adezyon inhibitörleri
- 9) Sitokinler (TNF ve IL-1)
- 10) Barbitüratlar
- 11) Demir şelatörleri (Şekil 2.5).

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, desferoksamin.

3- Fiziksel: İskemik prekondüsyon, hipotermi.



Şekil 2.5. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve antioksidan mekanizmalar.

2.5. Leptin

Leptin, latince *leptos* kelimesinden türetilmiş zayıflatıcı anlamında, yağ hücresinde ve diğer birçok dokuda **ob-gen** tarafından üretilen ve plazmaya salınan bir hormondur (66,67). Kana geçtikten sonra özel reseptörleri aracılığı ile kan beyin bariyerini aşarak merkezi sinir sistemine ulaşır ve besin alımını azaltıp, enerji harcamasını artırarak etkisini gösterir (68).

2.5.1. Leptinin Özellikleri

1994 yılında J Fridman ve Y Zhang uzun süren yağ hücresi kültürü çalışmaları sonucu ob-geni izole ettiler ve leptinin ob-gen tarafından yağ hücresinde üretildiği ve plazmada belirli bir kan seviyesi oluşturduğu ilk defa aynı ekip tarafından bildirildi (69).

Leptin 167 amino asit içeren, 16 kDa molekül ağırlığında yağ hücresi ve bir çok dokudan salgılandığı saptanan, plazmada belirli bir kan düzeyi oluşturan kanda

serbest ve proteine bağılı olarak taşınan bir polipeptidir (69,70). Leptin, ob-gen tarafından kodlanır ve bu gen, sıçanlarda 6 no'lu kromozomda, insanlarda ise 7. kromozomun uzun kolundadır (7q31 bölgesinde). Yapısı IL-6 ve IL-11, IL 12 ile benzerlik gösterir. Biyolojik aktiviteden N-terminal bölgesi sorumludur (71). Leptin organizmada böbrekler tarafından idrar yolu ile atılır. Sağlıklı erişkinlerde plazma leptinin fizyolojik sınırları 5–20 ng/ml arasındadır (72).

2.5.2. Leptin Reseptörleri

Leptin etkisini leptin reseptörleri yoluyla gerçekleştirir. Leptin reseptörü, 1996 yılında, leptine rezistans olduğu gösterilen db/db farelerde **db-gen** ürünü olarak keşfedilmiştir. Leptin reseptörleri, farelerde 4. kromozomda bulunan db-geni tarafından kodlanır (73). Leptin, sitokin ailesine olan aşırı benzerliği nedeniyle Klas-1 sitokin reseptör ailesinden sayılmaktadır. Leptin IL-6 ve IL-11 ile yüksek oranda benzerlik gösterirken, leptin reseptörleri de IL-6 ile homoloji göstermektedir. Toplam 6 reseptör saptanmıştır. Bunlar; OB Ra-b-c-d-e-f 'dir.

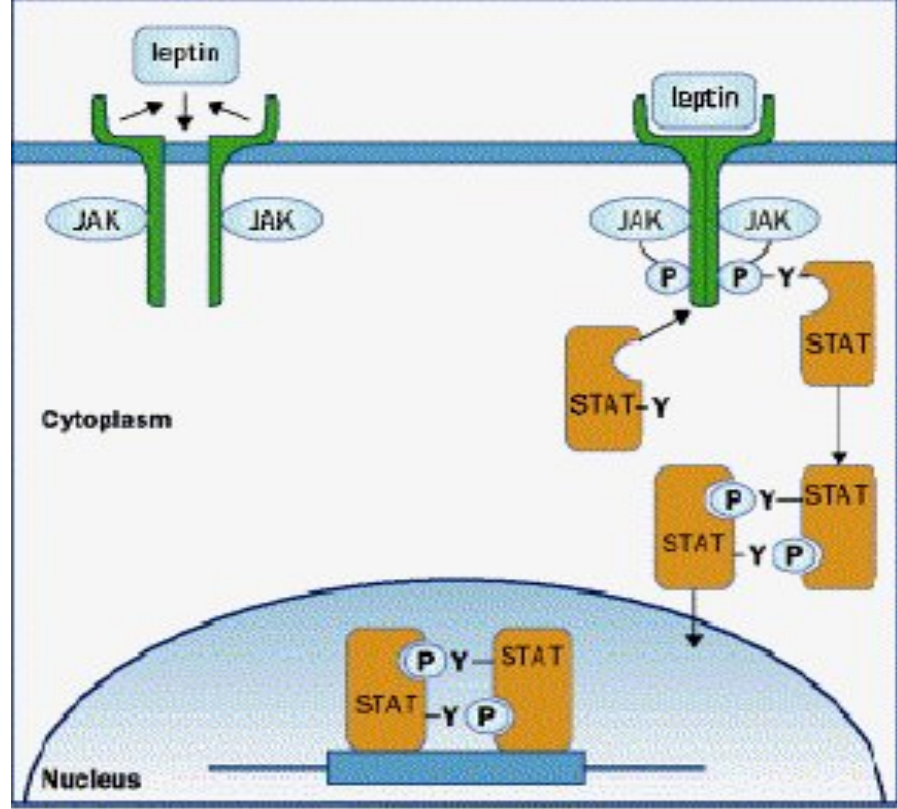
OB Re reseptörü hariç diğer 5 tanesi transmembranöz alana sahip olup sadece OB Rb (uzun leptin reseptörü) intraselüler motifler içerir. OB Re ise çözünür reseptör şeklinde dolaşımda bulunur. Bir leptin taşıyıcı protein olup kanda biyolojik olarak aktif leptinin potansiyel rezervuarı olarak görev görmektedir (74).

OB-Rb (uzun form) reseptörler sinyal iletme kapasitesine sahiptirler ve en çok hipotalamusta; az miktarda akciğer, böbrekler, karaciğer, iskelet kası, kalp, pankreas, ince barsaklar, overler, testisler, hematopoetik hücreler, yağ doku ve daha birçok hücre ve dokuda bulunur (75).

OB-Ra (kısa form) reseptörlerin ise intraselüler sinyal için gerekli olan segmentlerin tümünü taşımazlar ve bu nedenle sinyal iletiminde rolleri çok az veya yoktur. Bunlar, başlıca böbrek, akciğer, beyin kapillerleri ve plexus koroideusta bulunurlar. Beyin kapillerleri ve plexus koroideus'da OB-Ra reseptörlerinin bol olarak bulunması, kısa form reseptörlerin leptinin merkezi sinir sistemine transportunda önemli görevleri olduğunu düşündürmektedir (76).

Leptin reseptörüne bağlandıktan sonra diğer sitokinler gibi JAK-STAT (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription) sinyal transducerini aktive eder ve daha sonra STAT ve MAP kinaz aktivasyonu yaparak etkisini gösterir (Şekil

2,6). Leptin ayrıca insülin ile beraber arkuat nukleusta fosfatidilinozitol 3 kinazı (PI3K) stimüle ederek etkisini gösterir (77).



Şekil 2.6. Leptin reseptörünün aktivasyonu.

2.5.3 Leptin Sentezi ve Sekresyonunun Regülasyonu

Leptin başlıca adipositlerde sentezlenir, yağ hücresinde ob-gen tarafından mRNA'ya kodlanarak üretilir (67,77). Leptinin deri altı yağ dokusu hücrelerinde mRNA miktarı visseral yağ dokusuna göre 2 misli fazladır ve yağ hücresinden salgılanması b3 adrenerjik reseptörler aracılığı ile olur.

Leptin düzeyinin ana belirleyicisi vücut yağ kitlesi ve vücut kitle indeksi (VKİ) olsa da bir çok faktör leptinin regülasyonunda rol almaktadır (78) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Leptin sentezini etkileyen faktörler.

Sitümüle edenler	İnhibe edenler
Besin alınımı	Tiroid hormonları
İnsülin	Büyüme hormonu
Glukokortikoidler	Somatostatin
Prolaktin	Yağ asitleri
Östrojenik hormonlar	Katekolaminler
TNF alfa (akut)	Androjenik hormonlar
Ateş	TNF alfa kronik
Endotoksemi	Açlık
Metil p tirozin	Egzersiz
	Uzun süre soğuğa maruz kalma

Yemek esnasındaki insülin sekresyon piki sonrası leptin ekspresyonu artar. Bununla beraber insülin adiposit kültürlerinde leptin ekspresyonunu direkt olarak sitümüle eder. İnsülin eksikliğinde leptin düzeyi düşük olup insülin tedavisiyle leptin düzeyi yükselir (79,80).

Kadınlarda erkeklerden daha yüksek bulunur. Kadınlarda yağ dokusunun fazla olması ve erkeklerde testosteronun leptin sekresyonunu inhibe etmesi bu seks farklılığının nedenleri olarak düşünülmektedir. Yarı ömrü 25 dakikadır ve obezlerde yarı ömrü değişmez (81,82). Leptin sekresyonu menstrual siklus süresince değişikliğe uğrar. Folliküler fazda düşük iken ovulasyonda pik yapar ve luteal faz boyunca yüksek seyrederek ve menstruasyonun başlamasıyla birden plazma düzeyleri düşer (83).

Leptin sekresyonu sirkadiyen değişiklik gösterir. Sabah en düşüktür, öğleden sonra artmaya başlar ve gece saat 01:00–04:00 arası pik yapar Gece ise LH pulsasyonlarıyla senkronize bir salınımı vardır. Leptin sekresyonu ayrıca pulsatil bir karakter gösterir (84).

2.5.4. Leptinin etki mekanizması

Leptin vücut yağ kitlesi ile orantılı olarak dolaşımda bulunur ve santral sinir sistemine de plazma seviyeleri ile orantılı olarak geçer. Leptinin ana etki

mekanizması birçok hipofizer hormonun regülasyonunda görev alan ve asıl etkisi iştahı artırmak olan nöropeptid-Y'nin arkuat nükleus'dan salınımı ve ekspresyonunu inhibe etmektir (85). Bununla birlikte yapılan çalışmalar leptinin diğer birtakım mediyatörler ile de etkileşim içinde olduğunu ve kompleks bir iletişim ağı olduğunu göstermiştir. Bu mediyatörler başlıca anabolik ve katabolik olarak ikiye ayrılabilirler. Anabolik olanlar (nöropeptid-Y gibi) günlük gıda alımını artırdığı gibi enerji harcanmasını da azaltarak pozitif enerji dengesine neden olurlar. Katabolik olanlar ise gıda alımını azaltırlar ve enerji harcanmasını artırırlar. Katabolik mediyatörlerden ilk tanımlanan ve en önemli olanı bir melanokortin ailesi üyesi olan melanosit stimulan hormon (MSH)'dur. MSH, pro-opiomelanokortin (POMC) prekürsöründen oluşan bir moleküldür ve melanokortin reseptör ailesinin birçok üyesi için ligandır. Bu üyelerden en önemlileri primer olarak beyinde sentezlenen melanokortin 3 reseptörü (MC3R) ve melanokortin 4 reseptörü (MC4R)'dür. Genetik olarak MC4R defektli farelerin obez olduğu ve bu reseptörün sentetik agonistinin verilmesi ile gıda alımının baskılandığının gösterilmesi, MC4R üzerinden sinyallerin gıda alımını ve yağ dokusundaki artışı sınırladığını göstermiştir. MC3R'deki genetik eksiklik vücutta fazla yağ depolanmasına neden olsa da bu etki ılımlı bir etkidir ve artmış gıda alımı söz konusu değildir. POMC nöronları nükleus arkuatus'da nöropeptid-Y'ye oldukça yakın bulunurlar ve leptin tarafından regüle edilirler (86).

2.5.5. Leptinin Etkileri

Besin Alımını ve Enerji Metabolizmasına Etkiler

Leptin, beyinde kilo alımına neden olan anabolik sinyal iletimini inhibe, enerji harcanmasını arttıran katabolik sinyal iletimini aktive ederek fazla kilo alımına engel olur. Leptinden başka gastrointestinal sistemden de öğün boyutunu ve sıklığını düzenlemek için beyine sinyaller gelir. Bunların bir kısmı direkt olarak gastrointestinal traktusun gerilmesi sonucu mekanik impulslarla gelirken, büyük çoğunluğu vagus sinirinin afferent dalları ile ulaşır. Vagusla ulaşan hormonal doyumluk sinyalinden ilk bulunanı ve en önemlisi kolesistokinin'dir. Leptin aynı zamanda kolesistokinin ile uyum içinde çalışmaktadır. Leptin kolesistokinine olan duyarlılığı da artırır ve böylece öğün hacmi azaltılmış olur (86). Leptin yemek

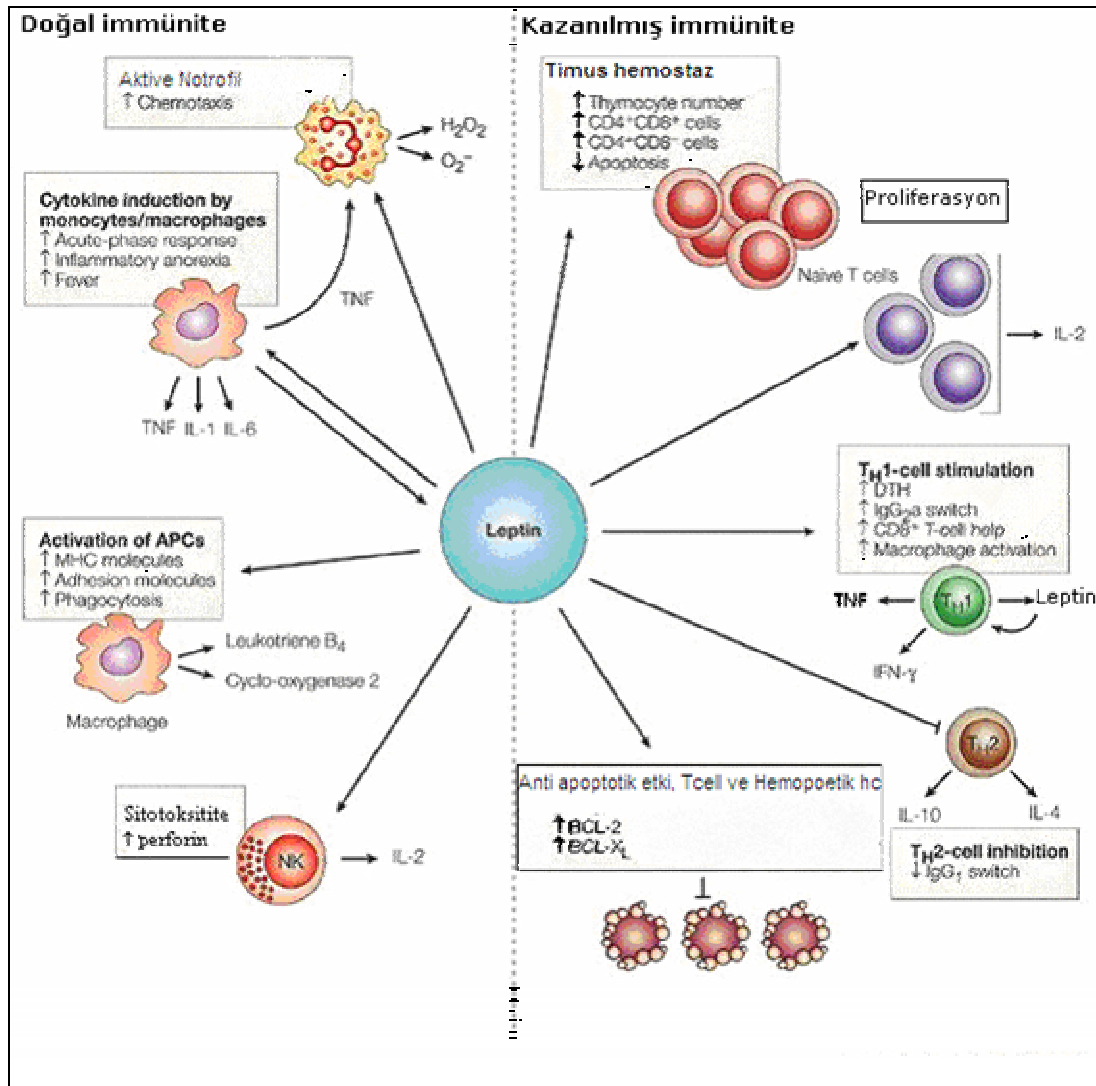
yemeyi azaltarak kilo kaybettirir ve enerji harcanmasını arttırır. Bu nedenle leptine anti-obesite hormonuda denilmektedir (87).

Leptin, enerji dengesi ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde insülin ile birlikte önemli rol oynar. Plazma insülin seviyesiyle leptin konsantrasyonu arasında bir korelasyon vardır. Yapılan çalışmalarda uzun süreli hiperinsülinemide plazma leptininin arttığı bulunmuştur. İnsülinin leptin üretimini yağ hücresinde ob-genini stimüle ederek indirekt yolla arttırdığı söylenebilir (88,89). Leptin yokluğunda hayvanlarda ve insanda obezite ve tip-II diyabet geliştiği bilinmektedir. Leptinin tip-II diabetes mellitusta insüline direnç gelişiminde rolü vardır (90).

Leptin, Hematopoez ve İmmün Sistem

Hematopoetik dokularda ve embriyonik gelişim dönemlerindeki “*stem*” hücrelerinde leptin reseptörlerinin gösterilmesi leptinin hematopoezde rolü olabileceğini düşündürmüştür (91). Kemik iliğindeki adipositlerde leptin sekresyonu gösterilmiş ve leptinin hematopoezde önemli rol oynadığı saptanmıştır. Kök hücrelerin diferansiyasyonunda ve osteoblast oluşumunda önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Leptin, lökosit sentezini uyarır ve eritropoetin hormonunun eritrositlere olan etkisini arttırır (92). Tıpkı bakteriler gibi leptin de makrofajları aktive ederek fagositozu güçlendirir ve onlardan pro ve anti-inflamatuar sitokin salınımını uyarır (93). Leptin, çeşitli hücre tiplerinde proliferatif ve anti-apoptotik etkiler gösterir(94,95). Leptinin CD4+ helper T hücrelerinde stimülasyon etkisi ile proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir. Leptin, Th2 yanıtını inhibe ederken Th1 yanıtını destekler (96) (Şekil 2.7).

Leptin, enfeksiyon ve otoimmuniteye duyarlılığın dengelenmesinde önemli role sahiptir (96). Leptin yetmezlikli hastalarda immün sistemde değişiklikler olduğu saptanmış olup, ayrıca bu hastalarda antioksidan koruma sisteminin bozuk olduğu da gösterilmiştir. Ekzojen leptin verilmesinin, leptin yetmezliği veya düşük leptin düzeyi ile ilişkili immunolojik bozuklukları düzelttiği bildirilmiştir (94).



Şekil 2.7. Leptinin hematopoez ve immun sisteme etkileri.

Leptin ve Anjiogenez

Obezitenin gelişme ve düzelleme (zayıflama) fazlarında, leptindeki artma ve azalmalara paralel olarak yağ dokusunun vaskülaritesinde de fizyolojik olarak artmalar ve azalmalar olduğu saptanmıştır. Bu da leptinin anjiyogenezde bir lokal regülatör olarak davrandığını düşündürmüştür (97). Leptin reseptörleri damar endotel hücrelerinde mevcuttur ve anjiogenezisi artırır. Leptin, normal rat korneasında yeni damar oluşumuna neden olurken leptin reseptörü yetersiz olan *Zucker fa/fa* rat korneası için etkisiz olmuştur (98). Hem *in vitro* hem *in vivo* çalışmalar, leptinin anjiyogenezini ilerletici aktivitesi olduğunu göstermiştir. Bununla beraber *ob/ob*

farelere sistemik veya topikal olarak leptin verilmesi anjiyogenezi etkilemeden yara iyileşmesini hızlandırmaktadır (99,100).

Leptin ve Metabolizma

Leptinin metabolizma üzerine iyi bilinmeyen ve olasılıkla oldukça kompleks etkileri vardır. Az gıda alımı hem yağ kitlesi hem yağsız kitlede kayba neden olur. Leptin tedavisi ise adipoz dokuda lipolizi artırır fakat yağsız dokuya etki belirgin değildir (101). Leptin, yağ asidi sentezinde hız sınırlayıcı enzim olan Asetil Ko-A karboksilaz aktivitesini inhibe ederek yağ asidi ve trigliserid sentezini azaltıp lipid oksidasyonunu artırır (67). Yüksek doz leptin pankreasın β hücrelerinden insülin salınımı üzerine inhibitör etki göstermektedir (102). Leptin, tiroid hormonlarının seviyesini ve sempatik sinir sisteminin aktivasyonunu artırarak kenetlenmeyi bozucu protein (UCP) oluşumunu ve sonuçta termogenezi (ATP sentezi yerine ısı açığa çıkmasını) artırır (98).

Leptin ve Obezite

Leptin eksikliğinin obezite ile sonuçlandığı günümüzde artık oldukça iyi bilinen ve kabul edilmiş bir gerçektir. Ob/ob farelerdeki “nonsense” bir mutasyon obezite, artmış gıda alımı (iştah) ve diyabet gelişmesi ile sonuçlanmaktadır ve aynı farelerde adipositlerden leptinin sentez ve sekresyonunun bozuk ve yetersiz olduğu da saptanmıştır (90). Benzer şekilde leptine direnç gösteren db/db fareler de obezdirler (103) ve tıpkı ob/ob fareleri gibi bunlarda da leptin yeterli fonksiyon gösterememektedir. Obez insanlarda leptin geninde henüz farelerdeki gibi bir mutasyon saptanamasa da serum leptin konsantrasyonları obezite göstergeleri olan vücut kitle indeksi (VKİ) ve vücut yağ kitlesi oranı ile pozitif bir korelasyon göstermektedir (104). Ob/ob farelere rekombinant leptin verilmesi ile gıda alımı (iştah), vücut kilosu, insülin ve glukoz konsantrasyonlarının azalması görülür, oysa db/db farelere (leptin rezistansı) leptin verilmesi ile herhangi bir etkinin görülmemesi obezitede asıl sorunun leptin eksikliğinden çok leptin rezistansı olduğunu düşündürmektedir. Obez insanların büyük çoğunluğunda serum leptin konsantrasyonları yüksektir ve kilo verimi ile tekrar azalır (105). Ayrıca obez insanlardaki plazma leptin konsantrasyonları her ne kadar obez olmayanlara göre 5

kat kadar yüksek olsa da serebral sıvıdaki leptin konsantrasyonlarının sadece çok az yüksek olması leptin rezistansını kolaylaştıran hız sınırlayıcı faktörün santral sinir sistemine leptin transportundaki defekt olduğunu göstermektedir (106,107).

Leptin antiobezite etkisini başlıca enerji alımını azaltarak (iştahın azaltılarak daha az gıda alınması) ve enerji harcanımını artırarak (sempatik sinir sistemi aktivasyonu, termogenezis, artmış oksijen tüketimi) göstermektedir (74).

2.6. 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 hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen hücre ölüm tipi, klasik Yunan tarihçisi olan James Cormack’ın önerisiyle ‘‘apoptoz’’ olarak adlandırılmıştır (108).

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 (109).

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (110,111). 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 ortamdaki ölümlerle kaybolur (*cell deletion*). İşte, tüm bu kavramlar (***programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı***) apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılabilen terimlerdir (110,112,113).

Wyllie, 1980 yılında deneysel apoptozisi, glukokortikoidlere maruz bırakılan olgunlaşmamış timus hücrelerinde gerçekleştirmiş ve apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayırımı yaparak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığını, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğunu göstermiştir (114). 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 (115). Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır. Apoptozis genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir (116).

Nekrozda hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plasma membranı yırtılır. Stoplazma 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 yokeder. Bu olay nükleer büzülme ve DNA fragmentasyonu ile karakterizedir (110,117).

2.6.1. Apoptozisin Önemi

İnsan vücudunda her saniyede 100 000 hücre mitoz ile oluşurken, yine benzer sayıda hücre apoptozis ile ölür (118). 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 (119). 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 (119,120). Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (121). 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 (119).

2.6.2 Apoptozide Hücre Morfolojisi

Apoptoz, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine, dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak yangısal değişiklikler yoktur.

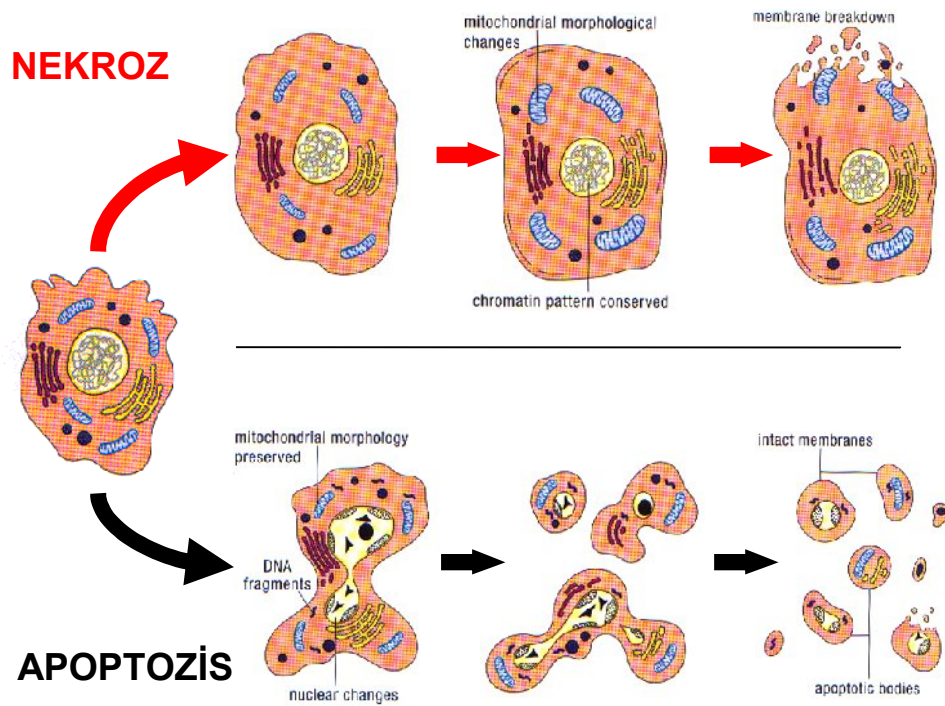
Apoptoziste ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde mikst kondens bir yapıda olup daha diffüz görünümündedir. Apoptoziste süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180–200 bp. (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır. İmmün elektroforez yapıldığında "*ladder patern*" olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (122). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300 000 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 mikroskopunda 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 (123).

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 (116).

Diğer bir hücre ölüm şekli olan **nekroz** ise hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı hücre dışı uyarılar sonucu oluşan istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu hücre içeriği ortama dökülür, inflamatuvar yanıt oluşur ve komşu hücreler de etkilenir (117) (Şekil 2.8) (Tablo 2.2).



Şekil 2.8. Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar.

Tablo 2.2. Nekrozis ve apoptozis arasındaki farklılıklar.

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan Nedenler	İskemi Hipertermi Hipoksi Litik viral enfeksiyon Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stress	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 stress
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	İntakt hücre membranı fakat membranda " <i>bleb</i> "lerin oluşumu Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organellerde disintegrasyon yok Hücrenin intakt mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal Özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP gerekmez (pasif süreç) +4°C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4°C'de gerçekleşmez DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni → apoptozisin en önemli belirteci) Prelitik DNA fragmentasyonu (erken evrede gerçekleşir)
Diğer Özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir Lizozomal enzimler salınır İnflamasyona neden olur	Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler İnflamasyon görülmez

2.6.3. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin klasik tanımlaması otonomik ve programlı hücre intiharı olarak da ifade edilebilir. Apoptozis, hücre dışı ve hücrenel seviyede olusan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir (124). Hücrenel 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 (125). 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 membraı, hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak) apoptozisi tetikleyebilmektedir.

I— Apoptozis sinyalinin oluşumu

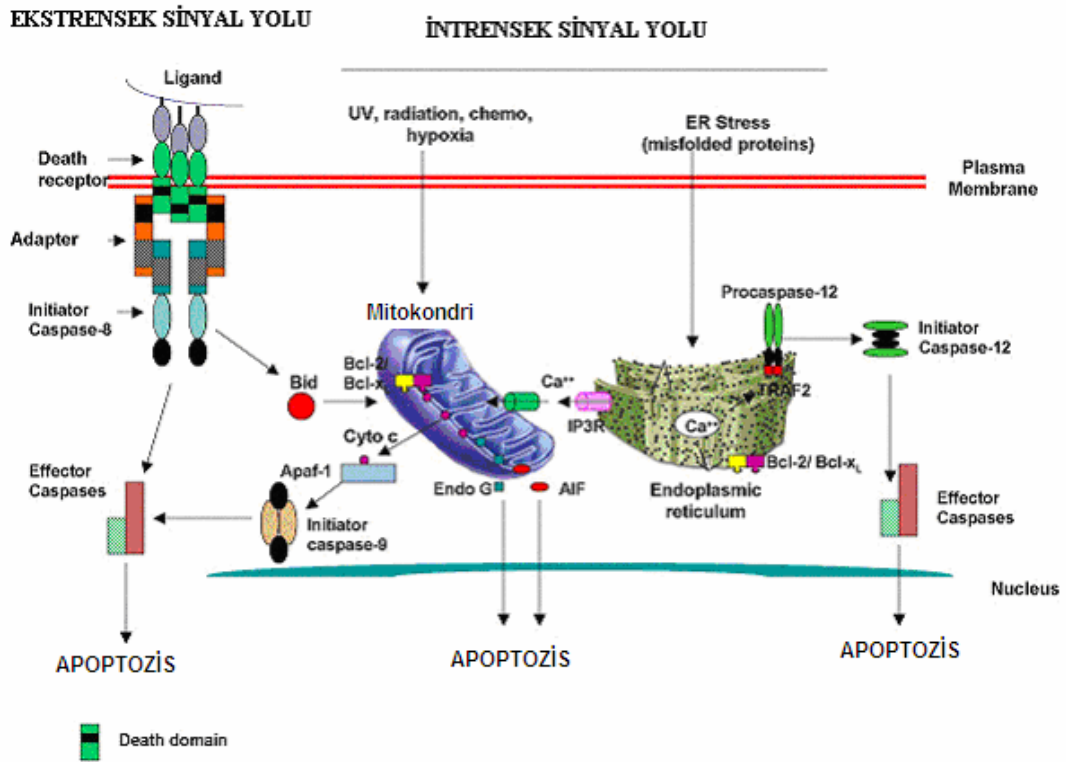
Apoptozisin indüklenmesinde iki majör sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir. Bunlar ‘**ekstresek**’ hücre dışı ve ‘**intresek**’ hücre içi sinyal yollarıdır (Şekil 2.9).

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



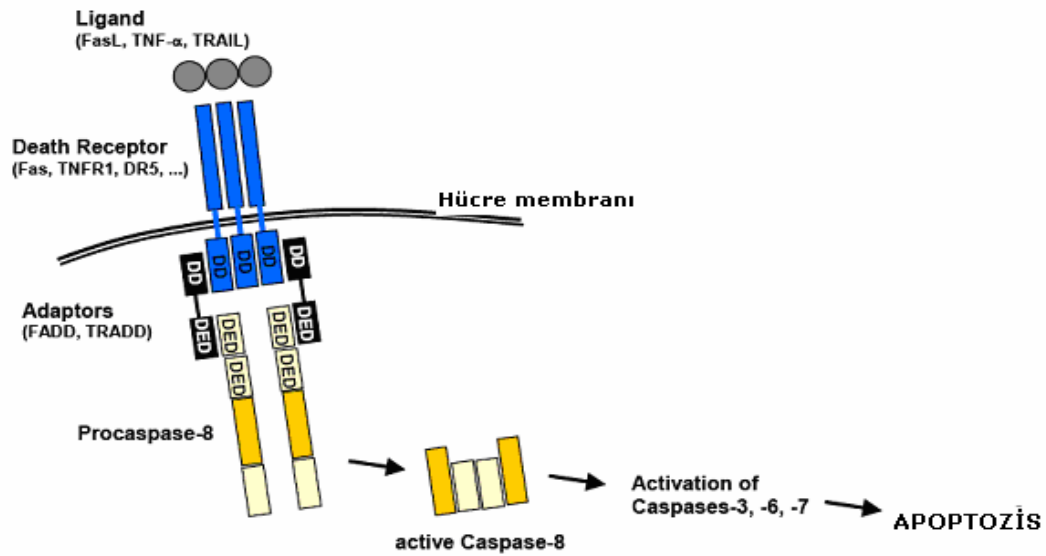
Şekil 2.9. İntrensek ve ekstresek sinyal yolu tetikleyicileri.

1) Ekstresek Sinyal Yolu

Fas Ligand (FasL) ve TNF

Hüresel 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. 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 (126). 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 (127). 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 (128). 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 (129) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Fas ve TNF ölüm reseptör ve aktivatörleri.

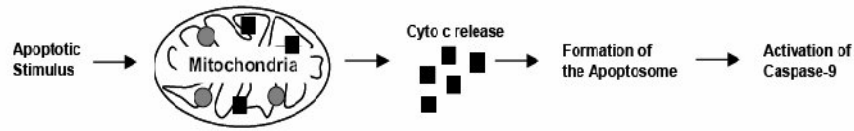
2 İntrensek Sinyal Yolu

a) Mitokondriyal yolak: Memeli hücrelerinde majör apoptotik sinyal yolu mitokondrialdir. Radyasyon, toksinler, ısı artışı, çoğu kemoterapötik ajan, tümör supresör genler, DNA hasarında, viral virulans faktör ile intrinsek mitokondriyal yolak üzerinden apoptotik sürecin başlamasına neden olurlar (130) (Şekil 2.11).

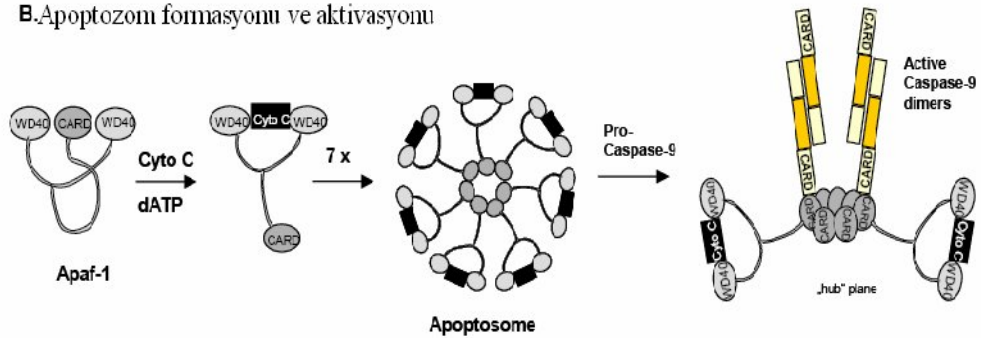
Sitokrom-C mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom-C'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir

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 prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 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 (131).

A. Mitokondrial sinyal yolu ve Kaspaz aktivasyonu



B. Apoptozom formasyonu ve aktivasyonu



Şekil 2.11. 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 (132). Bu yol mitokondrial/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 prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Son çalışmalar, *in vivo* ve *in vitro* olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermiştir (133).

2.6.4 Apoptozis Sürecini Başlatan Diğer Nedenler

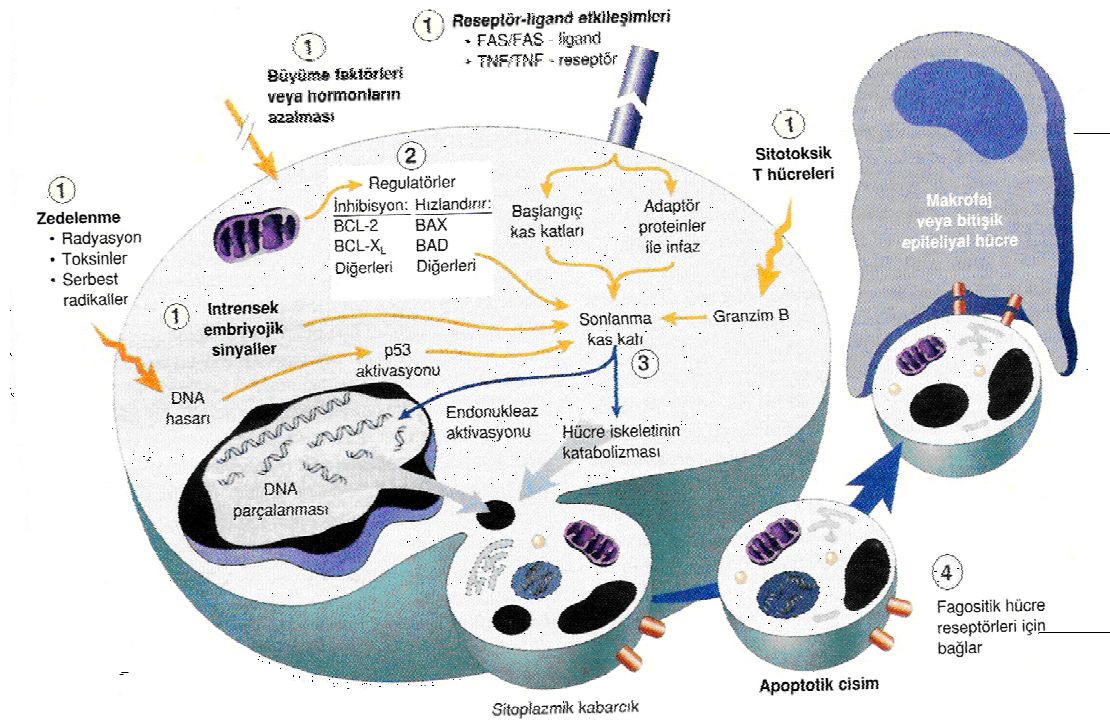
Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53 bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir (134).

Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir (134).

Apoptozisi büyüme faktörlerinin ortamdaki 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 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 (134).

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 enzimidir. 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 yandanda pro-kaspas 7 üzerinden selüler proteolizi başlatır (134,135) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Apoptozisteki olayların şematik görünümü.

2.6.5. 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 (115,134).

Kaspazlar (CASPASES): Cysteine dependent Aspartate specific Proteases

Zimojen (inaktif prekürsör) olarak stoplazmada 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 (136,137).

Kaspazların aktivasyonu; İnaktif (zimojen) formadaki 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 degradingasyonuna yol açarlar. Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Kaspazların uyarılması ile hücrelerde proteoliz başlatılır (136,137).

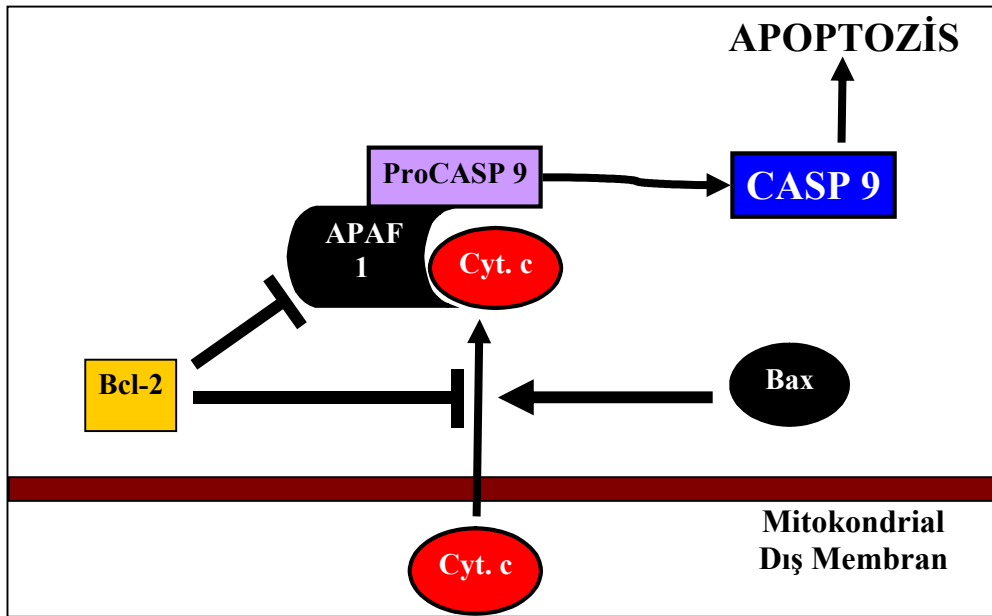
Mitokondri

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 2.3). Pro-apoptotik olanlar, sitokrom-C'nin mitokondriden sitoplazmaya 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'un mitakondriden sitozole çıkmasını sağlar (134) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Bax/ Bcl-2'nin etki mekanizması.

Tablo 2.3. 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	

2.6.6. 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 (134,138).

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 (138,139).

2.6.7. 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 (110). Apoptozis ayrıca her türlü neoplastik oluşumda hem büyüme hem gerileme döneminde görülebilir (112). 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 (110). Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır (111). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (115).

Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar;

1. Fizyolojik Olaylar

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

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) (114).

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) (116).

e- Çeşitli etkenlerle oluşan hücre ölümü (radyasyon, antikanser ilaçları, hipertermi, hipoksi, travma) (113).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apoptozis yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının kanser, otoimmün bozukluklar, viral infeksiyonlar, nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir (140) (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. 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, İmmun 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- AİDS</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>

2.6.8 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 hücrelere 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 (134).

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

Bu deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi T.I.C.A.M. (Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi) laboratuvarında 08.02.2007 tarihli 12 sayılı etik kurul kararıyla yapıldı.

3.1. Hayvanlar ve Diyet

Bu çalışmada yaşları 5–6 aylık olan, ağırlıkları 250–300 gr. arasında değişen *Sprague-Dawley* cinsi albino ratlar kullanıldı. Tüm deney hayvanları TİCAM'dan temin edildi. Hayvanlar, ısısı 23 ± 1 °C ve nemi % 55 ± 5 olan, ışığı 14 saat aydınlık / 10 saat karanlık, ortamda yaşatıldılar. Standart rat yemi ve musluk suyu ile beslendiler. Her grupta 8 rat olacak şekilde kontrol ve 2 ayrı deney gubu oluşturuldu.

Grup I. Kontrol grubu N=8

Grup II. İskemi Reperfüzyon grubu N=8

Grup III. Leptin + İskemi/Reperfüzyon N=8

Hayvanlar yeni ortam koşullarına uyum sağlamaları için kafeslere yerleştirildikten bir hafta sonra deneye başlandı.

3.2. Deney Protokolü

Ratlar 12 saatlik açlığı takiben 50 mg/kg *Tiopental Sodyum* (Pental Sodyum flk 0.5 g İ.E.Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş. İatanbul Türkiye) intraperitoneal enjeksiyon ile uygulanarak genel anestezi sağlandı. Ratlar anestezi sonrası supin pozisyonunda operasyon masasına alınarak alt abdominal median laparotomi uygulandı.

Grup 1: Kontrol grubu

Bu gruptaki ratlara alt abdominal median laparotomi uygulandıktan hemen sonra herhangi bir işlem uygulanmaksızın mesaneler çıkarıldı.

Grup II: İskemi/Reperfüzyon grubu

Bu gruptaki ratlara iskemiden 30 dakika önce intraperitoneal olarak 1,0 cc serum fizyolojik verildi ve abdominal aorta atravmatik mikrovasküler klemp (Bulldog klemp) ile 45 dakika klempe edilerek mesane dokusu iskemiye maruz bırakıldı. Bu iskemi süresinde laparotomi kesisi 3/0 ipek ile kapatıldı. İskemi süresini takiben laparotomi kesisi tekrar açıldı ve abdominal aortadaki klemp çıkarılarak 60 dakika süreyle reperfüzyona maruz bırakılmak üzere laparotomi kesisi tekrar sütüre edilerek kapatıldı.

Grup III: Leptin + İskemi/Reperfüzyon grubu

Bu gruptaki ratlara da iskemiden yani abdominal aortaya mikrovasküler klemp konulmadan 30 dakika önce leptin 10 µg/kg olacak şekilde 0,1 ml leptin serum fizyolojik içinde çözündürülmüş olarak intraperitoneal (ip) verildi. Daha sonra abdominal midline insizyonla laparotomi yapılarak abdominal aorta non-travmatik mikrovasküler klemp ile 45 dakika klempe edilerek mesane dokusu iskemiye maruz bırakıldı. Takiben laparotomi kesisi 3/0 ipek ile sütüre edilerek kapatıldı. İskemi süresini takiben laparotomi kesisi tekrar açıldı ve abdominal aortadaki klemp çıkarılarak 60 dakika süreyle reperfüzyona maruz bırakılmak üzere laparotomi kesisi tekrar sütüre edilerek kapatıldı.

Leptin

Deneyimizde kullandığımız leptin 10 µg/kg olacak şekilde 0,1 ml serum fizyolojik içinde çözündürülmüş olarak iskemiden 30 dk. önce intraperitoneal (ip) yolla verildi. Deneyde *recombinant mouse leptin (Sigma L-4146, Chemical Co. St. Louis, MO, USA.)* kullanıldı.

Dokuların Alınması ve Değerlendirilmesi

Deney süresi sona erdiğinde ratlara servikal dislokasyon uygulandıktan sonra laparotomi kesisi tekrar açıldı. Mesane hızlı bir şekilde çıkarıldı. Mesane dokusu kubbeden mesane boynuna doğru vertikal olarak ortadan ikiye ayrıldı. Mesane dokunun yarısı biyokimyasal (TNF-α, MDA) değerlendirme için -80°C'de dipfrizde

mahafaza edildi. Mesane dokusunun diğ er yarısı histolojik takip için alındı. Bu ön işlem sırasında ve sonrasında nötral formalin fiksatif i kullanıldı.

3.3. Biyokimyasal Değ erlendirme:

Dokular pH'sı 7,4 olan fosfat tamponu kullanılarak IKA (K-Ultra Turrax Basic) T 18 model homojenizatör ile homojenize edilip, UP 50 ultraschallprozessor (TUV Berlin Brander bur GS) model sonikatör kullanılarak sonike edildi. Homojenatlar 5000 rpm (+4°C)'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar numune olarak kabul edildi.

3.3.1 Doku TNF-alfa düzeyleri

Trinity (Biotech Capita Reader) model ELISA cihazında Biosource marka kit kullanılarak ölçüldü.

3.3.2.Doku Malonaldehit (MDA) Düzeyi Tayini

Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan doku MDA düzeyi Ohkawa ve ark. (141) MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile reaksiyonu prensibine dayanan yöntemi ile ölçüldü. Süpernatant numunelerin 0,5'er ml (500µl) alınarak her birinin üzerine 0,2 ml %8,1 lik Sodyum Dodesil Sülfat, 1,5 ml %20 asetik asit (pH:3,5) ve 1,5 ml % 0,8 Thio barbitürik asit solüsyonu eklenerek 95°C su banyosunda 60 dakika kaynatıldı. Soğutulduktan sonra 5 ml bütanol/pridin (15:1) eklendi ve karıştırılıp 4000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakadaki rengin absorbansı reaktif körüne karşı 532 nm dalga boyunda okundu. Standart olarak 1,1',3,3'-Tetraetoksi propan'ın 4.175µmol/L lik çözeltisi kullanıldı.

3.4. Histopatolojik Değ erlendirme

Histopatolojik değ erlendirme Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalında yapıldı. 24 saat süren nötral formalin ile fiksasyondan sonra doku takip cihazı ile dokuların rutin histolojik takipleri yapıldı. Parafin blokları hazırlanan dokuların her birinden 5 µm kalınlığında seri kesitler poly-L-lisin kaplı lamlara alındı. Parafin bloklardan bir lam üzerine rasgele seçilmiş üçer kesit gelecek şekilde 35–40 kesit alındı. Parafin bloklardan elde edilen kesitlere üç değ iş ik

histolojik boyama yöntemi uygulandı. Mesanelerin genel yapı özelliklerini ortaya koymak için otomatik boyama cihazı ile Hematoksilen-Eozin (H&E) kullanıldı. Apoptoz gösteren hücreleri belirlemeye yönelik TUNEL ve **bcl-2** boyaması yapıldı. Kesitler DP 70 dijital kamera ekli Olympus marka fotomikroskop ile görüntülendi. Her gruba ait rasgele seçilmiş 10 kesitte oküler mikrometresi yardımı ile X40 büyütmede 25 alanda hücreler sayıldı ve bulgular istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

3.4.1.TUNEL Boyama Tekniği

Kullanılan kit: ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7101- Chemicon International. USA & Canada.

1. Kesitler önce 3 kez değiştirilen ksilollerde 15'er dk bekletildiler ve deparafinize edildiler.

Daha sonra sırasıyla;

2. 2 kez %100 alkolde 5'er dk. tutuldular.
3. %95'lik alkolde 3 dk. tutuldular.
4. %70'lik alkolde 3 dk. tutuldular.
5. PBS solüsyonunda 5 dk. yıkandılar
6. Proteinaz K solüsyonunda oda ısısında 15 dk. tutuldular.
7. 2 kez değiştirilmiş distile suda 2'şer dk. yıkandılar.
8. %3'lük Hidrojen Peroksidaz içerisinde oda ısısında 5 dk. tutuldular.
9. PBS içerisinde 5–10 dk. çalkalandılar.
10. Equilibration Buffer içinde oda ısısında 5 dk. inkübe edildiler.
11. Kesitlere TdT enzimi uygulanarak etüvde 37 derecede nemli ortamda 1 saat tutuldular.
12. Kesitler daha sonra Working Stop/Wash Buffer solusyonunda 15 saniye çalkalandılar ve 10 dk. oda ısısında inkübe edildiler.
13. 3 kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda 1'er dk. olmak üzere bekletildiler.
14. Oda ısısındaki kesitlere anti-digoxigenin peroksidaz damlatılarak üzerleri plastikcoverslip ile kaplandı ve oda ısısında nemli ortamda 30 dk. bekletildiler.
15. 4 kez değiştirilen PBS solüsyonunda oda ısısında 2'şer dk. yıkandılar.
16. Kesitler üzerine DAB solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildiler.

17. Kesitler 3 kez değiştirilmiş distile suda 1'er dk. yıkandı ve son distile suda 5 dk. tutuldular.
18. Metil Green'de 10 dk. boyandılar.
19. 3 kez değiştirilmiş distile suda 30'ar saniye alkalandılar.
20. Kesitler 3 kez değiştirilmiş %100 lük butanolden hızlı bir şekilde çalkalanarak geçirildiler.
21. Xylol I'de 2 dk. , Xylol II'de 2 dk. ve Xylol III'de - 5 dk. bekletildiler.
22. Kesitler en son olarak üzerlerine kapatma mediumu damlatılarak kapatıldılar.

3.4.2.Bcl-2 Boyama Tekniği

Kullanılan kit: bcl-2alpha Ab-1 NeoMakers, Inc. 47777 Warm spring Blvd. Fremont CA, 94539 USA.

1. 1.Poly-L-lysinli lamlara alınan kesitler önce 3 kez değiştirilen. ksilollerde 5'er dk. bekletildiler ve deparafinize edildiler.

Daha sonra sırasıyla ;

2. %100 alkolde 1'er dk. tutuldular.
3. %96'lik alkolde 1 dk. tutuldular.
4. %96 lik alkolde 1 dk. tutuldular
5. eşme suyunda 30 saniye yıkandılar
6. Distile suda 1 dk. yıkandılar.
7. %3'lük Hidrojen peroksidadz içerisinde oda ısısında 10 dk. tutulur.
8. Distile suda 1 dk. yıkandılar.
9. 2 kez değiştirilmiş PBS içerisinde 1'er dk. alkalandılar.
10. Ultra V Block Solusyonu içinde oda ısısında 5 dk. inkübe edildiler.
11. Kesitlere primer antikor bcl-2 damlatılarak nemli ortamda 1 saat tutuldular.
12. 2 kez değiştirilmiş PBS içerisinde 1'er dk. alkalandılar.
13. Kesitlere biotinli goat anti-mouse damlatılarak 10 dk. bekletildiler.
14. 2 kez değiştirilmiş PBS içerisinde 1'er dk. alkalandılar.
15. Oda ısısındaki kesitlere Streptavidin içinde 10 dk. bekletildiler.
16. 2 kez değiştirilen PBS solüsyonunda oda ısısında 1'er dk. yıkandılar.

17. Kesitler üzerine kromogen AEC solüsyonu damlatılarak 1–5 dakika bekletildiler.
18. Kesitler çeşme suyunda 30 sn yıkandılar.
19. Hematoksilin ve eosinde 20 sn. boyandılar.
20. Distile suda 30 sn. yıkandılar.
21. Kesitler havada kurutuldular.
22. Kesitler en son olarak üzerlerine kapatma mediumu damlatılarak kapatıldılar.

3.5.İstatiksel Değerlendirme

İstatiksel değerlendirme Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede SPSS 13,0 (Statistical Package for Social Sciences) paket programı kullanıldı.

Mesane örneklerinde ölçülen doku MDA ve TNF- α düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı.

Gruplar arasındaki istatiksel anlamlılık TUKEY HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi.

Histopatolojik inceleme sonucunda her ratın mesane spesmenlerinin epitel, stroma ve kas dokusundaki apoptoz gösteren hücreler sayılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutuldu. Hazırlanan her preparat tek histolog tarafından DP70 Kamera takılı Olympus PM10ADS fotomikroskoptan oküler mikrometrisi yardımıyla X40 büyütme ile 10 kesitte 25 alanda apoptotik hücreler sayılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki istatiksel anlamlılık TUKEY HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel yönden **p < 0.05 değeri anlamlı** olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1.Doku Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Sonuçları

Oksidan hasarın parametresi olan lipid peroksidazın bir ürünü olan MDA konsantrasyonu ölçülerek reperfüzyon hasarın değerlendirilmesi yapıldı. Doku MDA düzeylerinin gruplara göre değerleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Bu değerlerin tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi sonucunda; ortalama doku MDA düzeyleri Kontrol grubunda; 4,17 nmol/mg protein, İ/R grubunda; 7,86 nmol/mg protein, Leptin + İ/R grubunda; 3,96 nmol/mg protein olarak saptandı. Her üç grup arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p<0,01$) (Tablo 4.2).

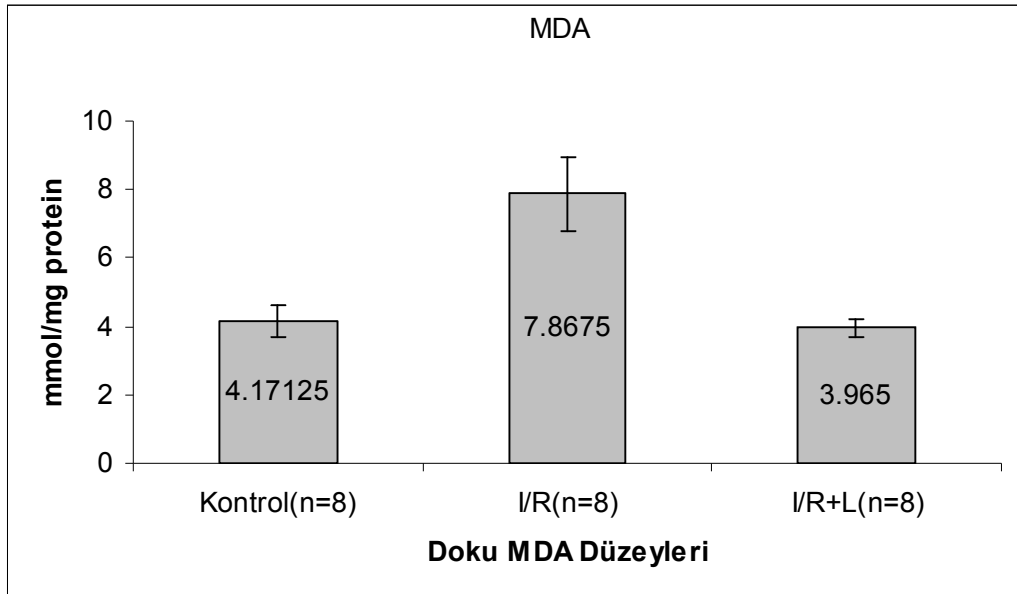
Tablo 4.1 Doku MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı (nmol/mg protein).

Rat No	Kontrol Grubu	İ/R Grubu	L + İ/R Grubu
1	4,47	8,83	3,29
2	2,74	13,65	3,51
3	4,44	7,39	4,11
4	5,75	4,28	4,94
5	3,76	9,26	3,24
6	2,44	7,02	5,09
7	3,66	8,33	3,95
8	6,11	4,18	3,59

Tablo 4.2. Gruplara göre doku MDA düzeylerinin ortalama ve standart hata değerleri (nmol/mg protein).

Gruplar	Doku MDA Düzeyleri (Ort.±Std. hata)
Grup K (n=8)	4,17±0,460
Grup İ/R (n=8)	7,86±1,068
L+Grup İ/R(n=8)	3,96±0,252

Gruplar kendi içinde birbirleriyle Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırıldığında Grup K ile Grup İ/R ve Grup L+İ/R ile Grup İ/R arasında anlamlı istatistiksel fark olduğu görüldü ($p<0,05$). Ancak kontrol grubu ile İ/R+L grubu arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ($p>0,5$) (Tablo4.2). Sonuç olarak Leptinin mesane dokusunu reperfüzyon hasarından koruduğu MDA düzeyindeki düşüşten anlaşılmaktadır (Şekil4.1).



Şekil 4.1. Gruplara göre doku MDA düzeylerinin ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması (nmol/mg protein).

4.1.2 Doku TNF- α Düzeylerinin Sonuçları

İnflamatuvar sürecin parametresi olan TNF- α 'nın doku konsantrasyonu ölçülerek reperfüzyon hasarın değerlendirilmesi yapıldı. Doku TNF- α düzeylerinin gruplara göre ölçülen değerleri Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Doku TNF- α düzeylerinin gruplara göre dağılımı (ngr/g protein).

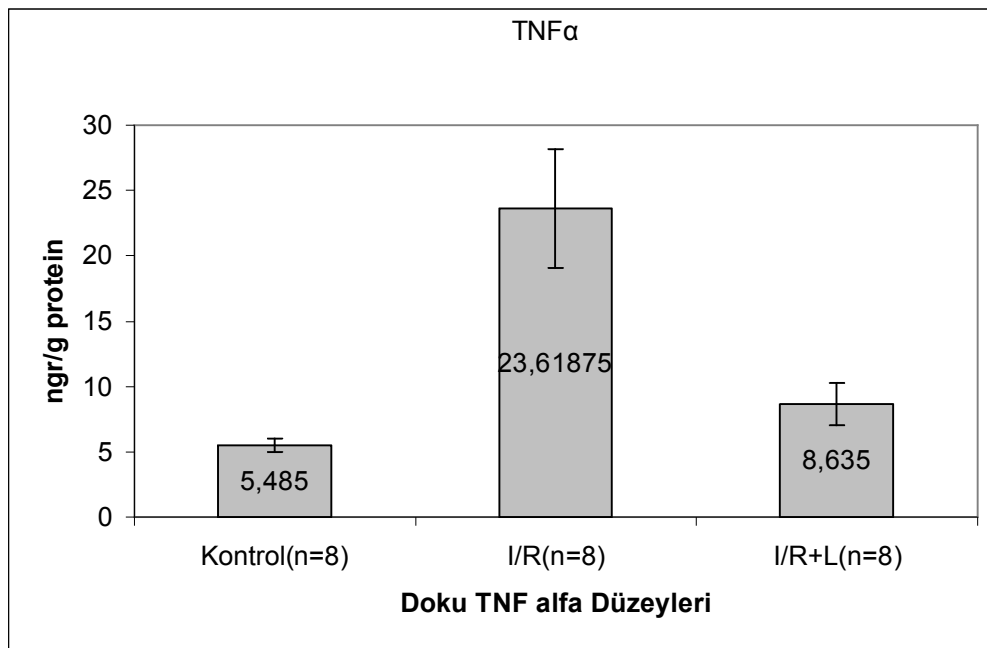
Rat No	Kontrol Grubu	İ/R Grubu	L + İ/R Grubu
1	3,47	11,09	4,12
2	6,66	24,55	12,40
3	5,34	42,9	17,6
4	8,21	39,19	10,10
5	6,15	31,16	4,2
6	4,97	12,69	5,12
7	4,01	15,3	7,34
8	5,07	12,07	6,20

Bu değerlerin tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi sonucunda; ortalama doku TNF- α düzeyleri Grup K'da 5,48 ngr/g protein, Grup İ/R'da 23,61 ngr/g protein ve Grup L+İ/R'da 8,63 ngr/g protein olarak bulunmuş olup her üç grup arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde fark tespit edildi ($p < 0,001$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Gruplara göre doku TNF- α düzeylerinin ortalama ve standart hata değerleri (ngr/g protein). $F(2:21)=12,041$, $p < 0,001$.

Gruplar	Doku TNF- α Düzeyleri (Ort. \pm Std. hata)
Grup K (n=8)	5,48 \pm 0,533
Grup İ/R (n=8)	23,61 \pm 4,533
Grup L+İ/R(n=8)	8,63 \pm 1,59

Gruplar kendi içerisinde birbirleri ile Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırıldıklarında; Kontrol grubu ile İ/R grubu arasında ileri düzeyde önemli farklılık saptandı ($p<0,001$). Bununla beraber kontrol grubu ile L+İ/R grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı görüldü ($p>0,05$). İ/R ve L+İ/R grupları arasında ise çok önemli fark olduğu saptandı ($p<0,01$) (Şekil 4.2). TNF- α düzeyi, dokuda inflamatuvar sürecin önlenemediğini açıkça gösterir bir şekilde İ/R grubunda anlamlı derecede yükselmiş olarak saptanırken, leptin tedavisi verilen tedavi verilen grupta bu artışın engellendiği gözlemlendi.



Şekil 4. 2. Gruplara göre doku TNF- α düzeylerinin ortalama değerlerinin grafiksel karşılaştırılması (ngr/ g protein). ($F(2;21)=12.04$, ($p<0.001$ ***))

4.2. Histopatolojik Bulgular

4.2.1. Mesane Spesmenlerinin İstatistiksel Sonuçları

Deney sonucunda ratlardan alınan mesaneler daha öncede tarif edildiği gibi çeşitli işlemlerden geçtikten sonra hazırlanan preparatlar aynı histolog tarafından kör olarak incelendi. Her grubun mesaneden hazırlanmış preparatlarda apoptoz görülen hücreler mukoza (ürotelyum), stroma (submukoza) ve kas tabakasında ayrı ayrı sayıldı. Mesane spesmenlerinin histopatolojik değerlendirilmesi sonucunda tüm gruplardaki her ratın ürotelyum, stroma ve kas dokusundaki apoptotik hücre sayıları Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Tüm grupların ürotelyum, stroma ve kas dokularındaki apoptotik hücre sayıları.

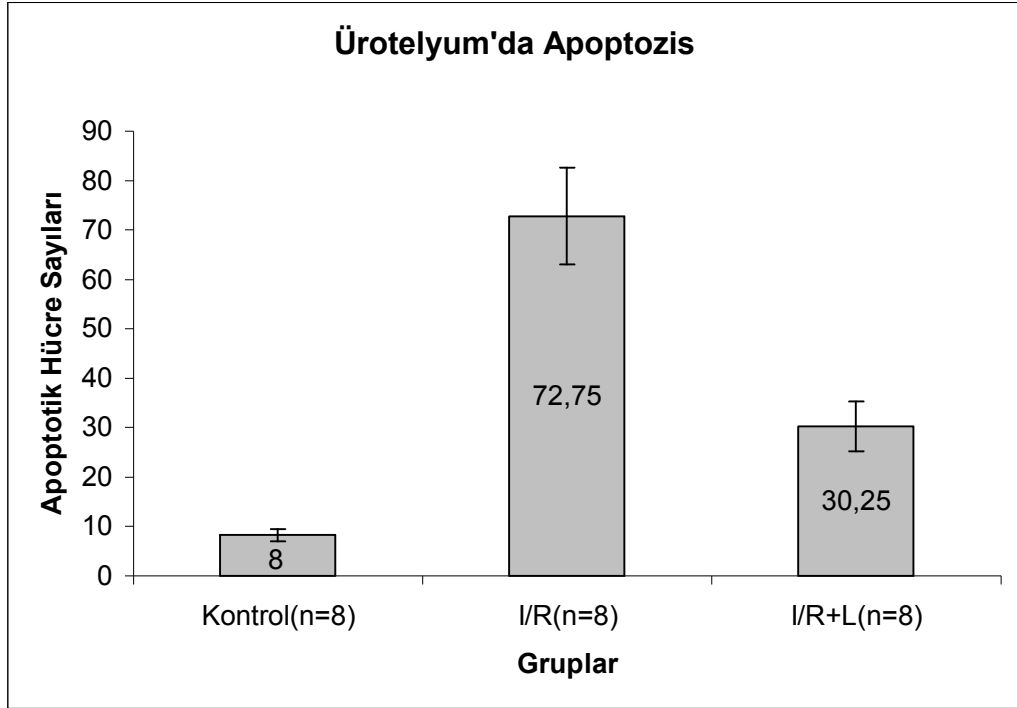
RAT NO	ÜROTELYUM			STROMA			KAS		
	Kontrol	I/R	I/R+L	Kontrol	I/R	I/R+L	Kontrol	I/R	I/R+L
1	10	107	45	21	155	39	7	627	117
2	13	57	17	16	185	58	2	322	44
3	7	93	22	11	179	28	5	612	36
4	3	103	57	17	116	41	12	597	95
5	7	86	31	8	177	37	4	486	60
6	10	54	19	17	80	54	12	383	71
7	4	47	30	6	109	53	2	331	41
8	12	35	21	19	78	17	6	327	63

Bu değerlerin tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile incelenmesi sonucunda ortalama apoptoz görülen hücre sayıları değerlendirildiğinde her üç grup arasında anlamlı istatistiksel fark tespit edildi ($p < 0,001$).

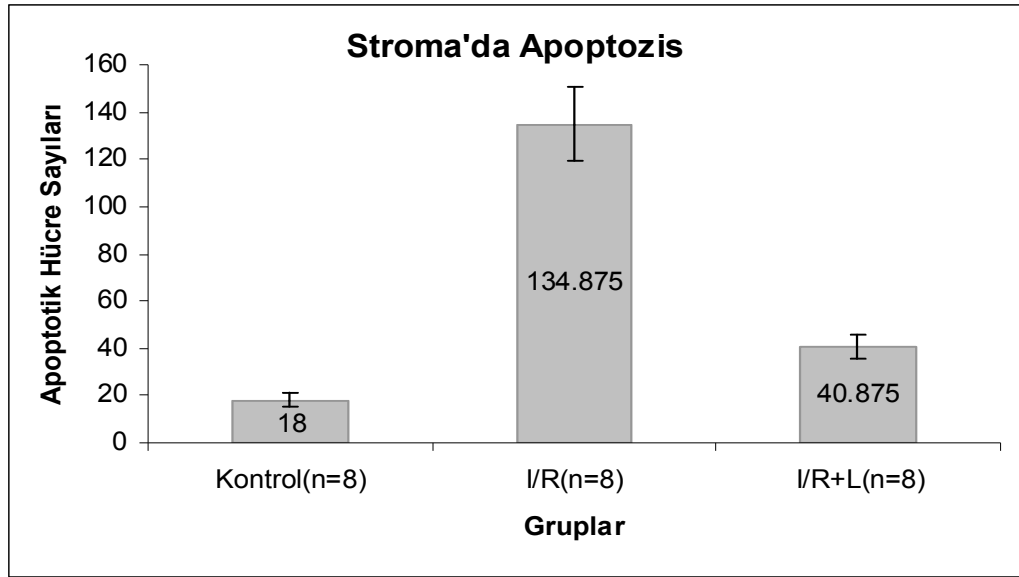
Tablo 4.6. Gruplara göre apoptoz görülen hücre sayılarının ürotelyum, stroma ve kas dokusunda ortalama ve standart hata değerleri (Ürotelyum; $F(2;21)=26,396$ $p < 0,001$. Stroma; $F(2;21)=40,509$ $p < 0,001$. Kas; $F(2;21)=59,842$ $p < 0,001$).

Apoptotik Hücre sayıları	Grup K (n=8)	Grup İ/R (n=8)	Grup L+İ/R(n=8)
Ürotelyum (Ort.±Std. hata)	8±1,278	72,75±9,784	30,25±4,98
Stroma (Ort.±Std. hata)	18±3,297	134,875±15,760	40,875±4,940
Kas (Ort.±Std. hata)	6±1,398	523,125±62,516	65,875±9,929

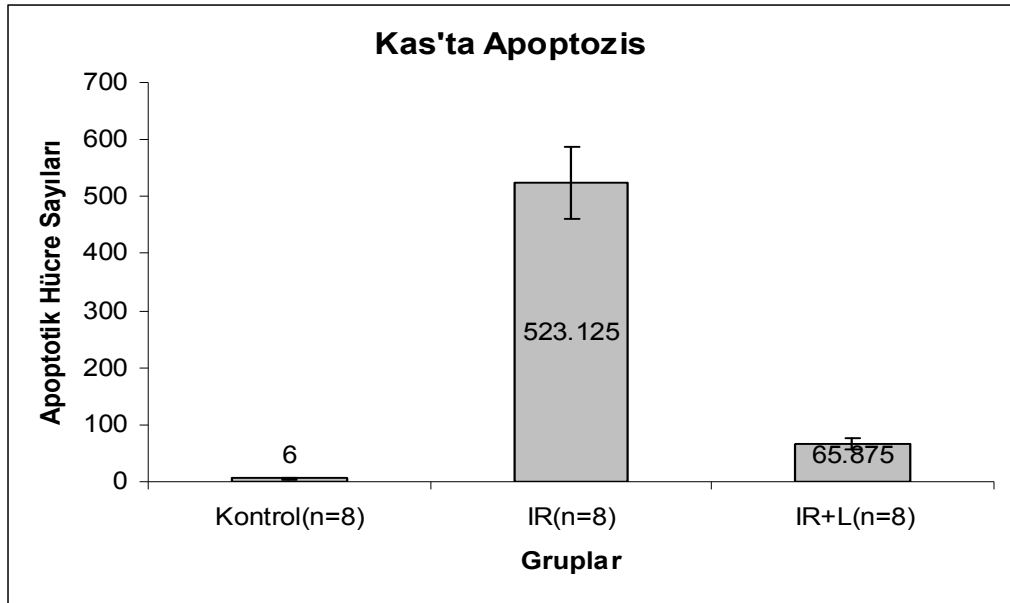
Herhangi bir işlem uygulanmadan mesanesi alınan kontrol grubundaki ratların, epitelyum, stroma ve kas tabakasındaki apoptoz görülen hücre sayıları, diğer gruplardan daha düşük olduğu saptandı. İ/R grubunda apoptoz görülen hücre sayıları mesanenin her üç tabakasında da anlamlı derecede yüksek olduğu, gözlemlendi. Öncesinde leptin verildikten sonra İ/R uygulanan tedavi grubunda ise apoptoz görülen hücre sayılarının İ/R grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. Her üç grubun epitelyum, stroma ve kas tabakasındaki apoptoz görülen hücre sayılarının ortalama ve standart hata değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu tespit edildi (Tablo 4.6) (Grafik 4.3–5).



Şekil 4.3. Ürotelyumdaki apoptotik hücrelerin gruplara göre dağılımının grafiksel karşılaştırılması.



Şekil 4.4 Stromadaki apoptotik hücrelerin gruplara göre dağılımının grafiksel karşılaştırılması.



Şekil 4.5. Kas dokusunda apoptotik hücrelerin gruplara göre dağılımının grafiksel karşılaştırılması.

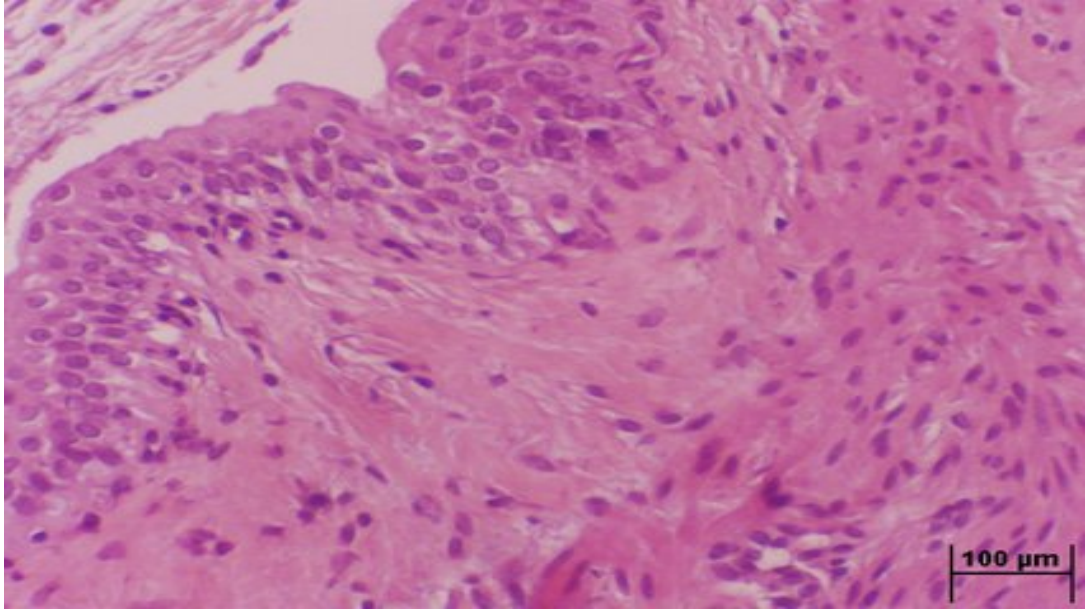
Gruplar keni içinde birbirleri ile Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırıldı. Epitelyum, stroma ve kas tabakasındaki apoptotik hücre sayıları ayrı ayrı olarak karşılaştırıldı. Mesanenin her üç tabakasında kontrol grubu ile I/R grubu arasında anlamlı derecede fark saptanırken ($p < 0,001$), L+I/R grubuyla fark olmadığı

görüldü ($p>0,05$). İ/R grubu ile leptin tedavisi uygulanan L+İ/R grubu arasında ise anlamlı derecede fark saptandı ($p<0,001$). Bu sonuçlar leptinin antiapoptotik etkisinin olduğunun bir göstergesi olarak yorumlandı.

4.2.2.Mesane Spesmenlerin Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Grup I. Kontrol

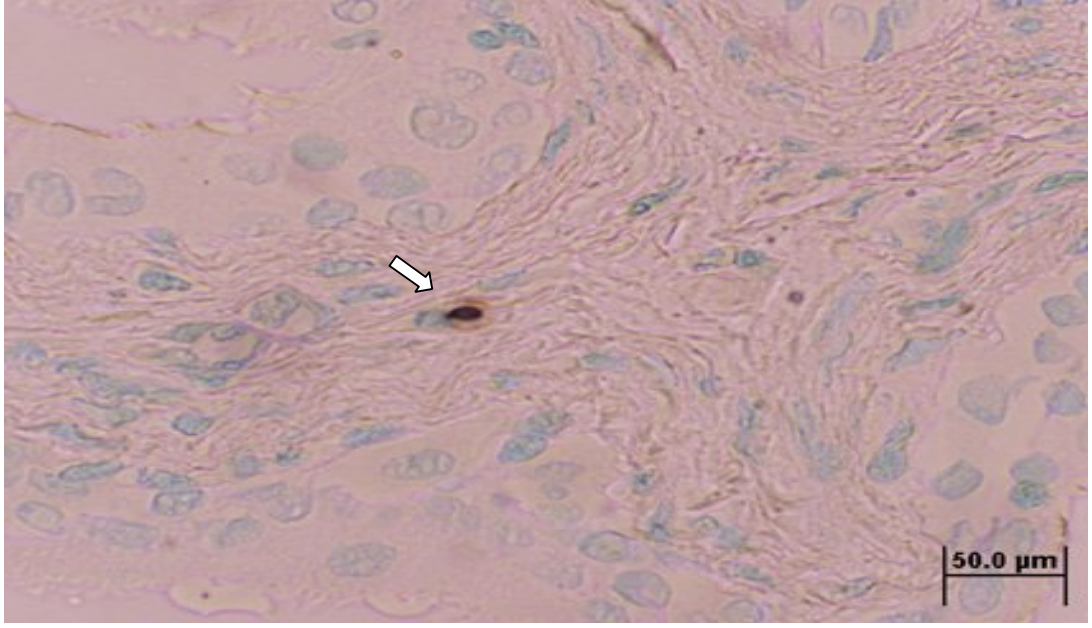
Kontrol grubuna ait mesane kesitlerine genel yapı özelliklerini belirlemeye yönelik yapılan H&E boyama yönteminde mesane duvarının tunika mukoza, muskularis ve adventisiyadan oluştuğu gözlemlendi. Tunika mukoza çok katlı değişici epitelyum (ürotelyum) ve fibroelastik lamina propriadan oluşmuştu (Şekil 4.1). Lamina propriadaki bağ dokusu epitele komşu bölümde sıkı düzensiz, muskularise yakın bölümde ise gevşek düzensiz yapıda gözlemlendi. Lamina propriada ayrıca kas hücrelerine rastlandı. Tunika muskularis üç tabaka şeklinde düzenlenmişti ve kas demetleri gevşek bağ dokusu septaları ile ayrılmıştı.



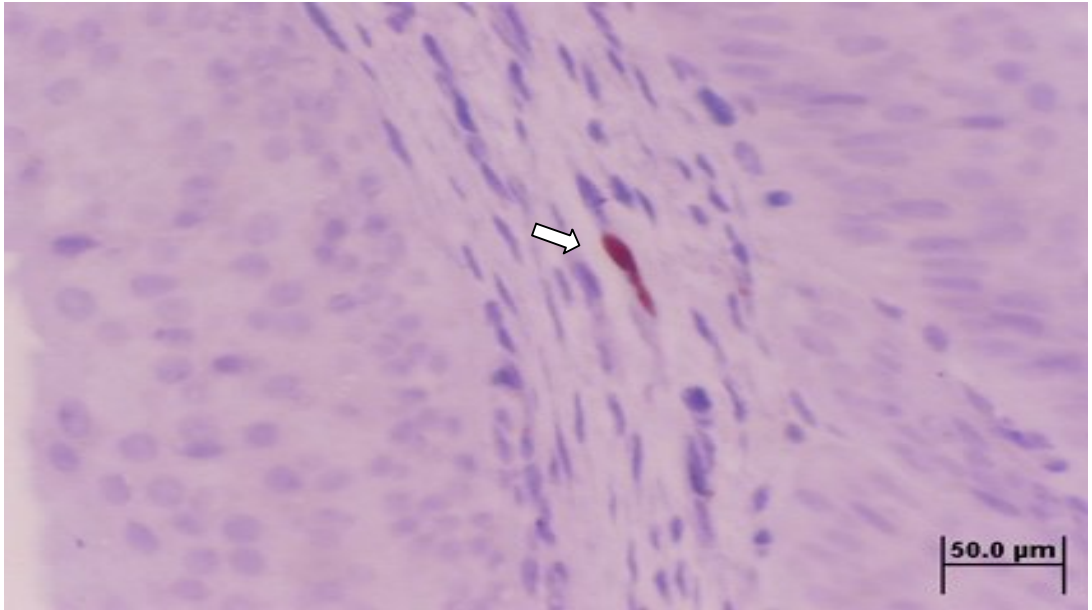
Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde normal görünümlü çok katlı değişici epitel ve lamina propria. H&E. Orijinal büyütme. X20.

TUNEL tekniği ile boyanmış kontrol grubuna ait mesane kesitlerinde lamina proprialarda sadece 1–2 adet hücrede apoptozis gözlemlendi (Şekil 4.2).

bcl-2 boyama tekniği uygulanan kontrol grubuna mesane kesitlerinde lamina proprialarda yine 1–2 hücrede pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.3).



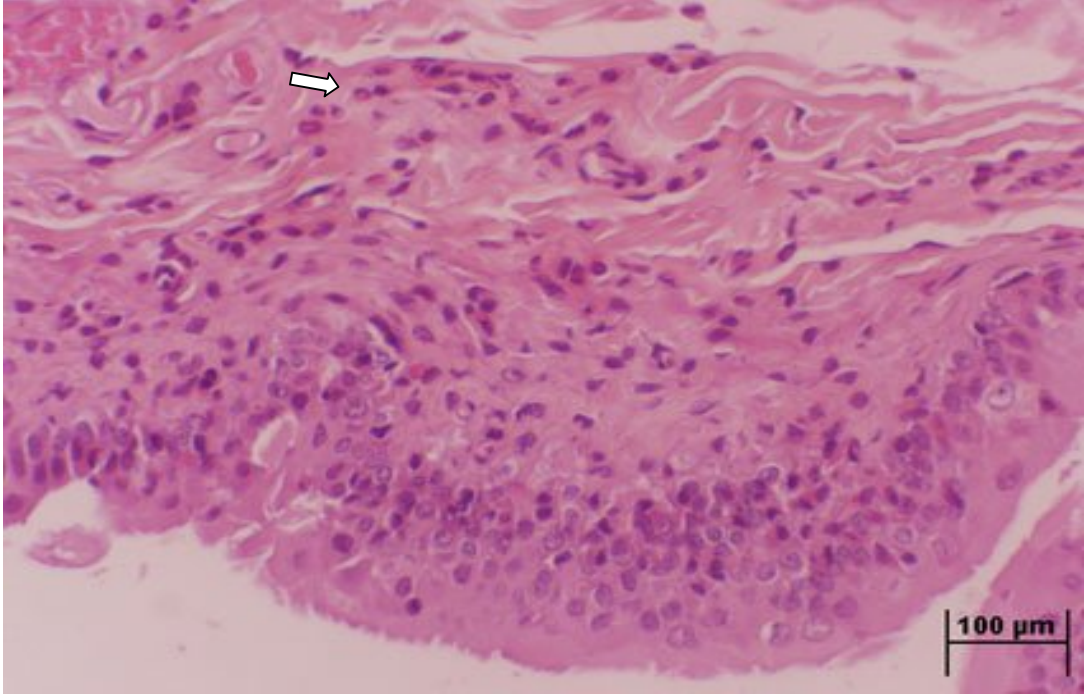
Şekil 4.7. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada çok nadir gözlenen stromal apoptoz gösteren hücre. TUNEL boyama. Orj. Büyütme X40.



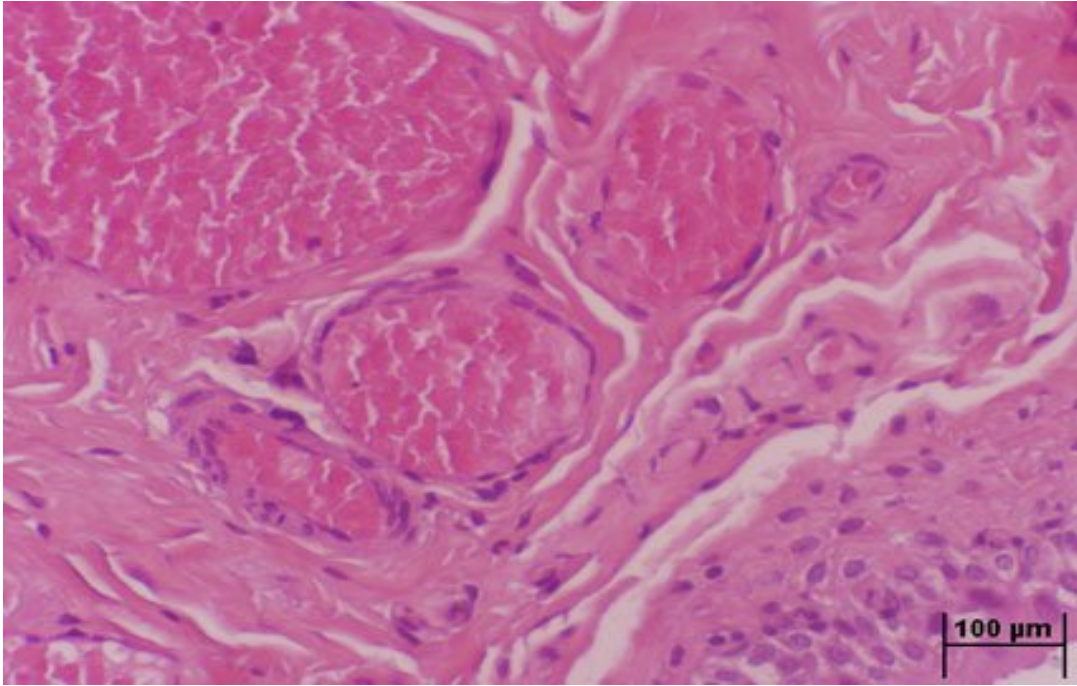
Şekil 4.8. Kontrol grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada çok nadir gözlenen bcl-2 pozitif stromal hücre. Orj. büyütme X40.

Grup II. İskemi/Reperfüzyon

İskemi grubuna ait H&E ile boyanmış mesane kesitlerinde epitel hücrelerinde çeşitli derecelerde dejenerasyon, l. propriada hücreyel infiltrasyonun (PNL) arttığı (Şekil 4.4) ve damarlarda konjesyon ile dilatasyonun olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5).

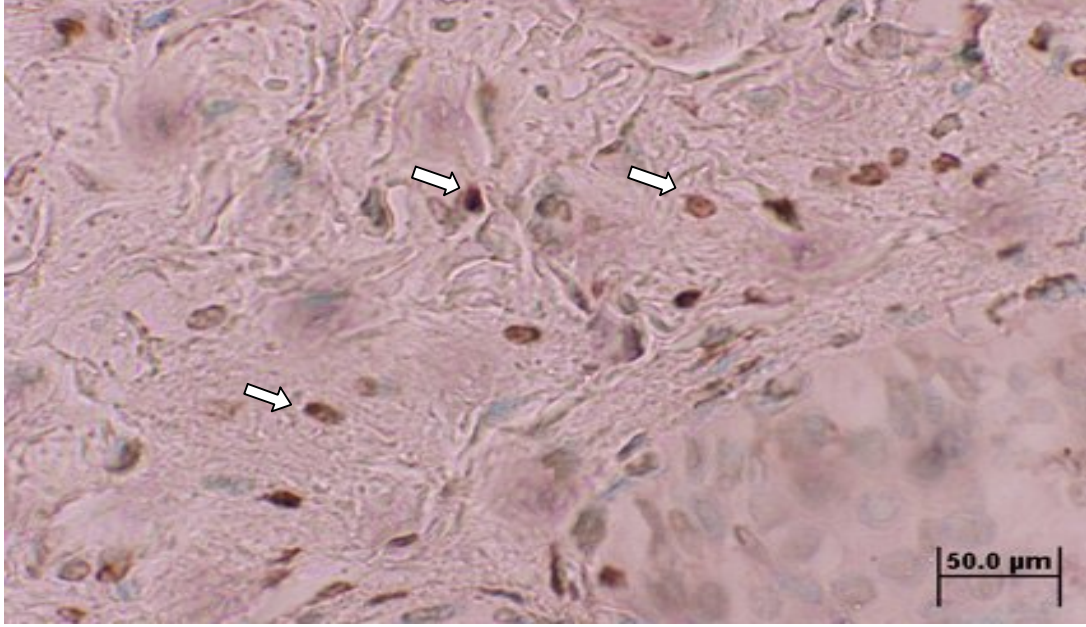


Şekil 4.9. İ/R grubuna ait mesane kesitinde çok katlı değişici epitelde bazı hücrelerde dejenerasyon ile l. propriada çok sayıda (→) PNL infiltrasyonu. X20.

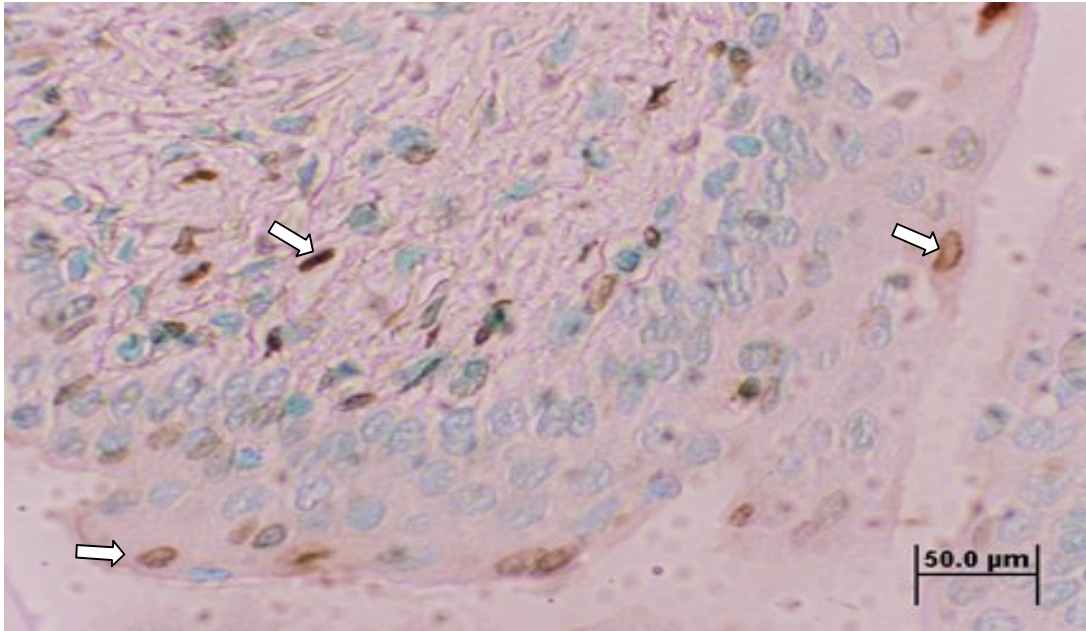


Şekil 4.10. İ/R grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada vasküler dilatasyon ve konjesyon. H&E. Orijinal büyütme. X20

TUNEL boyama tekniği uygulanmış İ/R grubuna ait mesane kesitlerinde özellikle epitel, lamina propria ve muskularis tabakasında apoptoz gösteren hücreler oldukça artmıştı (Şekil 4.6 ve 4.7).

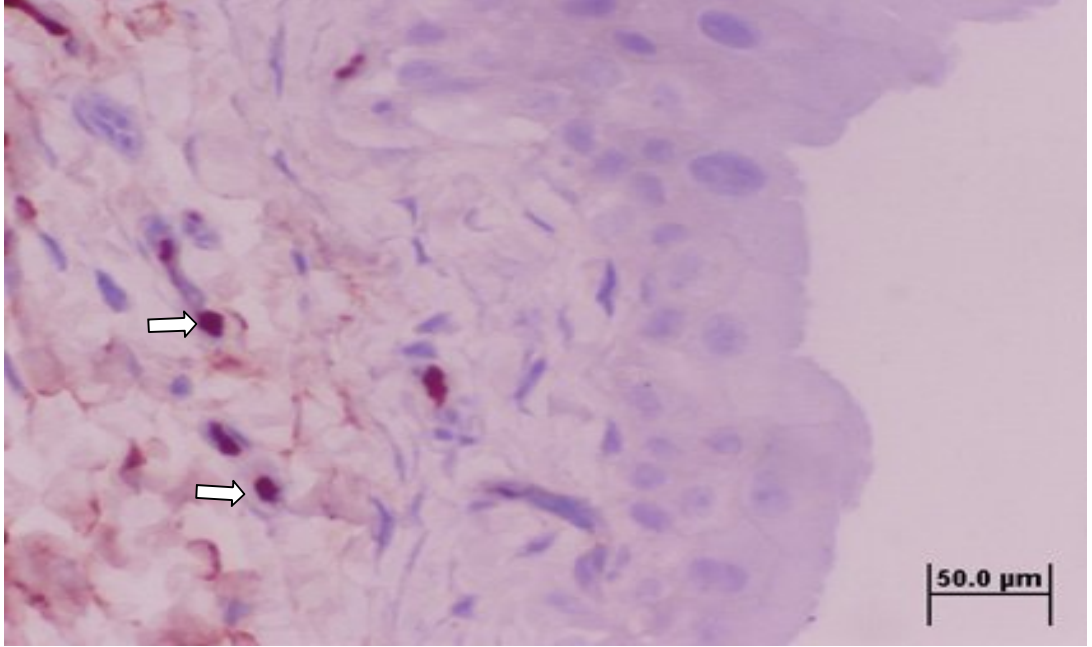


Şekil 4.11. İ/R grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada çok sayıda stromal (→) apoptoz gösteren hücreler. TUNEL boyama. Orj. büyütme X40.

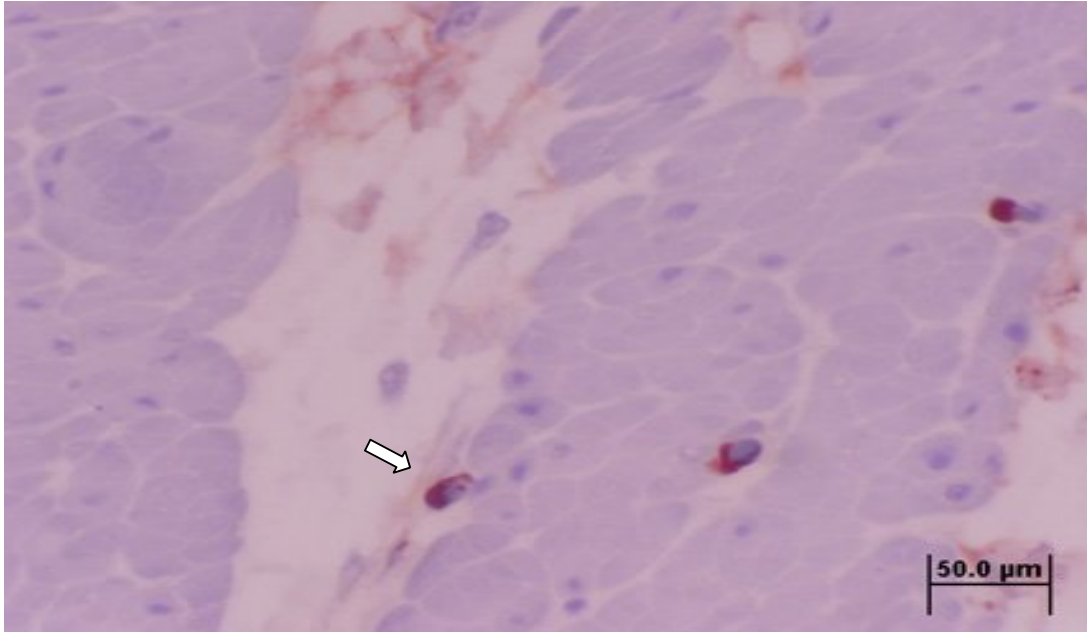


Şekil 4.12. İ/R grubuna ait mesane kesitinde epitelial ve l.propriada çok sayıda (→) stromal apoptoz göstren hücreler. TUNEL boyama. Orj. Büyütme X40.

Bcl-2 boyama tekniği uygulanan iskemi grubuna ait mesane kesitlerinde lamina propriada (Şekil 4.8) ve muskularis tabakasında bazı hücrelerinde (Şekil 4.9) pozitif reaksiyon gözlemlendi.



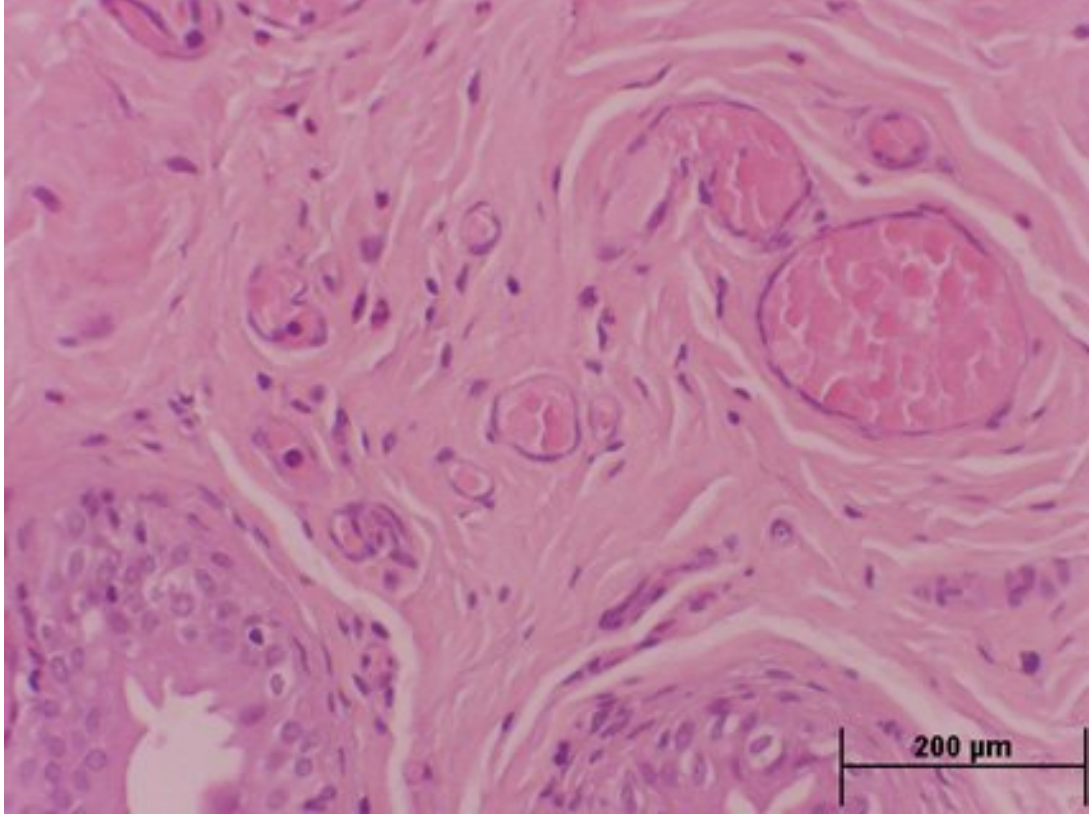
Şekil 4.13. İ/R grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada (→) stromal bcl-2 pozitif hücreler. Orj. Büyütme X40.



Şekil 4.14. İ/R grubuna ait mesane kesitinde kas hücreleri arasında bcl-2 pozitif hücreler. Orj. Büyütme X40.

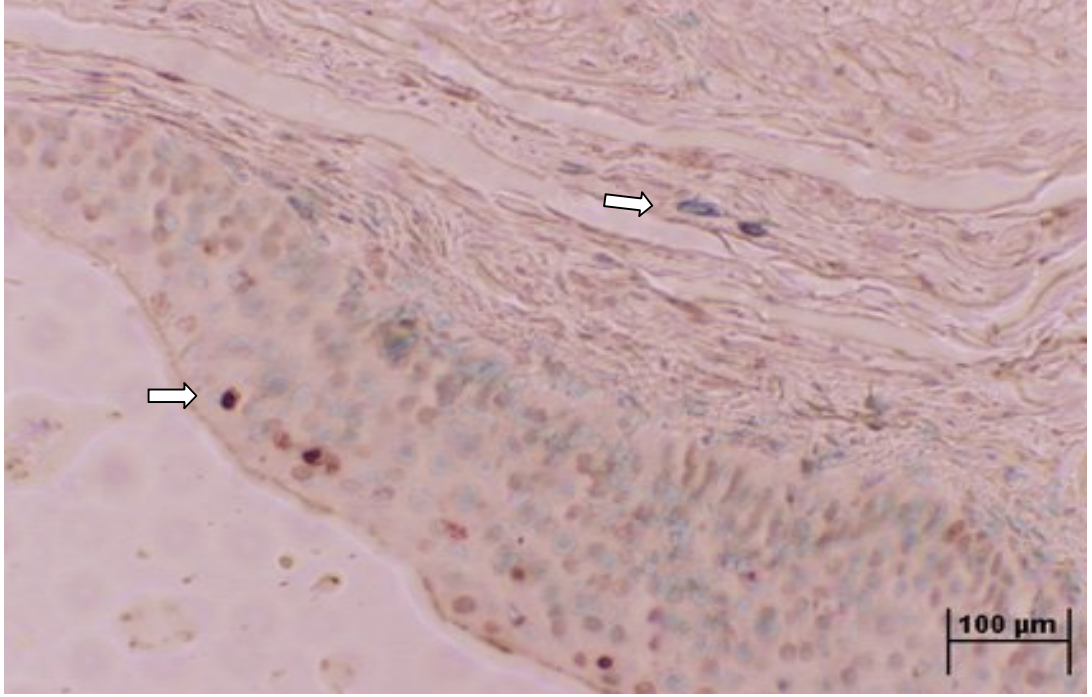
Grup III. Leptin + İskemi/Reperfüzyon

Leptin verildikten sonra İ/R uygulanan ratlara ait H&E ile boyanmış mesane kesitlerinde İ/R grubu ile karşılaştırıldığında, epitelyal dejenerasyonun, eritrosit ekstravazasyonun ve hücresel infiltrasyonun kısmen azaldığı gözlemlendi (Resim 4.10).

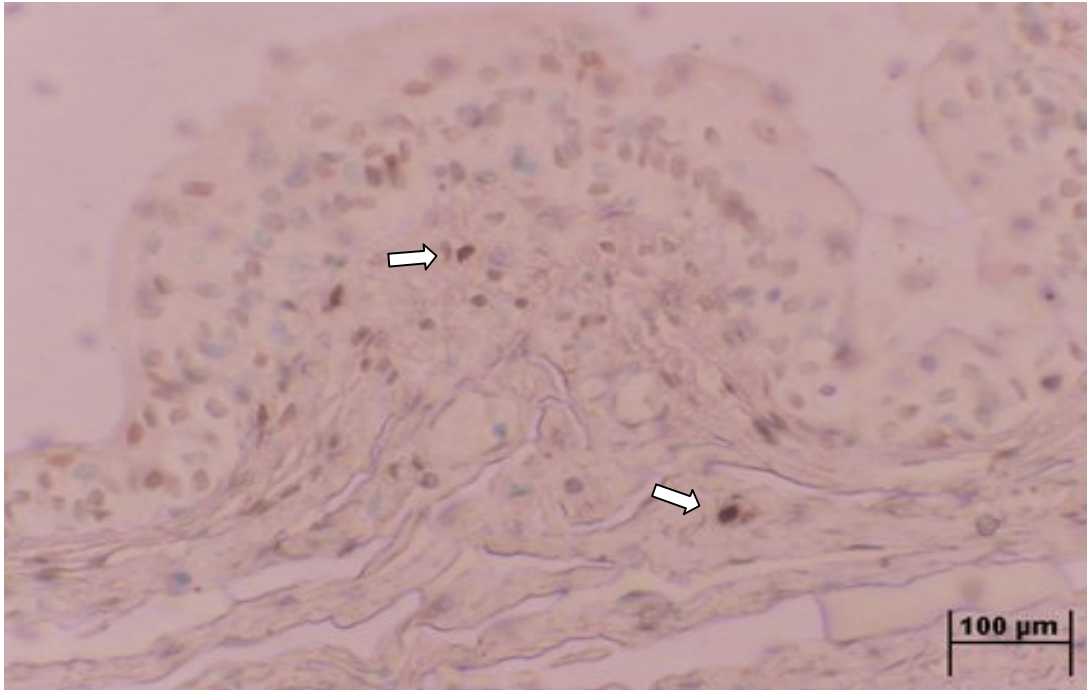


Şekil 4.15. Leptin + İ/R grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada (→) inflamasyonun (PNL), vasküler dilatasyon ve konjesyonun kısmen azaldığı gözleniyor. H&E. Orijinal büyütme. X20.

TUNEL boyama tekniği uygulanmış Leptin + İ/R grubuna ait mesane kesitleri özellikle epitelyum ve lamina propriada İ/R grubu ile karşılaştırıldığında, apoptoz gösteren hücreler oldukça azalmıştı (Şekil 4.11), (Şekil 4.12).

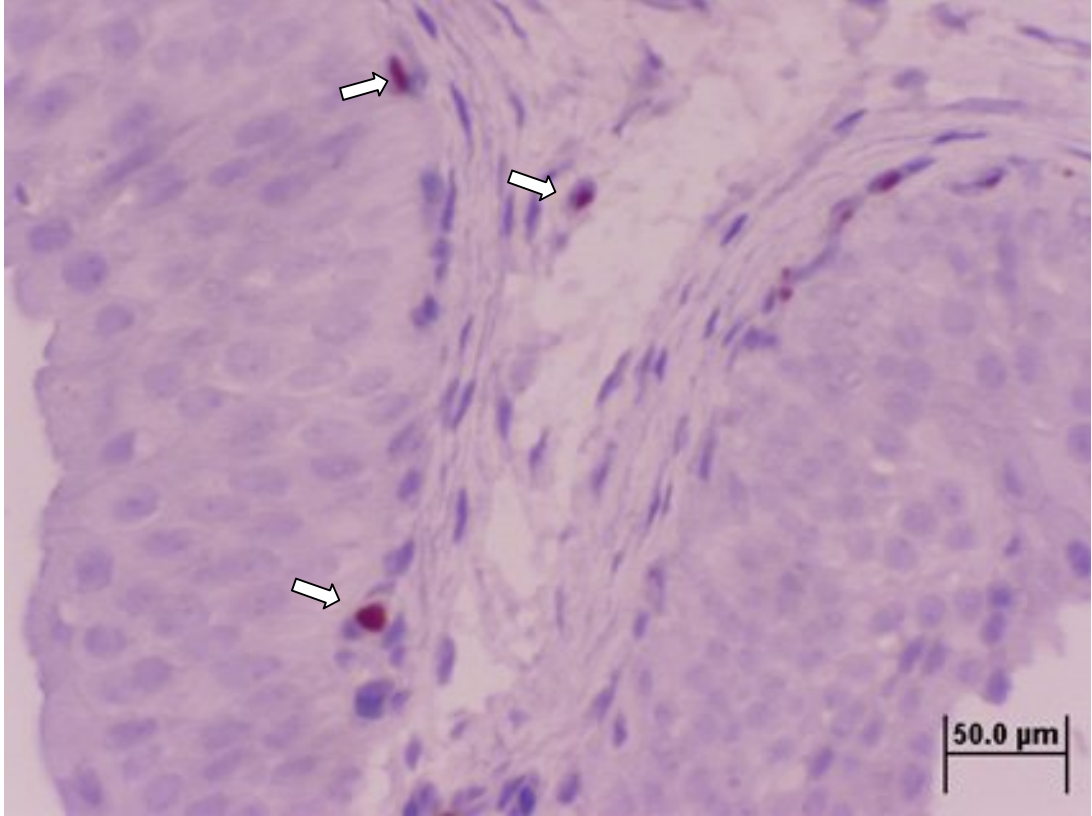


Şekil 4.16. Leptin + İ/R grubuna ait mesane kesitinde epitelyum ve lamina propriada az sayıda (→) stromal apoptoz gösteren hücreler. TUNEL boyama. Orj. Büyütme X20.



Şekil 4.17. Leptin + İ/R grubuna ait mesane kesitinde lamina propriada az sayıda (→) stromal apoptotik hücreler. TUNEL boyama. Orj. Büyütme X20.

Bcl-2 boyama tekniği uygulanan Leptin+İ/R grubuna ait mesane kesitlerinde İ/R grubu ile karşılaştırıldığında, epitelyum ve lamina propriada az sayıdaki hücrede pozitif reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Leptin İ/R ve leptin grubuna ait mesane kesitinde az sayıda epitelyum ve lamina propriada (→) stromal bcl-2 pozitif apoptoz gösteren hücreler Orj. Büyütme X40.

TARTIŞMA

İskemi klinik tıpta hücre zedelenmesinin en sık görülen tipidir. Genellikle dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması sonucu oluşur. Kan akımının yeniden sağlanması yani reperfüzyon, iskemik dokunun iyileşebilmesi için ön koşuldur. Ancak iskemik dokunun reperfüzyonu bir taraftan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesini sağlarken bir taraftan da hücre kaybı devam ederek daha ileri hasarlara neden olmaktadır. Bu durum İ/R hasarı olarak adlandırılan önemli bir klinik olaydır.

Bir dokuyu besleyen kan akımı engellendiğinde sırasıyla oksijen yetersizliği, ATP'nin azalması, kalsiyum homeostazının kaybı, plazma membran permeabilitesinde yetersizlik ve mitokondriyal hasar gibi bir dizi kimyasal olay başlar. Bu olayların sonucunda akut hücrel şişme, intertisyel ödem ve hücrel disfonksiyon meydana gelir. Tekrar dokunun kanlanması sağlanamazsa sonunda hücrel ölüm gerçekleşir. Doku reperfüze edildiğinde ise iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gözlenir. Reperfüzyon, iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla hasara uğratan bir reaksiyon sürecini başlatır (29,34). Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir.

İ/R'na 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'ne çevrildiği tahmin edilmektedir. Oksijenden üretilen en önemli reaktif türler arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^\cdot), 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 (142).

Mesanein iskemisi ve sonrasında reperfüzyonu idrar retansiyonu, ateroskleroz, vazospazmlar, emboli ve tromboz gibi yaşla ilişkili bozukluklarda

görülebilmektedir (2,143). Bu hastalıklar sonrası gelişen İ/R, mesane disfonksiyonuna neden olabilir (2,3,143). Parsiyel mesane çıkım obstrüksiyonunda mesane duvarındaki kan akımında (iskemi) ve oksijen basıncında (hipoksi) azalma olduğu gösterilmiştir (144). Hatta Siroky ve arkadaşları köpek mesanelerinde yaptığı çalışmada obstrüksiyon olmaksızın mesane perfüzyonunun dolun fazında ve miksiyon esnasında akut değişiklikler gösterdiğini saptamışlardır (144). Artmış duvar kalınlığının her miksiyonda siklik bir İ/R'na aracılık ettiği gösterilmiştir (8). Bununla beraber akut overdistansiyon veya retansiyondan sonra yapılan dekompresyon ya da kateterizasyondan sonra görülen mesane disfonksiyonunun İ/R'na bağlı olduğu bildirilmiştir (9,14).

Leptinin vücuttaki başlıca rolü, beyin (özellikle hipotalamus) üzerine negatif "feedback" etki ile gıda alımını ve enerji metabolizmasını düzenlemek ve obezite gelişmesini engellemektir. Ayrıca, metabolizmanın düzenlenmesi, cinsel gelişim, üreme, hematopoez, immünite, gastrointestinal fonksiyonların düzenlenmesi, sempatik sinir sistemi aktivasyonu, anjiyogenez ve osteogenezis'de de çok önemli rolleri olduğu saptanmıştır (145).

Başlıca adipositlerden sentezlenen ve salgılanan leptin antiobesite hormonu olarak görev yapmasıyla beraber çeşitli hücre tiplerinde proliferatif ve anti-apoptotik etkileri gösterilmiştir. Timositlere (T cell lenfosit) hem invivo hemde invitro olarak antiapoptotik etkisinin olduğu rapor edilmiştir (17, 95). Leptinden yoksun ob/ob farelerde serumda düşük olan katalaz, GSH-Px, glutatyon redüktaz gibi anti oksidan enzim düzeyleri 15 günlük 100µgr/kg leptin tedavisiyle yükseldiği gözlenmiştir (20). Leptin sentezi enfeksiyon, endotoksin, TNF-α ve IL-1 gibi sitokinler tarafından stimüle edilir.

Literatürde leptinin mesanedeki İ/R hasarına etkisini değerlendiren bir çalışmaya rastlayamadık. Bu nedenle yapılan deneysel çalışmamızda leptinin İ/R hasarına karşı mesaneyi koruyucu etkilerini değerlendirmeyi amaçladık.

Dokular hipoksiye farklı sürelerde dayanıklılık gösterirler. Önceki yapılan çalışmalar incelendiğinde iskemi ve reperfüzyon süreleri farklılık göstermekteydi. Korosec ve Jezernik farklı iskemi sürelerini uygulayarak rat mesanesinde meydana gelen erken sellüler ve ultrastrüktürel değişiklikleri araştırmışlar (146). 30 dk iskemide ürotelyumda sadece süperfizyel hücrelerde tek tek ayrılma izlenirken, 120

dk iskemide irreversibl değişiklikler meydana gelmiş, 40. dk. iskemi ve sonrasında 60 dk reperfüzyon uygulandığında ise ürotelyumda hasarın daha belirgin olduğu saptanmış. Ürotelyumdaki hasarın reperfüzyon uygulanan gruplarda daha fazla olduğu gözlenmiş. Ayrıca 1 saat iskemi uygulanması mesanedeki hücrelerin ATP içeriğinde %80 azalmaya neden olduğu gösterilmiş. Bu nedenle çalışmamızda iskemi süresinin belirgin hasar oluşturacak kadar uzun ve irreversibl hasar oluşturmayacak kadar kısa olmasına özen gösterildi. Bu ölçütlere en uygun iskemi süresinin 45 dk olduğu kararlaştırıldı. Reperfüzyon süresi belirlenirken ise uygulanan deneysel maddelerin etkilerinin görüleceği kadar uzun ve iyileşme sürecinin deneysel maddelerin etkilerini maskelemeyecek kadar kısa olması amaçlandı. Reperfüzyon süresi ise 60 dk olarak belirlendi.

İ/R sonucu oluşan serbest radikallerin en önemli hedef yapılarından biri lipidlerdir. Lipid peroksidasyonu bazı araştırmacılar tarafından İ/R hasarında anahtar olarak kabul edilmektedir. SOR çok kısa ömürlü olduğu için direk yöntemlerle ölçümleri zor olmaktadır. Bu nedenle indirek yöntemler tercih edilmekte bu amaçla da genellikle lipid peroksidasyon ürünü olan MDA bakılmaktadır.

Nötrofil elastaz inhibitörü olan *Sivelestat Na hidrat*'ın mesane İ/R hasarına karşı koruyucu etkinliğinin araştırıldığı çalışmada, MDA düzeyleri kontrol grubuna göre İ/R grubunda anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir (147). Hisadome ve arkadaşları tarafından rat mesanesindeki İ/R hasarına prekondisyonun yararlı etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, doku MDA düzeyleri İ/R grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede yükselmiş olarak gözlenirken prekondisyon uygulanan grupta ise hem kontrol hemde İ/R grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğu bildirilmiştir. Mesanede İ/R uygulanan diğer çalışmalarda da İ/R grubunda önemli derecede doku MDA düzeylerinin yükseldiği saptanmıştır (148–150). Bizim çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda doku MDA düzeylerinin anlamlı derecede arttığını saptadık. Leptin verilen tedavi grubunda ise bu artışın engellendiği ve düşük kaldığı izlendi. Oksidan hasarın önemli bir parametresi olan lipid peroksidazın bir ürünü olan MDA düzeylerindeki azalma leptinin reperfüzyon hasarına karşı mesane dokusunu koruduğunun bir göstergesi olduğunu düşündük.

Sitokinler polipeptid yapıda olup inflamasyonda en önemlileri interlökinler (IL) ve tümör nekroz faktör-alfadır (TNF- α). Özellikle IL-1 ve TNF- α birçok ortak biyolojik özellikleri paylaşır. Her ikisi de aktive monosit, makrofajlar, lenfosit ve diğer hücre tipleri tarafından oluşturulur ve proinflamatuvar 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 , 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 (151). Ayrıca Nötrofillerin inflamatuvar bağırsak hastalığı, romatoid artrit, kanser ve reperfüzyon hasarında, hasardan sorumlu major ajanlar olduğu düşünülmektedir.

İnce bağırsak (21), mide (22), böbrek (23), karaciğer (152) gibi birçok organda TNF- α İ/R hasarının bir göstergesi olarak çalışılmış. Ancak mesanenin İ/R hasarına TNF- α ile ilgili bir çalışma bulamadık. Çalışmamızda mesanede İ/R hasarının göstergelerinden biri olarak TNF- α seviyelerini değerlendirdik. TNF- α kontrol grubuyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda istatistiksel olarak önemli derecede arttığı gözlemlendi. Leptin tedavisi verilen grupta ise TNF- α seviyelerinin İ/R grubuna göre daha düşük kaldığı ve bu artışın engellendiğini saptadık. Bu da bize leptin tedavisinin reperfüzyon hasarında tetikleyici rol oynayan nötrofillerin aktivasyon ve infiltrasyonunu engelleyerek inflamatuvar cevabın azalttığını düşündürmektedir.

Saito ve arkadaşları mesane İ/R hasarında mikrosirkülasyondaki rüptürün sonucu olarak şiddetli eritrosit ekstrasvazasyonu 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 (101). Tavşan mesanesinin mukoza ve düz kas tabakasının anoksiye verdiği cevabın karşılaştırıldığı bir çalışmada, anoksik/iskemik hasara mukozanın düz kas hücrelerinden daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (153). Yenilmez ve arkadaşları tarafından mesanenin İ/R hasarına karşı *Ginkgo biloba*'nın koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada, mukozada oluşan histopatolojik değişiklikleri tanımlamışlardır (154). 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 (150).

Bizim çalışmamız da İ/R grubunda mukozadaki epitel hücrelerinde dejenerasyon ve ayrılma ile submukoza ve kas tabakasında ise konjesyon, vasküler dilatasyon, eritrosit ekstrasvasyonu ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi. Kontrol grubunda görülmeyen bu farklı histopatolojik bulgular İ/R hasarının göstergesi olarak yorumlandı. Bu değişiklikler literatürdeki çalışmalarla uyumluydu (150,154). Ayrıca İ/R grubuyla karşılaştırıldığında, leptin verilen tedavi grubunda konjesyon, eritrosit ekstrasvasyonu ve lökosit infiltrasyonu gibi histopatolojik değişiklikler daha az izlendi. Bu histopatolojik düzelmeye leptinin tedavi edici özelliğinin bir göstergesi olarak yorumlandı. Mukozadaki histopatolojik değişiklikler. Yenilmez (154) ve Toklu (150)'yu destekler nitelikteydi, Satio (6) ve arkadaşlarından farklı bulunmasının nedeni ise iskemi ve reperfüzyon sürelerinin farklı uygulanmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Apoptosis (programlı hücre ölümü) hem fizyolojik hem patolojik olaylarda meydana gelen ve homeostazın devamlılığı için ne kadar önemli olduğu bilinen kompleks bir süreçtir. Apoptotik süreci başlatan, indükleyen ve baskılayan birçok faktör tanımlanmıştır. Diğer taraftan, apoptozis mesane İ/R hasarında olduğu gibi patolojik süreçlerde önemli bir rol oynayan hücre hasarının aktif bir aşamasıdır.

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 düzelmeye ve apoptotik hücre sayısında azalma olduğu bildirilmiştir (10). Yenilmez ve arkadaşlarının *Ginkgo Biloba*'nın rat mesanesinde İ/R hasarına karşı koruyucu etkisini araştırdıkları çalışmada da kontrol grubuna göre İ/R grubunda apoptotik hücreler anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir. Tedavi grubunda ise apoptotik hücre sayılarının azaldığını saptamışlardır (154).

Saito ve arkadaşları apoptotik hücreleri sadece mesane düz kas dokusunda değerlendirmişler. Bizim çalışmamızda farklı olarak mesanenin mukoza, submukoza ve kas dokusu ayrı ayrı değerlendirildi. Levin ve arkadaşları mesanenin mukozal tabakasının lamina propria, submukoza, mukoza, epitelyal hücrelerden oluştuğunu ve

bu mukozal tabaka cerrahi olarak kaldırıldığında mesanenin ikinci tabakası olan düz kas tabakasının ortaya çıktığını ifade etmişler. Her iki tabakanın metabolik aktivitelerinin ve oksidatif strese hücrel yanıtlarının farklılığını ortaya koymuşlardır (153). Biz ise deneysel modelimizi oluştururken mesanenin mukoza ve kas tabakasını ayrı ayrı değerlendirmeyi amaçladık. Çünkü mukozal hasar klinikte daha çok irritatif miksiyon semptomlarıyla karşımıza çıkarken, kas dokusundaki hasar ise hipokontraktıl mesaneden akontraktıl mesaneye kadar değişen çok geniş bir klinik tablo oluşturabilmektedir.

Çalışmamızda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında İ/R grubunda mesanenin her üç tabakasında da apoptotik hücre sayısı anlamlı derecede yükselmişti. Bu durum İ/R bağlı gelişen hücre hasarının bir göstergesi olarak yorumlandı. Leptin verilen tedavi grubunda ise ışık mikroskopunda apoptotik hücelere daha az rastlanırken istatikselsel olarak da apoptotik hücre sayılarında önemli derecede azalma saptandı. İ/R hasarına karşı mesanenin her üç tabakasında epitelyum (mukoza), stroma (submukoza) ve kas dokusunda apoptotik hücelerin leptin tedavisiyle anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Bu sonuç İ/R hasarına karşı leptinin antiapoptotik etkiyle mesaneyi koruduğunun bir göstergesi olarak yorumlandı.

Mitokondriyal ve nükleer membranlarda ve endoplazmik retikulumlarda bulunan bir proteini kodlayan 18. kromozomda yerleşik bir protoonkojen olan bcl-2, apoptozu engelleyerek sağlıklı veya patolojik olan hücelerin hayatta kalmasını sağlar (155). Geniş bir anti-apoptotik proteinler grubundan oluşan bcl-2 familyasının (bcl-2, bcl-x1, bcl-w, Bag-1 ve BI-1) ekspresyonu apoptozu önler ve geniş bir proapoptotik protein grubunun (Bax, Bak, Bad, Bid ve Bim) ekspresyonunu azaltır. Bcl-2 immünohistokimyasal boyama yöntemi birçok dokuda apoptotik hücelerin gösterilmesi için kullanılmaktadır (155-158). Çalışmamızda bcl-2 immünohistokimyasal boyama yöntemiyle hazırlanan mesane dokuları ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirildi. Mesanenin ürotelyum, stroma ve kas tabakasında bcl-2 pozitif hüceler İ/R grubunda belirgin düzeyde arttığı saptandı. Öncesinde leptin verilip İ/R uygulanan grupta (L+İ/R) ise az sayıda bcl-2 pozitif hücre gözlemlendi. Bu sonuç leptinin anti-apoptotik etkinliğinin bir göstergesi olarak yorumlandı.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar

1. Mesaneye uygulanan 45 dakika iskemi ve 60 dk reperfüzyondan sonra doku MDA düzeyleri iskemi grubunda artmış bulundu. Leptin verilen tedavi grubunda ise (Leptin+İ/R) MDA'daki bu artışın anlamlı derecede azaldığı ($p<0.01$), hatta kontrol grubuyla aynı düzeylerde olduğu saptandı ($p>0.05$).
2. İ/R grubunda doku TNF- α düzeyleri belirgin derecede artarken tedavi verilen Leptin + İ/R grubunda bu artışın engellendiği tespit edildi ($p<0.001$). Kontrol grubu ile Leptin + İ/R grubu arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0,05$).
3. İ/R hasarının bir göstergesi olan hücresel ayrılma, eritrosit ekstravazasyonu konjesyon, ödem, PNL infiltrasyonu gibi histopatolojik değişiklikler mesanenin ürotelyum, lamina propria, stroma kas tabakasında izlendi. Öncesinde leptin verilip İ/R (Leptin+İ/R) uygulanan grupta bu histopatolojik değişikliklerin azaldığı saptandı.
4. TUNEL yöntemi ile boyanan mesane dokularında apoptotik hücre sayıları karşılaştırıldı. İ/R grubunda Kontrol grubuna göre belirgin seviyede artan apoptotik hücre sayıları tedavi verilen (Leptin+İ/R) grubunda belirgin düzeyde azalmıştı ($p<0,001$). Leptin+İ/R grubunda apoptotik hücre sayıları kontrol grubuyla benzerdi ($p>0,05$).
5. Ayrıca mesane tabakaları olan ürotelyum, stroma ve kas, dokularındaki apoptotik hücre sayıları gruplar arasında karşılaştırıldı. İ/R'de her üç tabakada da apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre belirgin artmıştı. Leptin+İ/R grubunda ise her üç tabakada apoptotik hücre sayısı azalmıştı.
6. Dokulardaki apoptoz gösteren hücreleri tanımlamak için kullanılan bir başka immünohistokimyasal boyama yöntemi olan Bcl-2 ile yapılan değerlendirmede, İ/R grubunda artan apoptotik hücrelerin (bcl-2 pozitif hücreler), leptin tedavisi verilen grupta azaldığı gözlemlendi.

Öneriler

İ/R hasarı hücre zedelenmesine neden olan önemli bir süreçtir. Yaş ile ilgili birçok hastalıkta, infravezikal obstrüksiyona sekonder mesane distansiyonu ve sonrasında uygulanan kateterizasyonda ve hatta her miksiyon siklusunda İ/R hasarına bağlı SOR dokuda hücre zedelenmesine neden olabilmektedir. Leptin antiapoptotik, dolaylı da olsa antioksidan ve inflamasyon üzerine olan etkileri sonucu doku hasarını önleyebilecek ya da azaltabilecek gibi görünmektedir. İdrar kontinansı bireyin hayat konforunu ve yaşam standartını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Ortalama yaşam süresinin arttığı günümüzde BPH (benign prostat hiperplazi) gibi infravezikal obstrüksiyonda ve yaşa bağlı gelişen patolojilerde mesane disfonksiyonu daha sık görülmektedir. Bu nedenle leptin proflaktik veya tedavi amacıyla mesane disfonksiyonunda kullanılabilecek umut verici bir ajan olabilir.

KAYNAKLAR

1. McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway endothelial leukocyte interaction in shock, ischemia and reperfusion. *Am J Surg.* 1993;166:557–62.
2. 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.
3. Lin AT, Monson FC, Kato K, Haugaard N, Wein AJ, Levin RM. Effect of chronic ischemia on glucose metabolism of rabbit urinary bladder. *J Urol.* 1989;142(4):1127–33.
4. Levin RM, Leggett R, Whitbeck C, Horan P. Effect of calcium and calcium chelator on the response of the bladder to in vitro ischaemia. *Br J Urol.* 1998;82(6):882–7.
5. 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;166(1):341–6.
6. Saito M, Wada K, Kamisaki Y, Miyagawa I. Effect of ischemia-reperfusion on contractile function of rat urinary bladder: possible role of nitric oxide. *Life Sci.* 1998;62(11):149–56.
7. Saito M, Miyagawa I. Direct detection of nitric oxide in rat urinary bladder during ischemia-reperfusion. *J Urol.* 1999;162(4):1490–5.
8. 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.
9. Lin AT, Chen KK, Yang CH, Chang LS. Mannitol facilitates rabbit urinary bladder recovery from overdistension injury. *Urology.* 2000;56(4):702–7.
10. 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.

11. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986; 250:749–53.
12. Ohnishi N, Liu SP, Horan P, Levin RM. Effect of repetitive stimulation on the contractile response of rabbit urinary bladder subjected to in vitro hypoxia or in vitro ischemia followed by reoxygenation. *Pharmacology.* 1998;57(3):139–47.
13. Wang JH, Chen HS, Wang T, Tian KL, Diao YF. Role of oxygen-derived free radicals in superior mesenteric artery occlusion shock in rats. *Chin Med J (Engl).* 1990;103(4):278–82.
14. Saito M, Miyagawa I. Bladder dysfunction after acute urinary retention in rats. *J Urol.* 2001;165(5):1745–7.
15. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372:425–32.
16. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in *ob/ob* mice. *Science.* 1995;269:540–3.
17. Howard JK, Lord GM, Matarese G, Vendetti S, Ghatei MA, Ritter MA, Lechler RI, Bloom SR. Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in *ob/ob* mice. *J Clin Invest.* 1999;104:1051–1059.
18. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 2000;68:437–446.
19. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic and angiogenic perspectives. *Microcirculation.* 1997;4:211–32.
20. Watson AM, Poloyac SM, Howard G, Blouin RA. Effect of leptin on cytochrome P-450, conjugation, and antioxidant enzymes in the *ob/ob* mouse. *Drug Metab Dispos.* 1999;27(6):695–700.

21. 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.
22. 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.
23. Erkasap S, Erkasap N, Koken T, Kahraman A, Uzuner K, Yazihan N and Ates E. Effect of leptin on renal ischemia-reperfusion damage in rats. *J Physiol Biochem.* 2004;60 (2):79–84.
24. Rauen U, Polzar B, Stephan H, Mannherz HG, de Groot H. Cold-induced apoptosis in cultured hepatocytes and liver endothelial cells: mediation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 1999;13(1):155–68.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery.* 1994;81:637–647.
30. 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.

31. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res.* 2000;86:117–118.
32. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 2000;39:1529–1542.
33. Aker H. Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu. İç: Çevikbaş U. *Temel Patoloji.* İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2000.s.6–12.
34. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America.* 1992;72:65–83.
35. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 1985;312(3):159-63.
36. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190: 255–66.
37. Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischaemia and reperfusion. *J Appl.* 1993;74:1515–1520.
38. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in dogs. *J Clin Invest.* 1974;54:1496–508.
39. 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.
40. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury.* London: Blackwell Science; 1999.p. 3–19.
41. Banda MA, Lefter DJ, Granger DN. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule deficient mice. *Am J Physiol.* 1997;273:2721–5.
42. Jerome SN, Kong L, Korthuis RJ. Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle. *J Invest Surg.* 1994;7:3–16.

43. Bathe OF, Chow AWC, Phang PT. Splanchnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery*. 1998;123(1):79–88.
44. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-Reperfusion injury. *Am J Physiol*. 1988;255:1269–75.
45. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*. 1999;6:167–78.
46. Teke Z, Kabay B, Özden A. İskemi-Reperfüzyon hasarının patofizyolojisi. *Pamukkale Medical Journal*. 2008;1:65–72.
47. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001;94(6):1133–1138.
48. 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.
49. Davies MG, Juynh TTT, Hagen PO. Endothelial physiology. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury*. London: Blackwell Science;1999. p.157–79.
50. Karasawa A, Guo JP, Ma XL, Tsao PS, Lefler 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.
51. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43(2):109–42.
52. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res*. 1994;74:376–82.
53. Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant*. 2004;2(1):174–7.

54. Semenzato G. Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer*. 1990;61(3):354–61.
55. Strieter RM, Kunkel SL, Bone RC. Role of tumor necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Crit Care Med*. 1993;21(10 Suppl):447–63.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochemistry*. 1984;222:1–15.
60. Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect*. 1994;102(Suppl 10):17–24.
61. Kako KJ. Free radical effects on membrane protein in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1987;19(2):209–11.
62. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek*. 2004;57(9–10):453–5.
63. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res*. 2000; 39:1529–1542.
64. 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.
65. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):361–370.

66. Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL, Considine RV. Leptin: The tale of an obesity gene. *Diabetes*. 1996;45:1455–62.
67. Auwerx J, Staels B. Leptin. *Lancet* 1998; 351:737–42.
68. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-Leptin concentrations in normal weight and obese human. *New England Journal Of Medicine*. 1996; 334:292–295.
69. Zhang Y, Proenca R, Maffel M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994; 372:425–31.
70. Samson WK, Murphy TC, Robison D, Vargas T, Tau E, Chang JK. A 35 amino acid fragment of leptin inhibits feeding in the rat. *Endocrinology*. 1996;137(11):5182–5.
71. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *J Biol Chem*. 1996; 271 (8): 3971–3974.
72. Landt M, Martin DR, Zeng J, Miller SB, Kohrt WM, Patterson BW. Plasma leptin concentrations are only transiently increased in nephrectomized rats. *Am J Physiol*. 1998;275(3 Pt 1):495–9.
73. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol*. 2000;62:413–37.
74. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395(6704):763–70.
75. Wallace AM. Measurement of leptin and leptin binding in the human circulation. *Ann Clin Biochem*. 2000;37(3):244–52.
76. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:6093–6.
77. Li H, Matheny M, Nicolson M, Tümer N, Scarpace PJ. Leptin gene expression increases with age independent of increasing adiposity in rats. *Diabetes*. 1997;46:2035–39.

78. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1995;1:1311–4.
79. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature*. 1995;377(6549):527–9.
80. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(20):9034–7.
81. Licinio J, Negrão AB, Mantzoros C, Kaklamani V, Wong ML, Bongiorno PB, Negro PP, Mulla A, Veldhuis JD, Cernal L, Flier JS, Gold PW. Sex differences in circulating human leptin pulse amplitude: clinical implications. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(11):4140–7.
82. Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M. Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes*. 1996;45:984–987.
83. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol*. 1997;47:101–106.
84. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Intern Med*. 1999;130(8):671–80.
85. Spitzweg C, Heufelder AE. More clues from fat mice: leptin acts as an opponent of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Eur J Endocrinol*. 1997;136:590–1.
86. Daniel P, Denis G, Baskin D, Michael WS. Leptin and Insulin Action in the Central Nervous System. *Nutr Rev*. 2002;60:20–9.
87. Qian H, Azain MJ, Compton MM, Hartzell DL, Hausman GJ, Baile CA. Brain administration of leptin causes deletion of adipocytes by apoptosis. *Endocrinology*. 1998;139(2):791–4.

88. Kolaczynski JW, Nyce MR, Considine RV, Boden G, Nolan JJ, Henry R, Mudaliar SR, Olefsky J, Caro JF. Acute and Chronic effect of insulin on leptin production in humans. *Diabetes*. 1996;45:699–701.
89. Segal RK, Landt M, Klein S. Relationship between insulin sensitivity and plazma leptin concentration in lean and obese men. *Diabetes*. 1996;45:988–91.
90. Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. The ob gene and insulin, a relationship leading to clues to the understanding of obesity. *Diabetes*. 1995;44:1467–70.
91. Bennet BD, Solar GP, Yuan JO, Thomas GR. A role for leptin and its cognate receptor in haematopoiesis. *Curr Biol*. 1996;6:1170–80.
92. Graham M. Lord, Giuseppe Matarese, Jane K. Howard, Richard J. Baker, Stephen R. Bloom and Robert I. Lechler. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998;394:897–901.
93. Lee FYJ, Li Y, Yang EK. Phenotypic abnormalities in macrophages from leptin-deficient obese mice. *Am J Physiol*. 1999; 276:386–94.
94. Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol*. 2000 Oct;68(4):437-46.
95. Fujita Y, Murakami M, Ogawa Y, Masuzaki H, Tanaka M, Ozaki S, Nakao K, Mimori T. Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes. *Clin Exp Immunol*. 2002;128:21–6.
96. Matarese G, La Cava A, Sanna V, Lord GM, Lechler RI, Fontana S, Zappacosta S. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol*. 2002;23(4):182–187.
97. Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic and angiogenic perspectives. *Microcirculation*. 1997;4:211–32.
98. M. Rocío Sierra-Honigmann, Anjali K. Nath, Chiaki Murakami, Guillermo García-Cardena, Andreas Papapetropoulos, William C. Sessa, Lisa A. Madge,

- Jeffrey S. Schechner, Michael B. Schwabb, Peter J. Polverini, and Jaime R. Flores-Riveros. Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor. *Science*. 1998;281:1683–1686.
- 99.** Bouloumié A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res*. 1998;83(10):1059–66.
- 100.** Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, García-Cardena G, Papapetropoulos A, Sessa WC, Madge LA, Schechner JS, Schwabb MB, Polverini PJ, Flores-Riveros JR. Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science*. 1998;281(5383):1683–6.
- 101.** Ahima RS, Osei SY. Leptin signaling. *Physiol & Behavior*. 2004;81(2):223–241.
- 102.** Huang L, Li C. Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res*. 2000;10(2):81–92.
- 103.** Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*. 1978;14:141–8.
- 104.** Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1:1155–61.
- 105.** McConway MG, Johnson D, Kelly A, Griffin D, Smith J, Wallace AM. Differences in circulating concentrations of total, free and bound leptin relate to gender and body composition in adult humans. *Ann Clin Biochem*. 2000;37:717–23.
- 106.** Lonngqvist F, Arner P. Over expression of the obese gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat Med*. 1995;1:950–3.
- 107.** Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996;17:305–11.
- 108.** Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*. 1997;21:88–101.

109. 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.
110. 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.
111. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol*. 1997;21:88–101.
112. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. *Am J Pathol*. 1995;146:3–15.
113. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*. 1993;14:133–144.
114. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980;284:555–556.
115. Cohen JJ. Apoptosis. The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*. 1993;15:35–43.
116. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today*. 1993;14:126–130.
117. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis. *Pathology Annual*. 1982;17:229–59.
118. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96(2):245–54.
119. Cooper GM. Programmed cell death. The cell. In: Cooper GM ed. Chapter 14. Washington: ASM Pres;1994.p.592–6.
120. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355–65.
121. 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.

122. 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.
123. Wyllie AH. What is apoptosis? *Histopathology*. 1986;10:995–8.
124. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267:1456–62.
125. Lewin B. Apoptosis. In: Lewin B (ed). *Genes VI*, Chapter 36. New York: Oxford University Press; 1997.p.1122–9.
126. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*. 1995;267:1449–56.
127. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997;88:355–65.
128. 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.
129. 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.
130. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304:433–5.
131. Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther*. 2004;3(11):1051–7.
132. Nakamura K, Bossy-Wetzler 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.
133. 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.

134. Ulukaya E. 11/04/2003. Apoptozis Ders Notları. http://www20.uludag.edu.tr/~biokimya/apoptozis_ders_notu.pdf (08/05/2008)
135. 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.
136. 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.
137. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*. 1997; 22: 299-306.
138. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*. 1995;5:97-104.
139. Newton K, Strasser A. The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 1998;8: 68-75.
140. Hetts SW. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*. 1998;278: 300-307.
141. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-358.
142. Sahna E, Deniz E, Aksulu HE. Myocardial ischemia-reperfusion injury and melatonin. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2006;6(2):163-8.
143. Vanarsdalen KN, Wein AJ, Levin RM. The contractile and metabolic effects of acute ischemia on the rabbit urinary bladder. *J Urol*. 1983;130(1):180-2.
144. Bratslavsky G, Kogan BA, Matsumoto S, Aslan AR, Levin RM. Reperfusion injury of the rat bladder is worse than ischemia. *J Urol*. 2003;170(5):2086-90.
145. Aslan K, Serdar Z, Tokullugil HA. Multifonksiyonel Hormon: Leptin. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2004;30 (2):113-118.

146. Korosec P, Jezernik K. Early cellular and ultrastructural response of the mouse urinary bladder urothelium to ischemia. *Virchows Arch.* 2000;436(4): 377–83.
147. Kono T, Okada S, Saito M. Neutrophil elastase inhibitor, sivelestat sodium hydrate prevents ischemia-reperfusion injury in the rat bladder. *Mol Cell Biochem.* 2008;311(1–2):87–92.
148. Saito M, Suzuki H, Yamada M, Miyagawa I. Preventive effect of long-chain fatty alcohol on ischemia-reperfusion injury in the rat bladder. *Eur J Pharmacol.* 2002;454(1):81–4.
149. Sener G, Sehirli AO, Paskaloğlu K, Dülger GA, Alican I. Melatonin treatment protects against ischemia/reperfusion-induced functional and biochemical changes in rat urinary bladder. *J Pineal Res.* 2003;34(3):226–30.
150. 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.
151. Matsubara, T. Ziff, M. Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol.* 1986;137:3295–3298.
152. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA Jr. Role of tumor necrosis factor- α in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J Clin Invest.* 1990;85(6):1936–43.
153. 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.
154. Yenilmez A, Kilic FS, Sirmagul B, Isikli 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.
155. Nunez G, Clarke MF. The Bcl-2 family of proteins: regulators of cell death and survival. *Trends Cell Biol.* 1994;4:399–403.

- 156.**Başkan EB, Tunalı Ş, Sarıcaoğlu H, Adım ŞB. PUVA tedavisi alan psoriasis hastalarında (Deri Tipi: I-III) Ki-67, bcl-2 ve p53 protein ekspresyonlarının immunohistokimyasal yöntemle değerlendirilmesi. TÜRKDERM. 2003;37: 261–268.
- 157.**Santini D, Tonini G, Vecchio FM, Borzomati D, Vincenzi B, Valeri S, Antinori A, Castri F, Coppola R, Magistrelli P, Nuzzo G, Picciocchi A. Prognostic value of Bax, Bcl-2, p53, and TUNEL staining in patients with radically resected ampullary carcinoma. J Clin Pathol. 2005;58(2):159–65.
- 158.**Celkan MA, Çavdar S, Bağcı C, Sarı İ, Kazaz H, Üstünsoy H. Sıçan iskemi-reperfüzyon modelinde iskemik önkoşullamanın miyokardiyal apoptoza etkisi. Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi. 2007;15(2):108–112.

