

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

**İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULMUŞ
SIÇAN MESANE DOKUSUNDA ROTENON'UN
REAL-TİME PCR İLE TAYİN EDİLEN İNOS VE COX-2
mRNA DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. İdris NERGİZ

**Üroloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

ESKİŞEHİR

2009

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

**İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARI OLUŞTURULMUŞ
SIÇAN MESANE DOKUSUNDA ROTENON'UN
REAL-TİME PCR İLE TAYİN EDİLEN İNOS VE COX-2
mRNA DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. İdris NERGİZ

**Üroloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŐMANI
Prof.Dr.Metin KALE**

**ESKİŞEHİR
2009**

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

Dr. İdris NERGİZ'e ait "İskemi/Reperfüzyon Hasarı Oluşturulmuş Sıçan Mesane Dokusunda Rotenon'un Real Time PCR ile Tayin Edilen iNOS ve COX-2 mRNA Düzeyleri Üzerine Etkileri" isimli tez çalışması Jürimiz tarafından Üroloji Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 04.02.2009

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 Kurulu'nun 12.02.2009 tarih ve 06/13 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Zübeyir KILIÇ
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda almış olduğum 5 yıllık uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile bana destek veren ve tezimin hazırlanmasında benden hiçbir türlü desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Metin KALE'ye teşekkür eder, sonsuz saygılarımı sunarım. Bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren ve eğitimimde büyük emekleri olan sayın hocalarım; Prof. Dr. Turgut DÖNMEZ, Doç. Dr. Cavit CAN, Doç. Dr. Aydın YENİLMEZ'e, yine bizlere çok emeği geçen ve daha çok şey öğrenebileceğimiz, aramızdan erken ayrılan sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Mehmet TURGUT'a ve asistanlığım boyunca birlikte çalıştığım değerli asistan arkadaşlarıma ve eğitimim süresince birlikte emek verdiğimiz tüm hemşire ve sağlık personeline teşekkür ederim. Ayrıca Tez konumun planlanmasında yardım ve desteğini esirgemeyen, tezimin yapılmasında büyük emeği geçen Doç. Dr. Nilüfer ERKASAP'a çok teşekkür ederim.

ÖZET

NERGİZ İ: İskemi/Reperfüzyon (İ/R) Hasarı Oluşturulmuş Sıçan Mesane Dokusunda *Rotenon*'un Real Time PCR ile Tayin Edilen iNOS ve COX-2 mRNA Düzeyleri Üzerine Etkileri. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2009.

Sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan mesane İ/R hasarında *rotenon* tedavisinin İ/R hasarını önleyip önleyemediğini iNOS ve COX-2 mRNA düzeylerini Real-Time PCR ile çalışarak göstermeyi amaçladık. Bu deneysel çalışmada 18 adet *Sprague-Dawley* cinsi albino sıçan kullanıldı. Deney grupları 6'şar adet sıçandan oluşmaktaydı. **Grup I (n=6):** Kontrol Grubu, **Grup II (n=6):** İ/R Grubu, **Grup III (n=6):** *Rotenon*+İ/R Grubu. Kontrol grubundaki sıçanlara herhangi bir işlem uygulanmaksızın alt abdominal kesi ile mesaneleri çıkarıldı. İ/R grubundaki sıçanlara iskemiden 1 saat önce intraperitoneal 1,0 cc serum fizyolojik verildi ve abdominal aorta 1 saat klempe edilerek mesane dokusu iskemiye maruz bırakıldı. İskemi süresini takiben 1 saat reperfüzyona maruz bırakıldı. 1 saatlik reperfüzyon sonucunda mesaneleri çıkarıldı. *Rotenon*+İ/R grubundaki sıçanlara da iskemiye maruz bırakılmadan 1 saat önce *rotenon* 25 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak verildi. Daha sonra 1 saat iskemiye maruz bırakılan mesane dokusu iskemi süresini takiben 1 saat reperfüzyona maruz bırakıldı. Ardından gruplar arasında Real-Time PCR ile COX-2 ve iNOS mRNA düzeylerine bakıldı. Mesaneye uygulanan 1 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyondan sonra doku COX-2 düzeylerinin kontrol grubuna göre yüksek olduğu gözlemlendi ($p<0.05$). *Rotenon* tedavisi verilen grupta İ/R grubuna göre COX-2 değerleri istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.01$). İ/R grubunda iNOS düzeyleri kontrol grubuna göre bir miktar artmasına rağmen, *rotenon* uygulaması ile iNOS düzeylerinin azalmadığı ve gruplar arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi ($p>0.05$). *Rotenon* tedavisinin COX-2 değerlerini anlamlı olarak düşürmesi nedeniyle ileride mesane İ/R hasarında klinik kullanıma girebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Rat, Mesane, İ/R, *Rotenon*, Real-Time PCR

Destekleyen Kurum: T.İ.C.A.M

ABSTRACT

NERGİZ İ : Effects of *Rotenone* on iNOS and COX-2 mRNA Levels Detected by Real Time PCR in the Ischemia/Reperfusion(I/R) Injury in Rat Bladder. Eskişehir Osmangazi University Medicine Faculty Urology Department Tesis of Medicine Speciality , Eskişehir , 2009. We aimed to show that whether *rotenone* treatment prevents I/R damage, developed experimentally, or not in rat bladders by detecting iNOS and COX-2 levels by Real Time PCR. 18 *Sprague-Dawley* albino rat was used in this experiment. Experiment groups consisting of 6 rats. **Group I (n=6):** Control Group, **Group II (n=6):** I/R Group, **Group III (n=6):** *Rotenone* + I/R Group. In the control group rat bladders were removed by lower abdominal incision without any procedure. In the I/R group 1 hour before the ischemia 1 cc physiological serum was given and abdominal aorta clamped for 1 hour to achieve bladder ischemia. After ischemia 1-hour of reperfusion performed. After 1-hour of reperfusion bladders were removed. In the *rotenone*+I/R group rats were treated with *rotenone* 25 mg/kg intraperitoneally 1 hour before the ischemia. After that bladder had 1-hour of ischemia followed by 1-hour of reperfusion. Later iNOS and COX-2 mRNA levels detected by Real-Time PCR between groups. After 1-hour of ischemia and 1-hour of reperfusion bladder tissue COX-2 levels were higher than the control group ($p<0.05$). COX-2 levels in the *rotenone* treated group were statistically lower than the I/R group ($p<0.01$). Although iNOS levels were slightly higher in the I/R group comparing with the control group, iNOS levels didn't decrease and no significant difference was observed between groups via *rotenone* treatment ($p>0.05$). We predict that *rotenone* will be used clinically in the future for I/R damage because of lowering effect in COX-2 levels.

Keywords: Rat , Bladder , I/R , *Rotenone* , Real-Time PCR

Supporting Establishment: T.İ.C.A.M.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
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	15
2.5. İskemi / Reperfüzyon hasarında COX-2 ve iNOS'ın rolü	18
2.6. Mitokondri ve ETS	21
2.7. Rotenon	23
2.8. Real-Time PCR	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar	27
3.2. Deney Protokolü	28
3.3. Dokuların Alınması ve RT-PCR	29
3.4. Değerlendirme	34
4. BULGULAR	35
4.1.COX-2 ve iNOS Geninin Kantitatif Analizi	35
4.2. GAPDH Gen İfadesi Bulguları	39
4.3. COX-2 ve İNOS'ın mRNA düzeyleri arasındaki kat artışı ilişkileri	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

ARDS	Akut respiratuar distres sendromu
ATP	Adenozin trifosfat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
COX	Siklooksijenaz
DNA	Deoksi nükleik asit
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
H₂O₂	Hidrojenperoksit
IL	İnterlökin
İ/R	İskemi/Reperfüzyon
KDa	Kilodalton
LB₄	Lökotrien B ₄
LOO[·]	Lipid peroksit radikalleri
MDA	Malondialdehit
mRNA	Messenger ribonükleik asit
µgr	Mikrogram
ng	Nanogram
NO	Nitrik oksit
O₂⁻	Süperoksit radikali
OH⁻	Hidroksil radikali
PAF	Platelet aktive edici faktör
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PG	Prostoglandin
PGI₂	Prostasiklin
PNL	Polimorf nüveli lökosit
RNA	Ribonükleik asit
SOD	Süperoksit dismutaz
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TNF-α	Tümör nekrozis faktör alfa
TxA₂	Tromboksan A ₂

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2. 1. İskemide erken fazdaki değişiklikler.	6
Şekil 2. 2. İskemik dokularda ksantin oksidaz yolu ile SOR üretimi.	9
Şekil 2. 3. Dismutasyon reaksiyonu.	12
Şekil 2. 4. Fenton reaksiyonu, Haber-Weiss reaksiyonu.	13
Şekil 2. 5. Serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve antioksidan mekanizmalar.	17
Şekil 2. 6. NO sentezi.	19
Şekil 2. 7. Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi).	22
Şekil 4. 1. COX-2 standart curve eğrisi.	35
Şekil 4. 2. COX-2 amplifikasyon grafiği.	36
Şekil 4. 3. COX-2 melt curve grafiği.	37
Şekil 4. 4. iNOS standart curve eğrisi.	37
Şekil 4. 5. iNOS amplifikasyon grafiği.	38
Şekil 4. 6. iNOS melt curve grafiği.	39
Şekil 4. 7. GAPDH standart curve eğrisi.	39
Şekil 4. 8. GAPDH amplifikasyon grafiği.	40
Şekil 4. 9. GAPDH melt curve grafiği.	40
Şekil 4. 10. COX-2 mRNA düzeyleri kat artışı ilişkisi.	42
Şekil 4. 11. iNOS mRNA düzeyleri kat artışı ilişkisi.	43

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.3.1. cDNA sentezi için kullanılan miks içeriği.	31
Tablo 3.3.2. Thermal cycler koşulları.	31
Tablo 3.3.3. Real-Time PCR için miks içeriği.	32
Tablo 3.3.4. COX-2 ve iNOS primerlerinin dizileri, T _m dereceleri.	33
Tablo 4.1. Hedef ve referans gene ait kantitatif değerler kullanılarak ortalama gen konsantrasyonlarının hesaplanması.	41

1. GİRİŞ

Dokuda kanlanmanın kesilmesine iskemi denir. İskemi hücre ölümü ve organ yetmezliği ile birlikte. Reperfüzyon fazında ise kan akımının sağlanmasıyla lezyonlar daha da ağırlaşır (1). İ/R hasarı dokularda yeterli oksijen (O_2) sağlanamamasının tetiklediği bir hücresel 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 (2).

İskemi sonrası reperfüzyon, hasarlı dokuların iyileşmesi için bir ön koşul olmasına rağmen hasarı daha da arttırabilmektedir (3). İskemik dokunun reperfüzyonu ve yeniden oksijenlenmesi hücre zarlarının lipid peroksidasyonuna neden olur ve hücre fonksiyonlarının değişimine sebep olan serbest oksijen radikallerini (SOR) üretir (4,5). Reperfüzyon ile iskemik dokuda oluşan SOR'nin bu hasardan sorumlu olduğu ortaya konulmuştur (6). Mesanenin aşırı distansiyondan sonra kateterizasyonun reperfüzyon hasarını başlattığı ve SOR bu hasardaki ana faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir (7,8). Bu sebeple iskemi sonrası gelişen organ disfonksiyonunu önlemek için SOR'nin azaltılması ile ilk klinik uygulama başlatılmıştır.

Son yapılan çalışmalarda İ/R hasarına bağlı olarak gelişen SOR ve peroksinitritinin düz kas, mukoza ve periferik sinirler gibi mesane bileşenlerini etkileyerek mesane disfonksiyonuna neden oldukları gösterilmiştir (7). Mannitol ve E vitamini gibi serbest radikal temizleyicilerinin mesaneyi, mesane disfonksiyonuna bağlı İ/R hasarından veya parsiyel çıkım tıkanıklığından koruduğu rapor edilmiştir (7,9).

Mesanenin fonksiyonu idrarı depolamak ve uygun bir zamanda boşaltmaktır. Mesanenin homeostazi ve uygun fonksiyonun devamlılığı için arteriyel akım içerisinde yeterli oksijen ve besin desteğine ihtiyaç vardır ve aynı zamanda venöz drenaj ile de atık ürünlerin uzaklaştırılması gerekmektedir (4,10,11). İdrar retansiyonu, aterosklerozis, vazospazm, embolizasyon ve trombozis gibi yaş ile ilişkili bozukluklarda da mesanede İ/R gözlenmiştir (4,9-13). Ayrıca geniş major pelvik organ cerrahisinin alt üriner sistemde sıklıkla disfonksiyona neden olduğu

bilinmektedir (4,11.). Ateroskleroz ya da travmaya bağlı kan akımındaki azalma sonucunda mesane iskemisi gelişir. Bu durum mesanenin kontraksiyonu esnasında kompliyansda bozulmalara ve sonuçta mesane disfonksiyonu gelişmesine sebep olabilir. Mesanede artmış duvar kalınlığının her miksiyonda siklik bir İ/R'na aracılık ettiği gösterilmiştir (14). Akut overdistansiyon ya da retansiyon ile ardından yapılan dekompresyon veya kateterizasyondan sonra görülen mesane disfonksiyonuna İ/R'un neden olduğu bildirilmiştir (7,15). Organ banyosu teknikleri ve histolojik çalışmalarla da İ/R'un mesane fonksiyonunu anlamlı şekilde bozduğu rapor edilmiştir (12,13).

Siklooksijenaz (COX) izoformları (COX-1 ve COX-2) araşıdonik asit metabolizmasının başlangıç ayağını katalize eder. İ/R hasarında pek çok fizyopatolojik olay gelişir ve İ/R hasarında çeşitli organlarda COX-2 değerleri yükselir. Yapılan alışmalarda COX-2 inhibitörlerinin I/R hasarından dokuyu koruyabileceği bildirilmiştir (16).

Nitrik oksit (NO), çeşitli biyolojik fonksiyonlarda rol oynayan, önemli endojen düzenleyici bir moleküldür ve homeostazisin düzenlenmesinde görev alır. Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-argininden sentez edilir. Doku hasarı gibi durumlarda iNOS ile aşırı miktarlarda NO üretilir (1,17). iNOS ve NO'nun çeşitli organ I/R hasarında apoptozisin bir aracısı gibi rol oynadığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda mesanede İ/R sonrası meydana gelen hasarda NO seviyesinin yükseldiği ve NO seviyesini düşürmeye yönelik tedavilerin bu hasarı önlemede başarılı olduğu vurgulanmıştır (18).

Kompleks I enzimi mitokondride elektron transport zincirinde rol oynayan ilk enzimdir ve mitokondride reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasında önemli bir kaynaktır. Mitokondrial elektron transport inhibitörü olan *rotenon*, antioksidatif savunma mekanizmasında rol alır (19).

Çalışmamızda sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan mesane İ/R hasarında *rotenon* tedavisinin İ/R hasarını önleyip nleyemediğini COX-2 ve iNOS mRNA düzeylerini çalışarak göstermeyi amaçladık.

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 üretra ile devam eder. Fundus vesicae aynı zamanda piramit şeklindeki organın arka-alt yüzünü oluşturur. Apex vesicae ile ilişkili olan urakus, mesaneyi ön karın duvarına asar. Boşken pelvis minor içinde yer alan mesane doldukça ön-orta hatta yukarıya doğru uzanır. Tam dolu mesanenin üst sınırı umbilicus'a kadar yükselebilir.

Tunika 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 (detrusor), 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 üretranın başladığı yerdir. Açıklık çevresindeki kas lifleri dairesel bir şekilde seyrederek *m. sphincter vesicae*'yi (sifinkter-büzücü kas) oluştururlar. Bu kas parasempatik etki ile gevşer ve idrarın geçmesini sağlar. Sempatik liflerin mesaneye etkisi parasempatiklerin tersi yöndedir. Mesanenin iç yüzünde her iki üreter orifisi ile tepesi aşağıda mesane boynunda bulunan üçgen *trigonum vesicae* adını alır.

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

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 duygusu ve doluluğu bildiren gerilme duygusu parasempatikler ile) katılarak plexus vesicalis yolu ile medulla spinalis'e ulaştığı kabul edilir. Ağrı duygusu ön, dolgunluk hissi omuriliğin arka kordonunda iletilir. Mesanenin ağrısı karın ön duvarının alt bölümünde, perinede ve erkeklerde ayrıca penis üzerinde hissedilir (yansıyan ağrı) (20).

2.2. Miksiyon Fizyolojisi

Normal miksiyon, duyuşal bilgi mesanenin dolduğunu iletğinde 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 (21,22). Sıkışma hissi ile birlikte (300 ml) detrüörü gevşeten, sfinkteri kasan refleks yollar aktive olur. Normal mesane kapasitesi 400–750 ml arasında değişkenlik gösterebilir. İlk doluluk hissi 100–200 ml, doluluk hissi 300–400 ml, acilen boşaltma gereksinimi ve ağrı olarak tanımlanabilen “urgency” ise 400–500 ml'de hissedilir

(22). Depolama evresinde düşük mesane içi basınçlarda hipogastrik–pudental (sempatik) sinirler, yüksek mesane içi basınçlarda (>15 cmH₂O) pelvik–pudental sinirler aracılığı ile detrüörün refleks inhibisyonu sağlanır (23). Sakral segment arka boynuzuna gelen afferent aktivite ara nöronlar tarafından baskılanabilir. Kapı–kontrol teorisi olarak açıklanan, kalın somatik duyuşal 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 (21). Üretral sfinkter EMG aktivitesi kesilir ve sfinkter basıncı düşer. Sfinkter mekanizmasının sakral işeme merkezine refleks inhibisyonu ortadan kalkar, sempatik aktivite inhibe olur, parasempatik yollar aktive olur ve sonuçta detrüör kasılır. Böylece miksiyon gerçekleşir.

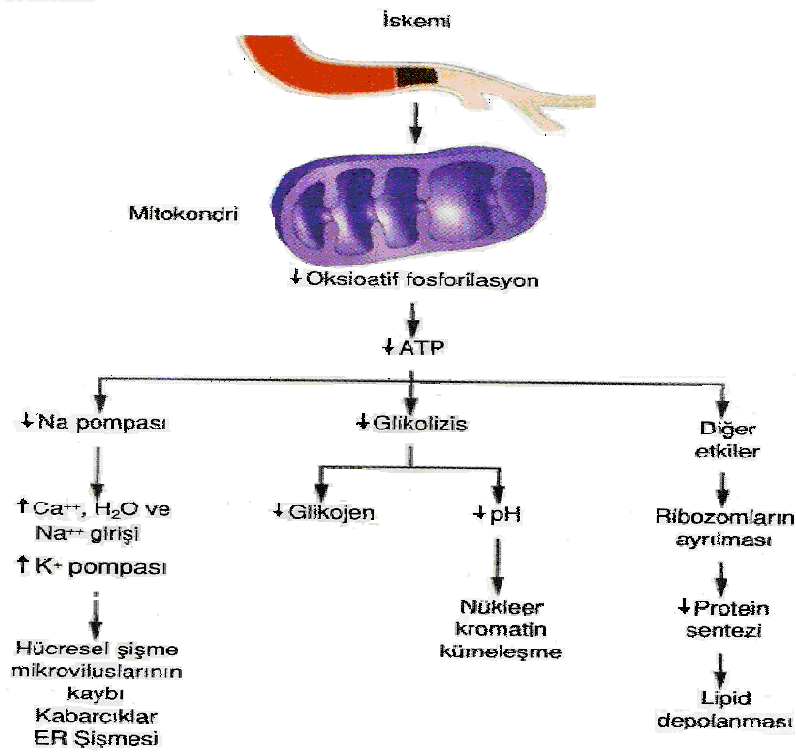
2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı

2.3.1. İskemi

Dokuların normal homeostazı için gerekli olan oksijenin taşınmasındaki yetersizlik iskemi olarak tanımlanır. Hüresel 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 (24–26).

İskemiye direnç farklı dokularda değişkenlik gösterir. İskelet kası saatlerce iskemiye maruz kalsa bile normale dönebilirken, nöronlar ise birkaç dakikada irreversible hasara uğrayabilirler (24). Homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP sentezinin azalması (ya mitokondrial oksidatif fosforilasyon ya da anaerobik glikoliz yolu ile) intrasellüler metabolit birikmesine ve hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar (26,27). Bundan 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 adenozin 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^{++} un 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 (28).



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 (24,29). Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönmesi ile O₂ kaynaklı serbest radikallerin İ/R hasarında önemli rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (30–32).

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 (33). 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 (34).

İskemiye bağlı hasarın geri döndürülebilmesinde doku reperfüzyonu mutlak olmakla birlikte paradoksik olarak, reperfüzyon sonrası sağlanan oksijen ve metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Birçok çalışmada, İ/R hasarının iskemik hasara göre çok daha fazla toksik ürün oluşturduğu gözlenmiştir (35).

İskemik dönemde oluşan oksidatif fosforilasyon hasarı, hem ATP depolarında hızlı tükenme ve hipoksantin artışına, hem de azalmış ATP'ye bağlı hücre içi kalsiyumda hızlı artışa neden olur. Dolayısıyla, hücre içi kalsiyumun artış hızı ve miktarı, hasarı etkileyen en önemli ve erken mekanizma olup, hücre nekroz ve apoptozuyla direkt ilgilidir (36,37). Artmış mitokondriyal kalsiyum, oksijenin suya olan dördüncü seviyeden redüksiyonunu engelleyerek birinci derece redüksiyon ve radikal oluşumuna neden olur (38). Ek olarak, iskemik dokuda ATP'yi daha fazla azaltıp hasarı derinleştirir (39). Kalsiyumun hücre içi birikimi reperfüzyon süresince artarak devam eder. Dolayısıyla doku iskemisi sonucu gelişen hücre içi kalsiyum artışı ve ATP azalması birbirlerini indükleyerek kısır bir döngüye neden olur. Hücre içi kalsiyum birikiminin engellenmesi bu kısır döngüyü kırarak kalsiyuma bağlı oluşan hasarları azaltır (40).

Oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır. Reperfüzyon hasarı SOR, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir (41–44).

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

I- Ksantin Oksidaz

II- Polimorf Nüveli Lökosit (PNL) aktivasyonu

III- Endotelial faktörler

1-Araşidonik asit metabolitleri

a)-Prostasiklin (PGI₂)

b)-Tromboksan A₂ (TxA₂)

c)-Lökotrien B₄

2-Nitrik Oksit

3-Endotelin

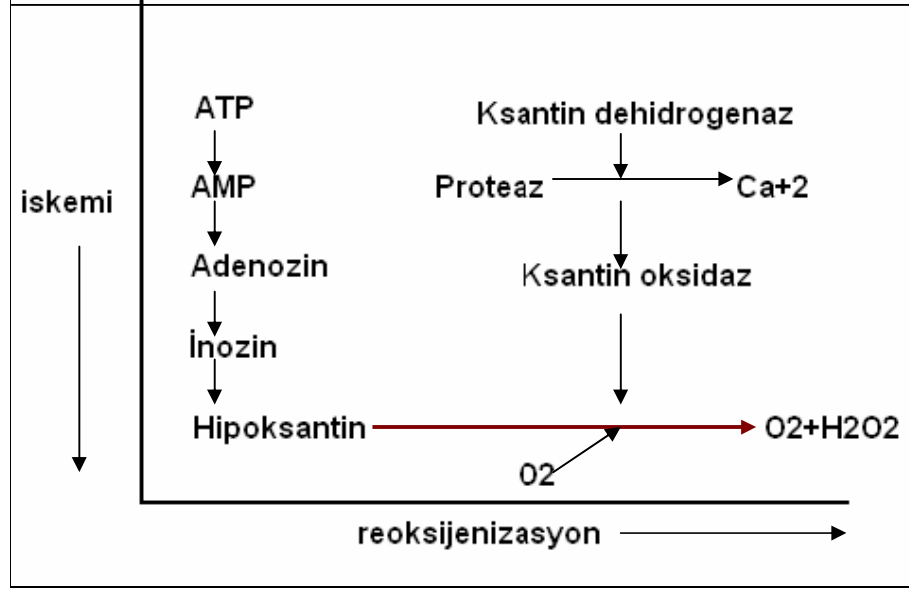
IV- Komplemanlar

V- Sitokinler

VI- Platelet Aktive Edici Faktör (PAF)

I. Ksantin Oksidaz Yolu

Post-iskemik dönemde, iskemik dokudaki serbest radikallerin en belirgin kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Bu enzim “dehidrojenaz” ve “oksidaz” aktivitesine sahip iki şekilde bulunur. Çalışmalarda iskemi sırasında ksantin dehidrojenaz enziminin kalsiyum aracılı bir proteaz katalizörlüğünde ksantin oksidaza dönüşmesi, intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dakika sürmektedir. Bu da değişik dokuların iskemi-reperfüzyon hasarına neden farklı oranlarda cevap verdiği konusunda açıklayıcı olmaktadır. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar (Şekil 2.2) (23,45–47).



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 (41). 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 (48).

III. Endotelyal Faktörler

Vasküler endotelyal çeper pek çok lokal hormon ve otakoid salgılayarak vasküler düz kas tonusunu düzenler (23,49).

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 araşidonik asit oluşumuyla başlar, siklooksijenaz yoluyla prostaglandinlerden oluşur (49,50).

b) Tromboxan A₂ (TxA₂): Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımı ile oluşan TXA₂ trombositleri agrege eder ve vazokonstriktör etkisi vardır. Reperfüzyon, prostaglandin üretiminin en potent uyarandır. TXA₂, İ/R'da endotelyuma nötrofil adhezyonunu indükleyen güçlü bir kemotaktik maddedir (50).

c) Lökotrien B₄ (LB₄): Lökotrienler, İ/R boyunca endotelial disfonksiyonda önemli rol oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan araşidonik asit metabolitleridir. LB₄ nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Adezyon moleküllerinin aktivasyonunu, endotelial hücrelere yapışmayı, SOR'nin ve proteazların üretimini sağlar. 3 saatlik iskemik periyodu mukozal LB₄ seviyelerini değiştirmezken, reperfüzyonun izlediği aynı süreli iskemi mukozal LB₄ seviyelerinde %200 ila 600 oranında artışa yol açmaktadır (29,51).

2. Nitrik Oksit (NO) (2.5.2'de bahsedilecektir)

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 (50).

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 (24,49).

V. Sitokinler

İ/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 (52).

TNF- α ve IL-1 β nötrofilleri aktive ederler ve komşu endotelial hücreleri hasara uğratan değişik inflamatuvar etkenlerin salgılanmasına yol açarlar. Bu sitokinler aynı zamanda hücre yüzey adezyon moleküllerinin ortaya çıkışını arttırmak için endotelial hücreleri de aktive ederler, bu da aktif lökositlerin endotel hücrelerine yapışmasına ve daha fazla hasarın oluşmasına yol açar (53).

TNF- α , endotel hücrelerine nötrofil agregasyon ve adezyonuna, süperoksit anyon oluşumuna, nötrofilik fagositoz ve sitotoksik aktivitesinin artmasına neden olur (54). 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 (55).

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 (24,56). 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 (24,57).

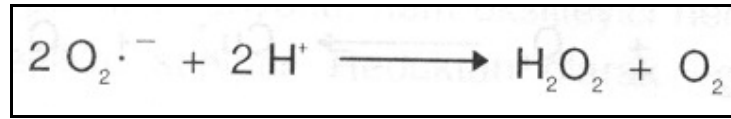
2.3.3. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

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 (58).

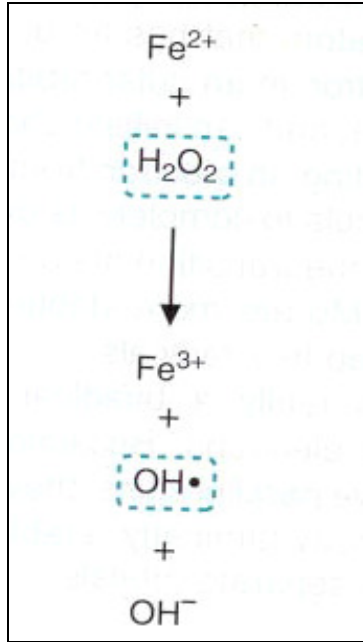
SOR normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-)dir. Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali (O_2^-) oluşur. Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali (H_2O_2) oluşur. Daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikali (OH^-) oluşur. Organizmada bu serbest radikaller dışında, hipoklorik asit gibi radikal olmayan, bununla birlikte serbest radikal oluşturma potansiyelinde olan zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Serbest oksijen radikallerinden en aktif olanı OH^- radikalidir (58).

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

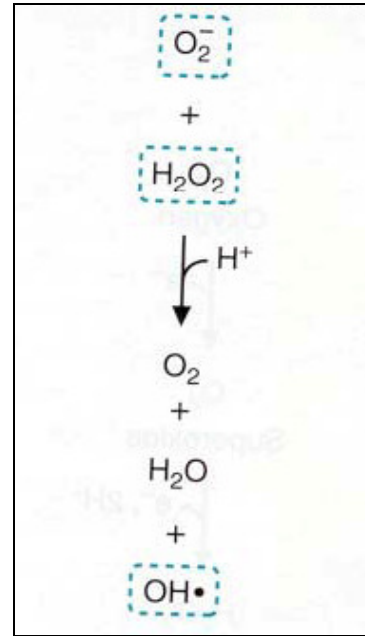


Şekil 2.3. Dismutasyon reaksiyonu.

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^-) oluşturur (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Fenton reaksiyonu



Haber-Weiss reaksiyonu

Süperoksit radikalinin 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 ($\text{OH}\cdot$) 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 (59). 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 (O₂) 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 (60).

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.

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 immüoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin SOR üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali (O₂⁻) veya hidrojen peroksitle (H₂O₂) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (61,62).

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 (H₂O₂) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (63,64).

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) Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
- 3) Glutatyon S-Transferazlar (GST)
- 4) Katalaz (CAT)
- 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi

6) Hidroperoksidaz

Enzim olmayan endojen antioksidanlar

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

2.4.2. 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 anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, diphenylene iodonium)
- 3) Rekombinant süperoksit dismutaz
- 4) Trolox-C (vitamin E analogu)
- 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- 6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- 7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
- 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri

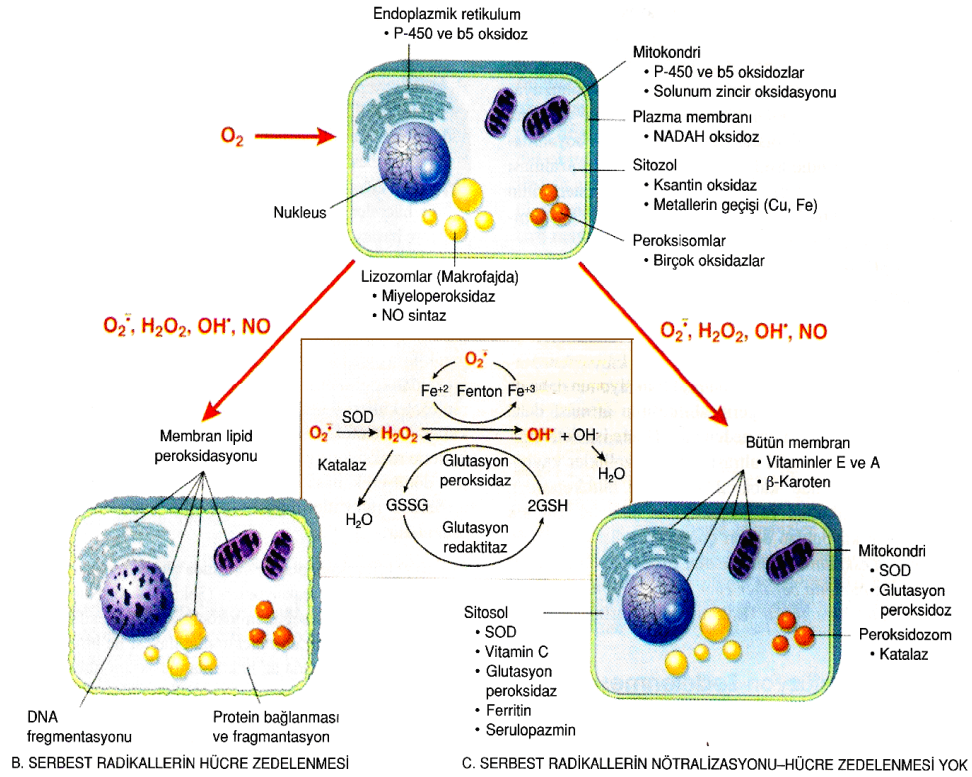
- 9) Sitokinler (TNF ve IL-1)
- 10) Barbitüratlar
- 11) Demir şelatörleri (Şekil 2.5)

İ/R hasarına karşı başlıca korunma mekanizmalarını 3 grupta toplayabiliriz

1- Fizyolojik: Süperoksit dismutaz, katalaz ve 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. İskemi / Reperfüzyon Hasarında COX-2 ve iNOS'ın Rolü

2.5.1. Siklooksijenaz-2 (COX-2)

Siklooksijenaz (COX) enzimleri hücre içerisinde araşidonik asitten eikosanoidlerin oluşumunda görevli enzimlerdir. İyi bilinen iki tip izoformu mevcuttur. COX-1 ve COX-2. Son zamanlarda COX-3 diye isimlendirilen bir üçüncü formu daha bulunmuşsa da henüz işlevi üzerinde çalışmalar devam etmektedir. COX-1 ve COX-2 enzimleri önce kararsız yapıda prostoglandin PGH₂ üretimi yaparlar, daha sonra hücreye özgül olarak kararlı PG'lerin yapımını sağlarlar. COX-1, tromboksan (Tx)A₂ sentezini sağlar. Çoğu vücut hücrelerinde bulunur ve gastrik mukozal korunmada önemli rolü vardır. COX-2 ise her dokuda bulunmaz ve ancak bazı uyarılarla sentezi artar. COX-2 normal olarak beyin, testis ve trakeada bulunur. Hücre dışı uyarılar; büyüme faktörleri, sitokinler, hormonlar, tümör promotörleri, peroksizomal proliferatörler, hipoksi, iyonize radyasyon ve bazı karsinojenler COX-2 sentezini artırır (65,66).

COX-1 ile COX-2 arasındaki en önemli fark COX-1'in esas olarak yapısal olması yani üretildiği hücrelerde sürekli sentezlenmesi nedeniyle daima var olmasıdır. Bu iki enzimin büyük oranda yapısal benzerliği vardır. Vücutta predominant olan form COX-1'dir, fizyolojik uyarılarla aktive olur. COX-2 uyarımı transkripsiyon artışı ve COX-2 mRNA'sının stabilizasyonuna yol açar. COX-1 ve COX-2 enzimleri her ikisi de endoplazmik retikulumda bulunur. 72 ve 74 kDa ağırlığındadırlar. Hücre içindeki birçok sinyal iletimi ve metabolik yollarda önemli yerleri olan COX sisteminin, birçok fizyolojik ve patolojik oluşumda yer almaları şaşırtıcı değildir. Özellikle hemostaz, trombosit agregasyonu, böbrek ve mide fonksiyonlarında, bağışıklık sisteminde, kemik metabolizmasında, üreme ve hormonal sistemde, inflamasyon ve kanserde aktif rol alırlar. Ayrıca COX enzim sistemi, hücre içinde enerji transfer sistemi oksidasyon reaksiyonlarını da aktive eder. NSAİ ilaçların yaygın kullanımından dolayı epidemiyolojik çalışmalar neticesinde birçok hastalık patogeneğinde COX sisteminin rolünün olduğu gösterilmiştir (67,68).

Siklooksijenaz yolunda PGE₂, PGD₂, PGF₂, PGI₂ ve TxA₂ bulunur. Bunların her biri spesifik bir enzim etkisi ile meydana gelir. Bu enzimlerin

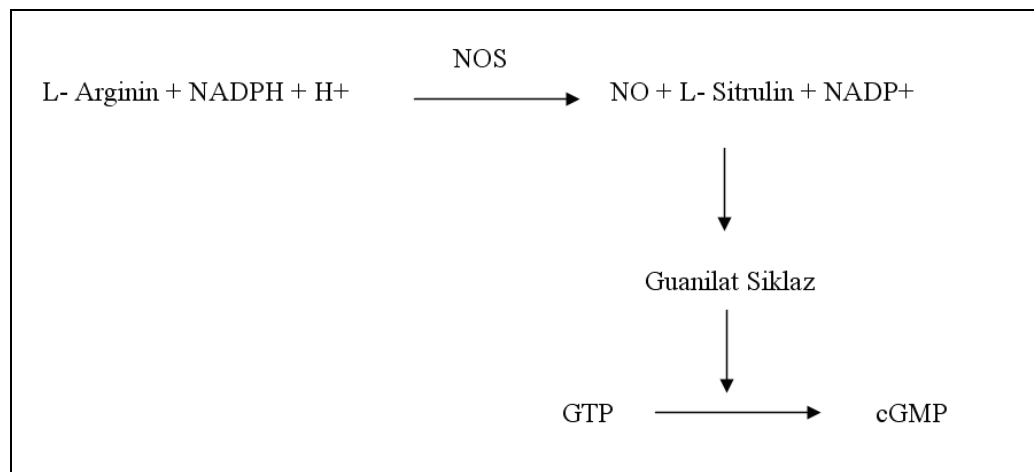
bazılarının dokulardaki dağılımı sınırlıdır. Örneğin, trombositlerde tromboksan sentetaz enzimi vardır. Dolayısıyla güçlü bir trombosit agregan ajan ve vazokonstriktör olan TxA2 ana prostaglandin ürün olarak bu hücrelerde bulunur. Diğer yandan endotel, tromboksan sentetaz içermez ancak PGI2 oluşumunu sağlayan prostasiklin sentetaz içerir. PGI2 güçlü bir trombosit agregasyon inhibitörü ve vazodilatatördür. PGD2, COX yolunun mast hücrelerindeki ana metabolitidir. PGE2 ve PGF2 (daha yaygın) ile birlikte bulunurlar ve PGD2 vazodilatasyona neden olur, ödemi artırır. *Aspirin* ve *ibuprofen* gibi nonsteroid antiinflamatuvar ajanlar, proksimal COX aktivitesini inhibe ederek prostaglandin sentezini tümüyle inhibe ederler. Bu antiinflamatuvar ajanlar lipooksijenaz yolunu etkilemez (69).

İ/R hasarında pek çok fizyopatolojik olay gelişir ve yapılan çalışmalarda İ/R hasarında çeşitli organlarda COX-1/COX-2 oranı değişir. Dupouy ve arkadaşları COX-2 inhibitörlerinin İ/R hasarından dokuyu koruyabileceğini bildirmişlerdir (16).

2.5.2. Nitrik Oksit (NO)

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

NO enzimatik olarak NO sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla L-argininin terminal guanido nitrojen atomunun oksidasyonu ile yapılır (Şekil2.6).



Şekil 2.6. Nitrik oksit sentezi

NOS'un molekül ağırlıkları 125-160 kDa arasında değişen üç izoformu vardır. 1-Konstitüsyonel NOS (cNOS): Az miktarda endotel ve nöronal nitrik oksit yapımından sorumludur. Ca^{++} ve kalmodulin bağımlıdır. Uyarılma sonucu saniyeler veya dakikalar içinde düşük veya orta derecede yapılan NO, daha çok fizyolojik amaçlı olaylarda etkilidir. cNOS denildiğinde, kalsiyum bağımlı eNOS (endotel hücresi) ve nNOS (sinir hücresi) izoformları kastedilir. 2-İndüklenebilir NOS (iNOS): Sitokinler ve enzimlere maruz kaldıktan sonra, özellikle makrofajlarda NO yapımından sorumludur. Ca^{++} ve kalmoduline gereksinim göstermez. Bu enzim daha çok sitotoksik ve immünomodülatör etkilerden sorumlu, uzun sürede fazla miktarda NO yapımı ile ilişkilidir. iNOS aktivasyonu gen transkripsiyonu gerektirdiğinden, NO yapımı birkaç saat sonra görülür ancak birkaç gün devam edebilir. 3-Üçüncü tip NOS: Nötrofillerde bulunur, kalsiyuma bağımlıdır ancak kalmoduline gereksinim göstermez (70).

NO, bazal durumlarda vasküler endotel tarafından salınan bir maddedir. Asetilkolin, ATP ve bradikinin gibi vazodilatatörler, reseptör aracılı Ca^{++} iyonunun hücreye akışını sağlayarak endotelden NO'nun üretimini ve ekstrasellüler salınımını tetikler. NO, vasküler düz kas ve trombositlerde çözünebilir guanilat siklazı stimüle eder ve intrasellüler siklik Guanozin Monofosfat (cGMP) üretimini artırır. Artmış cGMP düzeyi, vasküler düz kasta relaksasyonu başlatır ve plateletlerin endotele agregasyon ve adezyonunu inhibe eder (71).

NO'ye bağlı direk ve indirek etkiler mevcut olup, doku NO yoğunluğuna göre farklılık gösterir. Direk etkiler düşük doku yoğunluklarında, indirek etkiler ise yüksek doku yoğunluklarında gözlenir. NO'ye bağlı indirek etkiler, NO'nun oksijen ve süperoksit ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan reaktif nitrik asit türleri (dinitrite dioksit, peroxydinitrite) aracılığıyla gerçekleşir. NO'nun direkt etkinliği cNOS izoformu tarafından tayin edilirken, indirek etkinlik iNOS izoformuna bağlıdır (72).

NO'nun doku koruyucu özellikleri; vasküler tonus kontrolü, platelet agregasyonunun engellenmesi, lökosit-endotel etkileşiminin azaltılması, dolaşımdan serbest radikallerin temizlenmesi, seçici damarsal geçirgenliğin düzenlenmesi, düz kas hücre proliferasyonunun engellenmesi, bağışıklık sisteminin aktivasyonu ve endotel hücre rejenerasyonunun uyarılmasıdır. Aynı zamanda iskemik dokularda SOD aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır (73).

İ/R hasarına bağlı gelişen endotel hücre disfonksiyonunda NO sentezinde azalma oluşarak İ/R hasarı derinleşir. Endotel disfonksiyonuna bağlı NO azalma mekanizması hala tam olarak gösterilememiştir. Doku reperfüzyonuyla birlikte SOR oluşumunda patlama, NO seviyesinde azalma ve SOD / katalaz enzim aktivitelerinde düşme gerçekleşir. Böylelikle, süperoksit ve NO arasındaki denge süperoksit lehine kayar. Bu denge kaybı NO bağımlı vazodilatasyonda azalma ve nötrofil-endotel adezyonu ile platelet agregasyonunda artışa ikincil “no-reflow” fenomenine eğilim oluşturur. Buna ek olarak NO yokluğunda süperoksit-hidrojen peroksit dönüşümü kolaylaşarak inflamatuvar araçların (PAF ve LTB4) sentezinde artış oluşur. Hem iskemi hem de reperfüzyonu takiben zarar gören endotelyumda NO sentezi belirgin derecede azalır. NO gibi inhibitör etkisi çok kuvvetli bir ajanın eksikliği nötrofil aktivasyonunun kolaylaşmasına ve doku hasarının artmasına yol açabilir. Reperfüzyonun geç fazında üretilen NO ve ONOO'in reperfüzyonun erken fazına oranla çok daha fazla olduğu ve bu durumun uyarılabilir NOS (iNOS) “up regülasyonu” ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. NO düzeyindeki bu gecikmiş artış doku hasarının daha da artmasına neden olur (74).

NO sentezini birçok farmakolojik ajan inhibe eder. Floraprotein, kalmodulin hem bağlayıcıları, substrat analogları ve tetrahidrobiopterini azaltan ajanlar, NO inhibitörlerinin başlıcalarıdır. Kullanım kolaylığı ve bulunabilirlik açısından substrat analogları en sık kullanılan NO sentez inhibitörleridir. L-argininin yapısal analogları olan bu ajanlar, metabolize olduklarında NOS enzimine kovalent olarak bağlanırlar NG-monometil-L- arginin (L-NMMA), N-iminoetil-L-ornitin (L-NIO) ve NG-nitro-L-arginin metil ester (L-NAME) gibi maddeler; L-argininin yapısal analoglarıdır ve selektif olmayan NOS inhibitörleridir, yani hem cNOS hemde iNOS'ı inhibe ederler. L-nitroarginin, cNOS'a spesifik bir inhibitördür. Aminoguanidin ise sadece iNOS'ı inhibe eder (75).

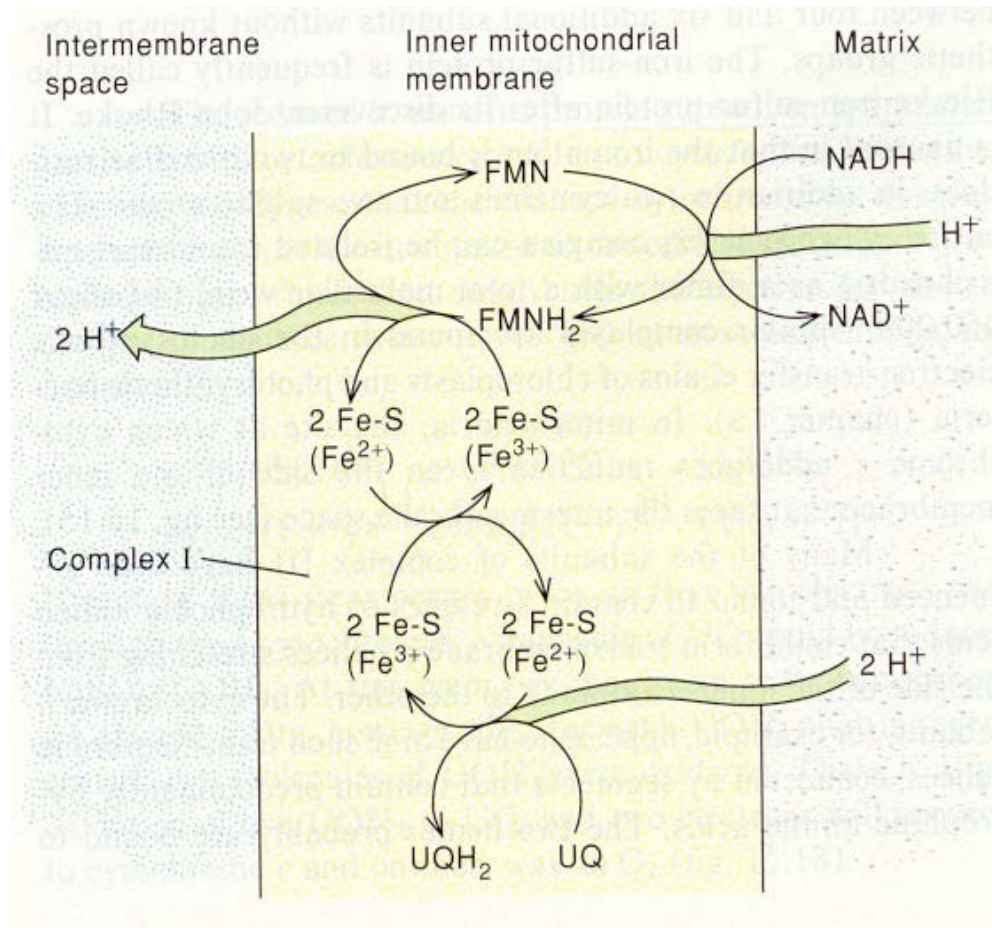
2.6. Mitokondri ve ETS

Mitokondri, oksidatif fosforilasyon yoluyla hücreye ATP sağlar. Çift zar yapısına sahip olup, iç zar elektron taşıma zinciri öğelerini içerir. Uzun süreli iskemi, elektron taşıma komplekslerinin tüm alt ünitelerinde fonksiyonel ve yapısal hasara yol açmakla birlikte, iskemik hasara en hassas olan alt üniteler NADPH

dehidrogenaz ve ubiquinol cytochrome c reductase sistemleridir. Doku reperfüzyonuyla birlikte elektron taşıyıcı komplekslerde hasar artarak hücre içi ve dışına elektron sızıntısı oluşur. Mitokondri aynı zamanda hidrojen peroksit için önemli bir kaynak oluşturur.

2.6.1. Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi)

Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi), iç mitokondriyal membrana gömülmüştür. NADH bağlayan yeri matriks tarafındadır ki burası matrikste oluşan NADH ile etkileşebilir. Kompleks I, elektronların NADH'den ubiquinona (UQ) transferini katalize eder (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Kompleks I (NADH dehidrojenaz kompleksi)

Elektron transport zincirine kompleks I üzerinden giren NADH'deki elektronlar, ubikinona (UQ, koenzim Q) aktarılırlar. Ubikinonun tamamen indirgenmiş formu olan UQH₂, membranda kompleks I'den kompleks III'e diffüze olur. Kompleks III'te de UQH₂ okside form olan UQ formuna oksitlenecektir. Elektronların kompleks I yoluyla kompleks III'e akışı, protonların mitokondriyal matriksten membranlar arası boşluğa hareketiyle eşleşmiştir ki böylece bir proton gradienti oluşur, bu proton gradienti de mitokondriyal ATP sentezi için önemlidir.

Kompleks I, bir barbitürat olan *amytal* (amobarbital), bir insektisit olan *rotenon* ve bir antibiyotik olan *piericidin A* tarafından inhibe edilir.

2.7. Rotenon

Bitkisel kökenli insektisid olarak kullanılan *rotenon* böceklerde hem kontakt hemde mide zehiri olarak etki göstermektedir. Hemen öldürmese bile böceğin ağız kaslarını felç ederek beslenmeyi durdurmaktadır. Ölümün oluşması ise daha yavaş bir seyir göstermekte ve çoğunlukla solunum metabolizmasında elektron taşıma zincirinin engellenmesi şeklinde oluşmaktadır.

Mitokondride elektron transport zincirinde rol oynayan ilk enzim kompleks I enzimidir. Bu enzim mitokondride reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasında önemli bir fonksiyona sahiptir. Kompleks I'de oluşan NAD'dan FMN'ye iki elektron transferi reaksiyonunu katalizler. Kompleks I elektron transfer enerjisi tarafından yönetilen bir proton pompası gibi çalışır. Bu ilk basamağın inhibe olması elektron transport sisteminin fonksiyonlarının aksamasına yol açar. Mitokondriyal elektron transport inhibitörü olan *rotenon*, bir antibiyotik olan *antimisin-A*, barbitüratlardan *amital* ve *siyanid* gibi oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek antioksidatif savunma mekanizmasında rol alır (19).

Rotenon antioksidan olarak çeşitli organ hasarlarında kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda intestinal mukozada (76), hepatositlerde (77) ve kardiyomyosit hücrelerinde (78) oksidatif hasarı azalttığı belirtilmiştir.

2.8. Real-Time PCR

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesi ile kantitatif sonuç verebilen bir PCR yöntemidir.

Bilim ve tıp alanındaki çalışmalarda nükleik asit miktarı belirleme analizleri içerisinde en etkili tekniğin Real-time PCR olduğu ortaya konmuştur. Bu teknik seksenli yılların ortasında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen PCR'ın ileri bir versiyonudur. Klasik PCR ile çok karmaşık bir örnekten herhangi bir nükleik asit dizisini analiz etmek için çok sayıda döngüsel işlemle istenilen miktarda çoğaltmak mümkündür. Ancak bu işlem tek başına matematiksel olarak ürün miktarı hakkında bilgi sağlamamakla birlikte sonrasında da ürün miktarını net olarak belirlemek oldukça güçtür. Çünkü klasik PCR başlangıçta var olan DNA miktarından bağımsız olarak bir ürün miktarı ortaya çıkar. Higuchi ve arkadaşları 1992 yılında Real-Time PCR'ı geliştirmişlerdir. Real-Time PCR tekniği ile DNA dizileri eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve belirlenebilmiş, reaksiyon süresi boyunca oluşan ürünün miktarını Real-Time PCR sırasında gözlemek mümkün olmuştur. Amplifikasyonun her basamağının takip edilebilmesi Real-Time PCR'ı özel kılan en önemli özelliğidir. Amplifikasyon eğrileri üzerinde tüm amplifikasyon profili gözlenebilmektedir. Bu imkan reaksiyon için kullanılan primerler ve hedefe özgü flöresan işaretli probalar ile sağlanır (79,80).

2.8.1. Kantitatif Real-Time PCR Metodları

Mutlak Kantifikasyon (Absolute Quantification): Hedefin konsantrasyonu mutlak değerler olarak ifade edilir. Mutlak kantifikasyon konsantrasyonları önceden bilinen seri olarak dilüe edilmiş eksternal standartların kullanımıyla oluşturulan standart bir eğri yardımıyla yapılır. Konsantrasyonları bilinmeyen örneklerin konsantrasyonlarının belirlenmesi crossing points (Cp) değerlerinin belirlenmesi ile sağlanır. (Cp değeri, PCR içindeki her eğriye ait PCR ürünü miktarını gösterdiği varsayılan bir örneğin PCR amplifikasyonuna başladığı noktayı ifade eder).

Rölatif Kantifikasyon (Relative Quantification): Hedefin konsantrasyonu hedefin belli bir referansa oranı olarak ifade edilir. Bu metod ile hedef ve referans

genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur (81).

2.8.2. Real-Time PCR için Kullanılan Problar

Tüm Real-Time PCR sistemleri reaksiyondaki PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir flöresan boyadan alınan boya miktarı arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışır. Belli bir diziyeye bağlı kalmadan tüm çift iplikli DNA molekülüne bağlanan flöresan boyalar yada belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziyeye bağlanabilen oligonükleotid hibridizasyon problemleri kullanılır.

Dizi spesifik olmayan flöresan boyalar: Bu tip boyalar çift iplikli DNA'nın tamamına bağlanabilme özelliği taşıyan etidyum bromid benzeri boyalardır. Real-Time PCR sistemlerinde kullanılan boya SYBR Green'dir. SYBR Green 1, onun emisyon özelliğini önemli ölçüde arttıran bir solüsyon içerisinde bulunduğu DNA molekülüne bağlanır. PCR boyunca amplifiye olan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak SYBR Green'in sinyali artacaktır.

Dizi spesifik flöresan problemler: Oldukça yüksek hassasiyete sahip floroforlar ile işaretli dizi spesifik problemlerdir. Reaksiyon içerisinde sadece spesifik hedef mevcut ise flöresan artışı gözlenir.

Simple Probe Format: Tek işaretli problemler, mutasyon ve tek nükleotid polimorfizmlerinin taranmasında kullanılan basitçe dizayn edilmiş hibridizasyon problemlerinin özel bir tipidir.

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Flöresan ile işaretli bir molekülün enerjisinin, bir diğer komşu flöresan moleküle aktarılması prensibine dayanır.

Hibridizasyon Probe Format: Bu yöntemde PCR ürününe yan yana hibridize olabilen iki prob kullanılır.

Hydrolysis Probes(TaqMan): Bu yöntemde 5' ve 3' ucuna bağlı iki farklı renkte florokrom bulunan prob kullanılır.

Kantitatif Real-Time PCR teknolojisi, gen düzeyinin ölçümünde rutin olarak kullanılan, uygulaması kolay, kesin sonuçlar veren, hassasiyeti iyi olan bir uygulamadır. Farklı dilüsyon oranlarında hazırlanmış standart eğrilerin kullanımı ile

örnekler ve deneyler arasında karşılaştırma imkanı sağlayan, internal standartlar yardımı ile başlangıç miktarı farklılığından kaynaklanacak problemlere son veren yüksek verimde sonuçlar elde edilen bir yöntemdir (82).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Malzeme ve Solüsyonlar

3.1.1. Cerrahi Malzemeler

Bisturi
Cerrahi makas
Portegu
Hemostatik pens
Penset
Steril iğneli 5/0 ipek cerrahi dikiş malzemesi
Bulldog klemp

3.1.2 Cihazlar:

Real-time PCR Cihazı (Corbett Rotor Gene 6000)
Spektrofotometre (Wealtec Spectro Art 200)
Spektrofotometre Küvetleri (Wealtec Spectro Art 200)
Mikro Pipet takımı (Gilson)
Mikrosantrifüj (Hermle)
Thermal cycler (Corbett Palm Cyclers)
Vorteks (Heidolph)
Tissue-Lyser II (Qiagen VX350 Series 2 WPS 3601C12)
Pipet uçları (10'luk, 100'lük ve 1000'lik)
Deep-freeze (Jouan)
Buzdolabı (Arçelik)
Santrifüj tüpleri (Greiner Bio-One)
Ependorf Tüpü (1,5 ml lik)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler:

Ketalar (Pfizer 50 mg/ml)
Romphun (Bayer %2)
Rotenone (Sigma)
RNA later (Qiagen)

β -mercaptoethanol (Sigma)	
Buffer RLT (Qiagen)	
% 70 lik Etanol (Merck)	
Buffer RW1 (Qiagen)	
Buffer RPE (Qiagen)	
RNase Free Water (Qiagen)	
10X Buffer RT	2 μ g (Qiagen)
dNTP Miks	2 μ g (Qiagen)
Oligo-dT Primer (10 μ M)	2 μ g (Qiagen)
RNase inhibitör (10 ünite/ μ l)	1 μ g (Qiagen)
Omniscript Reverse Transcriptase	1 μ g (Qiagen)
RNase Free Water (Qiagen)	
Distile su	

3.2. Deneysel Protokolü

Bu deneysel çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilimdalı laboratuvarında 26.03.2008 tarihli 44/2208 sayılı etik kurul kararıyla yapılmıştır. Çalışmada TICAM (Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi)'dan temin edilen 5–6 aylık, ağırlıkları 250–300 gr. arasında değişen her iki cinse ait *Sprague-Dawley* türü sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar standart sanayi yemi ve musluk suyu ile beslenmiştir. Çalışmada 3 grup oluşturulmuş ve her bir gruptan 6 adet sıçanda Real-Time PCR çalışmaları için olmak üzere toplam 18 adet sıçan kullanılmıştır.

Grup I. Kontrol Grubu (n=6)

Grup II. İskemi/Reperfüzyon Grubu (n=6)

Grup III. Rotenon +İskemi/Reperfüzyon Grubu (n=6)

Sıçanlara 50 mg/kg *ketamin* ile birlikte 20 mg/kg *romphun* intraperitoneal olarak uygulandı. Sıçanlar uyutulduktan sonra operasyon masasına alınarak abdominal median laparotomi uygulandı.

Grup 1: Kontrol Grubu

Bu gruptaki sıçanlara abdominal median laparotomi uygulandıktan hemen sonra herhangi bir işlem uygulanmaksızın mesaneleri çıkarıldı.

Grup 2: İ/R Grubu

Bu gruptaki sıçanlara iskemiden 1 saat önce intraperitoneal olarak 1,0 cc serum fizyolojik uygulandı ve abdominal aorta non-travmatik mikrovasküler klemp (bulldog klemp) ile 1 saat klempe edilerek mesane dokusu iskemiye maruz bırakıldı. Bu iskemi süresinde laparotomi kesisi 3/0 ipek ile kapatıldı. İskemi süresini takiben laparotomi kesisi tekrar açılıp abdominal aortadaki klemp çıkarılarak 1 saat reperfüzyona maruz bırakılmak üzere laparotomi kesisi tekrar sütüre edilerek kapatıldı. 1 saatlik reperfüzyon sonucunda mesane dokuları çıkarıldı.

Grup 3: Rotenon + İ/R Grubu

Bu gruptaki sıçanlara da abdominal aortaya klemp konularak iskemiye maruz bırakılmadan 1 saat önce *rotenon* 25 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak verildi. Daha sonra abdominal insizyonla laparotomi yapılarak abdominal aorta non-travmatik mikrovasküler klemp ile 1 saat klempe edilerek mesane dokusu iskemiye maruz bırakıldı ve laparotomi kesisi 3/0 ipek ile sütüre edilerek kapatıldı. İskemi süresini takiben laparotomi kesisi tekrar açılıp klemp çıkarılarak 1 saat reperfüzyona maruz bırakılmak üzere laparotomi kesisi tekrar sütüre edilerek kapatıldı. 1 saatlik reperfüzyon sonucunda mesane dokuları çıkarıldı.

Rotenon

Deneyde kullanılan *rotenon* 25 mg/kg olacak şekilde iskemiden 1 saat önce intraperitoneal olarak verildi.

3.3. Dokuların Alınması ve RT-PCR

Deney süresi sona erdiğinde laparotomi kesisi açıldı ve mesane dokuları hızlı bir şekilde çıkarıldı. Ardından sıçanlara servikal dislokasyon uygulandıktan sonra dokular Real-Time PCR ile COX-2 ve iNOS genlerinin mRNA miktar tayini için

RNA later solüsyonu içine alınarak 24 saat oda ısısında ve sonra çalışılacağı güne kadar -80°C 'de muhafaza edildi.

3.3.1. RNA izolasyonu

1. Mesane dokusu eppendorf tüp içerisine alındı ve tüm dokuyu kaplayacak şekilde RNA Later stabilizasyon solüsyonu ilave edildi. Doku içerisine nüfuz etmesini sağlamak amacı ile 24 saat oda ısısında bekletildikten sonra -20°C 'de muhafaza edildi.

2. Dokular RNA later içerisinden çıkartılarak 600 μl Buffer RLT+6 μl β -mercaptoethanol (β -ME) solüsyonu ile birlikte içerisinde 1 adet steril çelik bilye bulunan plastik tüplere konuldu ve Tissue Lyser homojenizasyon cihazı ile 2 dk 30 Hz olacak şekilde homojenize edildi.

3. Homojenizasyon işleminden sonra süpernatant yeni bir ependorf tüp içerisine alındı ve 3 dk 13.000 rpm'de santrifüj edildi.

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

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

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

7. Alttaki toplama tüpü döküldü ve kolon üzerine 500 μl Buffer RPE eklenip 20 sn 8.000 g'de santrifüj edildi.

8. Aynı işlem tekrarlanarak 2 dk 8.000 g'de santrifüj edildi.

9. Alttaki toplama tüpü döküldü ve kuruması için 1 dk max hızda santrifüj edildi.

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

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

3.3.2. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla 995 µl distile su + 5 µl RNA olacak şekilde vorteksenerek karıştırıldı ve spektrofotometride 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı.

3.3.3. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi toplam hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve cDNA sentez işlemi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi (Tablo 3.3.1 ve Tablo 3.3.2):

Tablo-3.3.1. cDNA sentezi için kullanılan miks içeriği.

<i>Miks</i>	<i>Miktar(µl)</i>
10X Buffer RT	2
dNTP Miks	2
Oligo-dT Primer (10 µM)	2
RNase inhibitör (10 ünite/µl)	1
Omniscript Reverse Transcriptase	1
RNase Free Water	*
RNA	*
Toplam	20

Tablo 3.3.2. Thermal cycler koşulları.

Isı	Zaman
65° C	5 dk
37° C	60 dk

3.3.4. Real-Time PCR

Real-Time PCR için toplam 25 µl RT-PCR reaksiyonu aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi (Tablo 3.3.3):

Tablo-3.3.3. Real-Time PCR için miks içeriği.

<i>Miks</i>	<i>Miktar (µl)</i>
Primer Miks (COX-2, iNOS veya GAPDH)	1.25
2 X Miks	12.5
H ₂ O	6.25
cDNA	5
Toplam	25

95° C’de 15 dakika bekletilerek DNA’nın denatürasyonu sağlandı. DNA’nın çift sarmal yapısı birbirinden ayrılarak tek iplikli hale geldi. Sonra hibridizasyon basamağı ile primerler bağlandı ve amplifiye edilecek bölgeyi kesti. Ardından polimerizasyon basamağında ise sentez gerçekleştirildi. Hibridizasyon ve polimerizasyon basamağı 50 döngü devam ettirildi (Burada 95° C’de 15 saniye kalmasının sebebi sentezi yapılan kısma tekrar primer bağlanması için denatüre olmasını sağlamaktır). 50 döngü sonunda örneklerin amplifikasyon kalitelerini anlamak için (kaç ürün amplifiye olduğunu görmek için) 55° C’den 95° C’ye hızlı bir şekilde ısıtılarak melt analizi yapıldı.

95° C’de	15 dk	
95° C’de	15 s	} 50 döngü
60° C’de	60 s	
55° C’de	1 dk	

3.3.5. Primer Dizilerinin Hazırlanması

SYBR Green, özgül gen ekspresyonu kantitasyonunda sıklıkla kullanılan bir tekniktir. PCR tüpünde polimerize olan çift zincirli PCR ürününe katılan ve interkale edici bir floresan boya olan SYBR Green boyasının ürün miktarı ile orantılı floresans vermesi prensibine dayanmaktadır. SYBR Green tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi en önemli noktadır. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA'ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü vermemesi gereklidir. Benzer şekilde RNA izolasyonu sırasında sıklıkla gözlenen genomik DNA kontaminasyonu SYBR Green tekniğinin başarısını etkileyen bir diğer durumdur. cDNA amplifikasyon primerlerinin farklı ekzonlardan seçilmesi, amplicon uzunluklarının kısa tutulması (120-250 baz), primerlerin bağlandığı ekzonların uzak seçilmesi PCR reaksiyonu koşullarının olası bir DNA kontaminasyonunda DNA dizisini çoğaltmaması için optimize edilmesi gereklidir (elongasyon süresinin kısıtlı tutulması). Bu prensipler göz önüne alınarak kullanılan primerler, NCBI Gene veritabanı erişim numaraları ve amplicon uzunlukları Tablo 3.3.4'de verilmiştir.

Tablo-3.3.4. COX-2 ve iNOS primerlerinin dizileri, Tm dereceleri.

Gen	No		Oligonükleotid Dizisi	Tm
COX-2	NM_DQ673912.1	Sense	GTAAAAACCGACGCAATCCC	56,7
		Anti-Sense	ATGGGTATGAAGCTGTGATTTGA	56,9
iNOS	NM_012611	Sense	CACCACCCTCCTTGTTCAAC	56,7
		Anti-Sense	CAATCCACAACCTCGCTCCAA	56,5

3.4. Değerlendirme

3.4.1. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmede SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v10.0 paket programı kullanıldı.

3.4.2. Real-Time PCR Bulguların Değerlendirilmesi

Elde edilen sonuçlar, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirildi. Elde edilen veriler ortalama ve standart hata (ort \pm std) olarak ifade edildi.

İstatistiksel yönden **p < 0.05 değeri anlamlı** olarak kabul edildi ve anlamlılık ifadesi *p<0.05 anlamlı, **p<0.01 ise önemli derecede anlamlı olarak ifade edildi.

4. BULGULAR

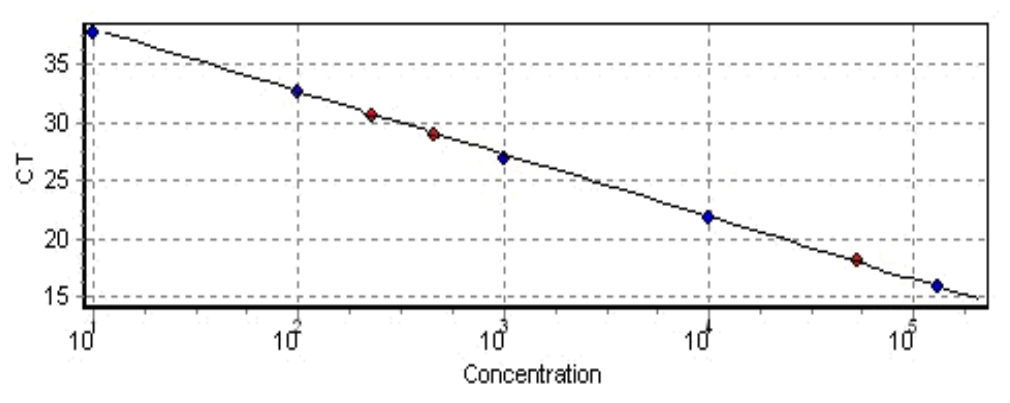
4.1. COX-2 ve iNOS Geninin Kantitatif Analizi:

Kontrol, İ/R uygulanan ve *rotenon* tedavisi uygulanıp İ/R yapılan mesane dokusu örneklerinde, COX-2 ve iNOS gen ifade düzeyleri Real-Time PCR tekniğiyle analiz edilmiş ve referans gen olarak kullanılan GAPDH ile normalize edilmiştir. Floresan boya olarak kullanılan SYBR Green DNA dizisine özgül olmayan bir şekilde bağlandığından dolayı primer seçimi ve deneylerin optimizasyonu çok dikkatli yapılmıştır. Yapılan analizlerde COX-2 ve iNOS gen primerleri ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin beklenen ürün ile uyumlu olduğu, primer-dimer oluşturmadığı ve özgül olmayan amplifikasyon ürünü vermediğini göstermiştir.

Standart eğrilerin çizilebilmesi için her grupta bir adet mesane örneğinden 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 ve 1/100000 oranlarında seri dilüsyonlar hazırlanmıştır.

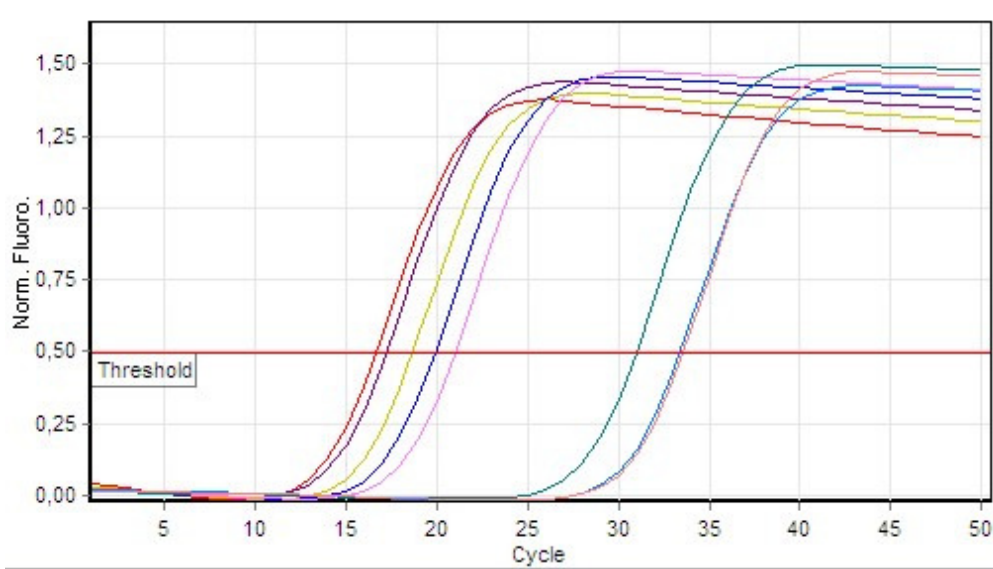
4.1.1. COX-2 Gen İfadesi Bulguları

Real-Time PCR cihazında amplifikasyon miktarını belirleyebilmek için standartlar oluşturmamız gerekmektedir. Bu standartları oluşturabilmek için seçilen örnekler COX-2, iNOS ve GAPDH için 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 oranında dilüe edildi. Bu standartlardan elde edilen konsantrasyonlar ile bir doğru oluşturuldu. Yapılan dilüsyonlar sonucu COX-2 için oluşturduğumuz standartlar Şekil 4.1'de lacivert, örneklerin konsantrasyonları ise kırmızı renkte gösterilmiştir.



Şekil 4.1. COX-2 Standart Curve Eğrisi

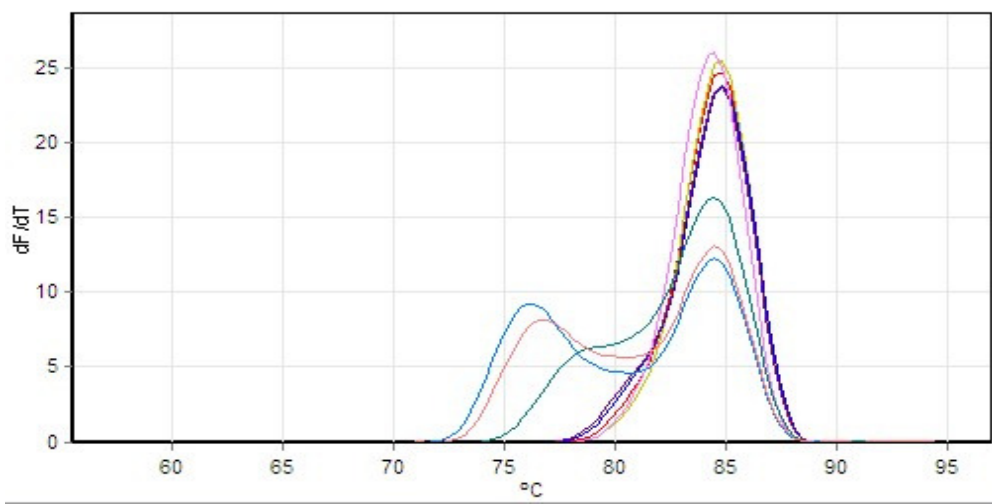
Real-Time PCR'da istediğimiz spesifik gen bölgelerini tanımlayıp amplifiye etmek için primerler kullanırız. Bu primerler bizim istediğimiz gen bölgelerine özel olarak seçilir. Kullandığımız 2X miks ile birlikte primerler istediğimiz gen bölgelerini logaritmik olarak (2^n (n=döngü sayısı)) amplifiye ederler. Amplifikasyon grafiği bize ürünlerimizin kaçınıcı döngüde amplifiye olduğunu ve ne kadar ışımaya olduğunu gösterir. Bizim deneyimizde bulduğumuz COX-2 geni amplifikasyon sonuçları Şekil 4.2'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. COX-2 Amplifikasyon Grafiği

Real-Time PCR cihazında kullanmış olduğumuz SYBR Green boyası özelliği gereği çift sarmal yapıya (DNA) bağlandığında ışımaya vermektedir. SYBR Green boyası melt analizi yapılan çalışmada farklı ürünlerin amplifiye edilip edilmediğinin anlaşılması için kullanılmaktadır. Çift sarmal yapı hidrojen bağlarıyla birbirlerine bağlıdır ve yeterli ısı verildiğinde bu bağlar kopar. Melt analizi ile örneklerde 55°C'den 95°C'ye kadar ısı yükseltilir ve bağlar kopmaya başlar. SYBR Green boyası çift sarmal yapıya bağlı olduğunda ışımaya verdiği için bağlar kopunca ışımaya olmayacaktır. Eğer bizim primer dimerlerimiz olsaydı normal DNA'dan daha az sayıda bağ içereceğinden dolayı normal ürünlerimizden daha düşük bir ısıda bağları kopacaktı ve ışımaya olmayacaktı ve melt analizinde biz bunu erken bir peak olarak

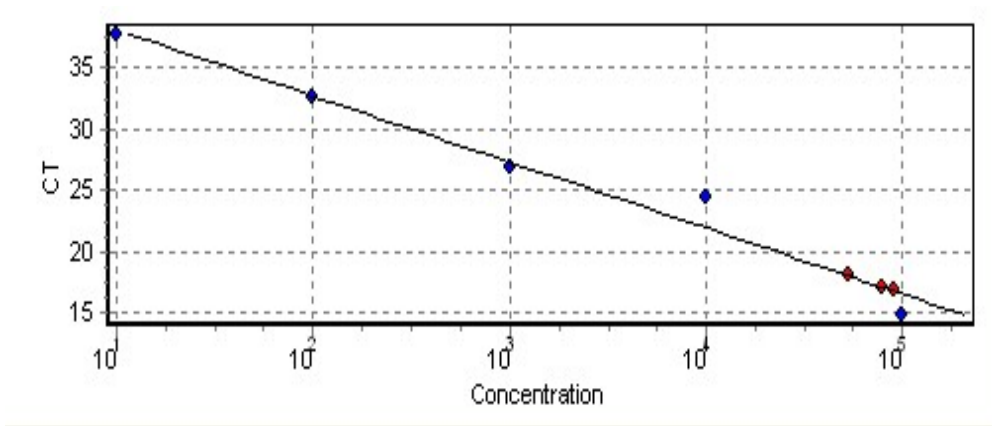
görecektik. Bizim COX-2 geni melt analizi sonuçlarımızda ikinci bir peak görülmemesi bize farklı bir ürünün (istediğimiz bölgelerin dışında) amplifiye olmadığını gösterdi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. COX-2 Melt Curve Grafiği

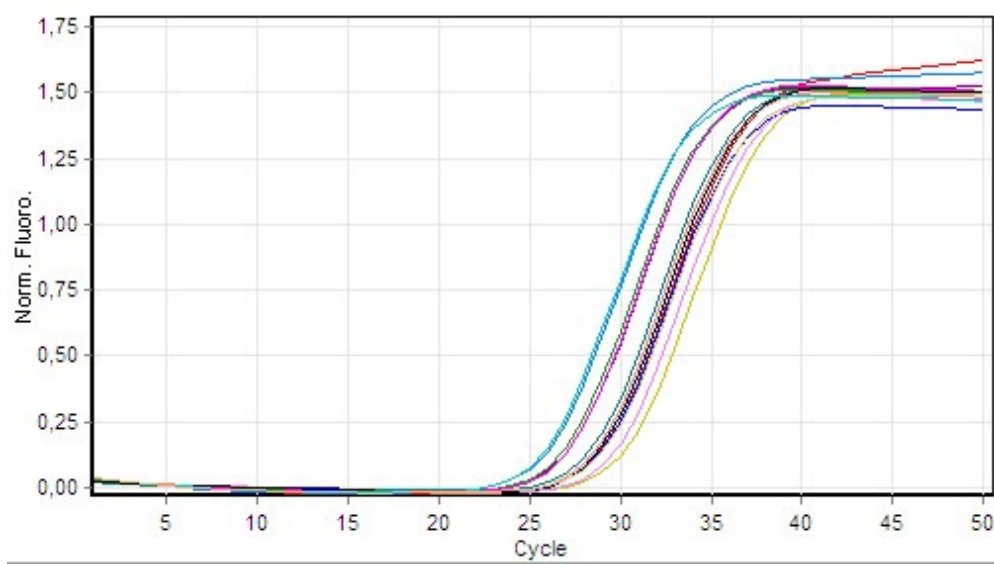
4.1.2. iNOS Gen İfadesi Bulguları

Yapılan dilüsyonlar sonucu iNOS için oluşturduğumuz standartlar Şekil 4.4'de lacivert, örneklerin konsantrasyonları ise kırmızı renkte gösterilmiştir.



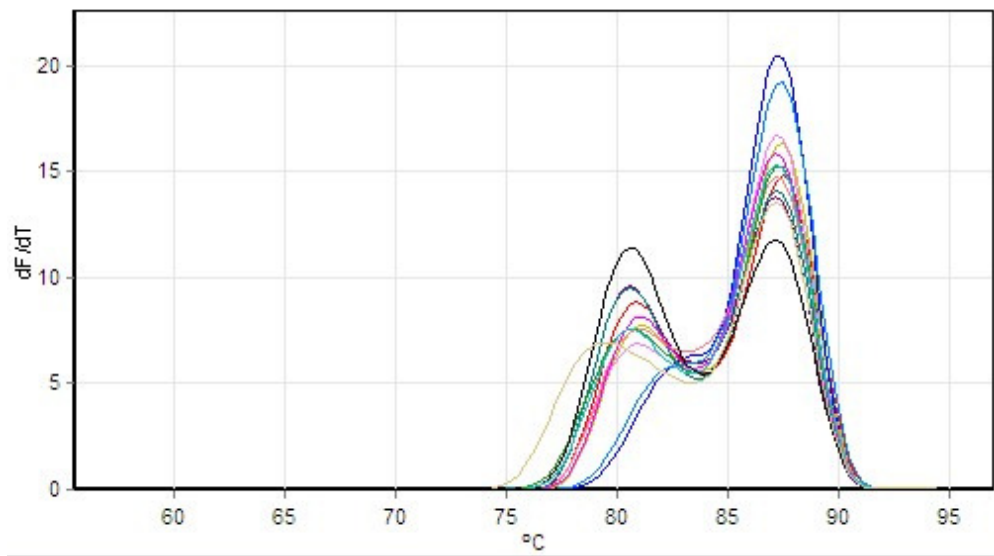
Şekil 4.4. iNOS Standart Curve Eğrisi

Real-Time PCR’da istediğimiz gen bölgelerini tanımlayıp amplifiye etmek için kullandığımız primerler sonucunda amplifikasyon grafiği ürünlerimizin kaçınıcı döngüde amplifiye olduğunu ve ne kadar ışıma gerçekleştiğini gösterdi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. iNOS Amplifikasyon Grafiği

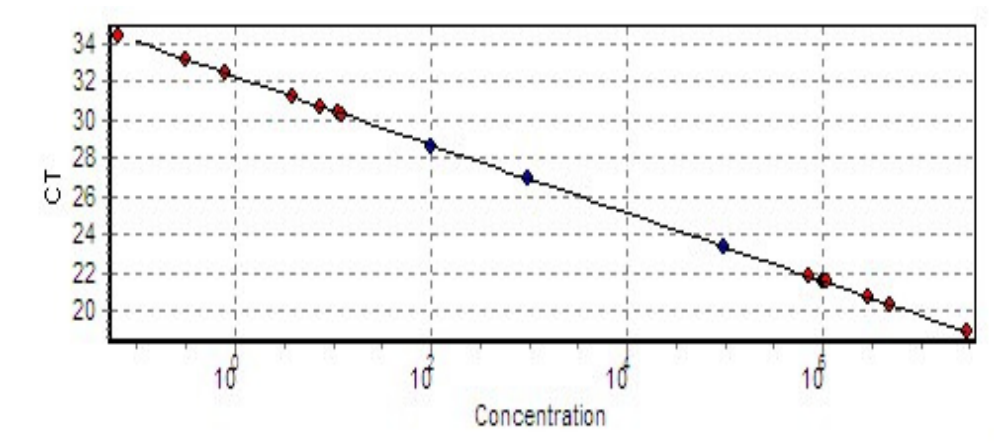
Bizim iNOS geni melt analizi sonuçlarımızda da ikinci bir peak değerinin görülmemesi bize farklı bir ürünün amplifiye olmadığını gösterdi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. iNOS Melt Curve Grafiği

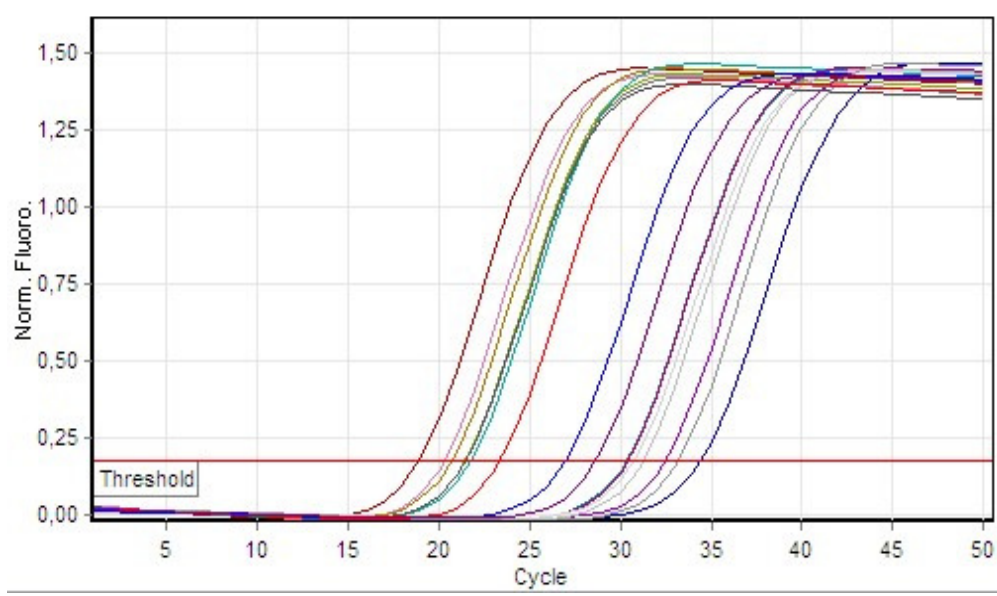
4.2. GAPDH Gen İfadesi Bulguları

Yapılan dilüsyonlar sonucu GAPDH için oluşturduğumuz standartlar Şekil 4.7'de lacivert, örneklerin konsantrasyonları ise kırmızı renkte gösterilmiştir.



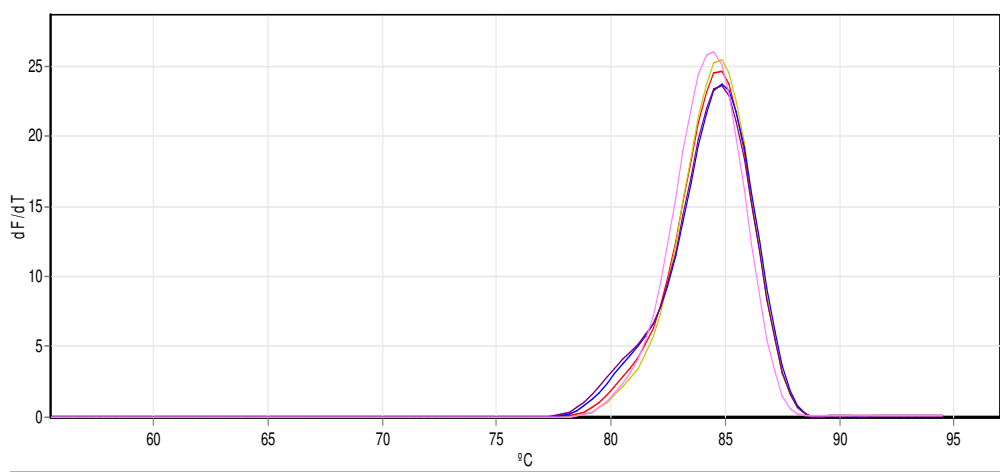
Şekil 4.7. GAPDH Standart Curve Eğrisi

Kullandığımız primerler sonucunda referans genimize (GAPDH) ait amplifikasyon döngüsü ve ışınma miktarı Şekil 4.8'de olduğu gibi gerçekleşmiştir.



Şekil 4.8. GAPDH Amplifikasyon Grafiği

GAPDH geni melt analizi sonuçlarında da COX-2 ve iNOS genleri melt analizi grafilinde olduğu gibi ikinci bir peak değerinin görülmemesi bize farklı bir ürünün amplifiye olmadığını gösterdi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. GAPDH Melt Curve Grafiği

Tablo 4.1. Hedef ve referans gene ait kantitatif değerler kullanılarak ortalama gen konsantrasyonlarının hesaplanması

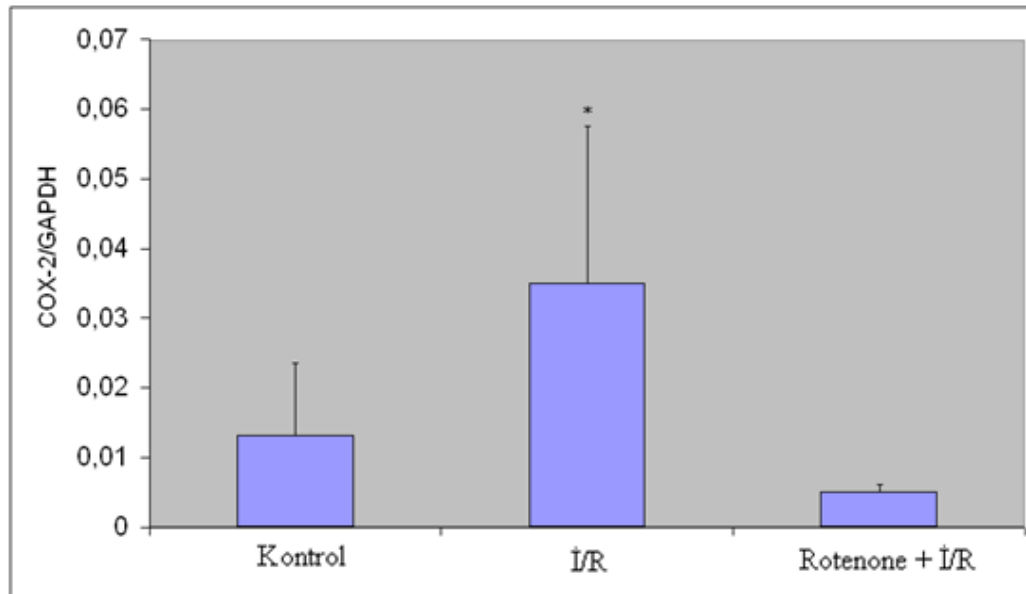
Gruplar	Relatif konsantrasyon COX-2 (Ort. ± Std.)	Relatif konsantrasyon iNOS (Ort. ± Std.)
Kontrol	0.02180830 ± 0.00835834	0.00031670 ± 0.00044008
İ/R	0,03524506 ± 0,08073077	0,00540505 ± 0,00726777
Rotenone + İ/R	0,00508830 ± 0,00106779	0,00629175 ± 0,00700650

Bizim çalışmamızda da hedef gen olan COX-2 ve iNOS sentezinin GAPDH ile oranlanarak hesaplanmasının sebebi COX-2 ve iNOS sentezinin İ/R’da değişiklik göstermesi ve ortalama değer ve standart sapmalarına bakılabilmesi için bunların referans bir genle normalize edilebilmeleri gerekliliğidir. Bu yüzden COX-2 ve iNOS’ın ekspresyonu hücrelerde sabit olan referans bir gene oranlanması gerekmektedir(Housekeeping gen). COX-2 için; kontrol grubu relatif konsantrasyonu 0.0218083 ± 0.00835834 , İ/R grubu relatif konsantrasyonu 0.0352450 ± 0.08073077 , rotenon+İ/R grubu relatif konsantrasyonu 0.0050883 ± 0.00106779 olarak bulundu. iNOS için; kontrol grubu relatif konsantrasyonu 0.0003167 ± 0.00044008 , İ/R grubu relatif konsantrasyonu $0,0054050 \pm 0,00726777$, rotenon+İ/R grubu relatif konsantrasyonu $0,0062917 \pm 0,00700650$ olarak bulundu (Tablo 4.1).

4.3. COX-2 ve iNOS mRNA Düzeyleri Arasındaki Kat Artışı İlişkileri

4.3.1. COX-2 mRNA Düzeyleri Kat Artışı İlişkisi

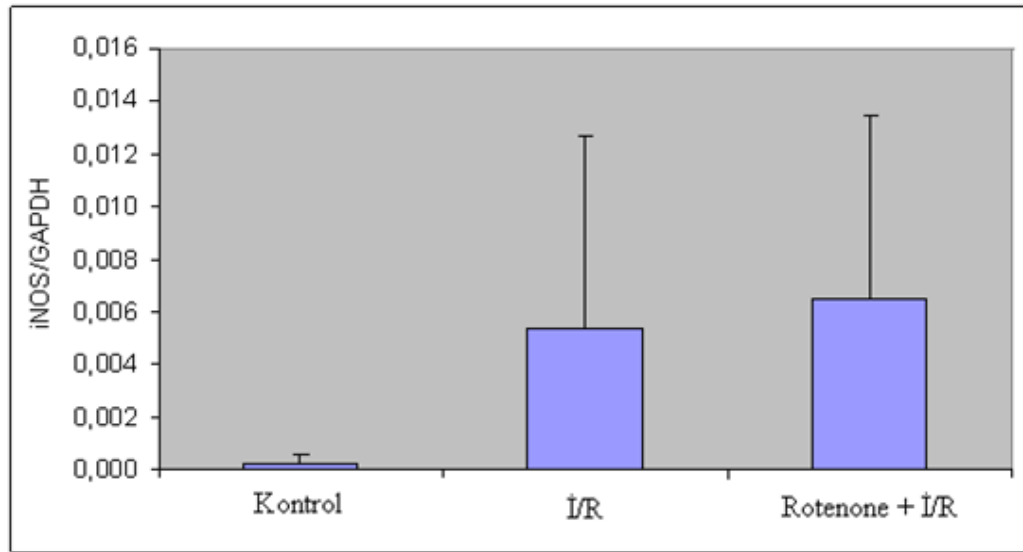
Çalışmamızdan elde ettiğimiz COX-2 sonuçlarının tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi sonucunda $p=0,008$ olduğu için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (** $p<0.01$). Gruplar kendi içerisinde birbirleri ile Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırıldıklarında ise kontrol ve İ/R grubu arasında $p=0,049$, İ/R grubu ile tedavi grubu arasında $p=0,007$, kontrol ve tedavi grupları arasında ise $p=0,606$ bulundu. Bu sonuçlara bakılarak İ/R uygulamasının COX-2 değerlerini anlamlı derecede arttırdığını ($*p<0.05$), İ/R' den önce *rotenon* verilmesiyle COX-2 değerlerinin artmadığını, aksine kontrol grubu düzeylerinin de altına düştüğünü gözlemledik (** $p<0.01$) (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. COX-2 mRNA Düzeyleri Kat Artışı İlişkisi

4.3.2. iNOS mRNA Düzeyleri Kat Artışı İlişkisi

Çalışmamızdan elde ettiğimiz iNOS sonuçlarının tek yönlü varyans analizi ile incelenmesi sonucunda $p=0,194$ olduğu için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Gruplar kendi içerisinde birbirleri ile Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırıldıklarında kontrol ve İ/R grubu arasında $p=0,314$, İ/R grubu ile tedavi grubu arasında $p=0,916$, kontrol ve tedavi grupları arasında ise $p=0,212$ olarak bulundu. Bu sonuçlara bakılarak İ/R uygulamasının iNOS değerlerini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da arttırdığını ($p>0.05$), İ/R'dan önce *rotenon* verilmesiyle iNOS değerlerinin azalmadığını, hatta İ/R düzeylerinin de üzerine çıktığını gözlemledik ($p>0.05$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. iNOS mRNA Düzeyleri Kat Artışı İlişkisi

5. TARTIŞMA

Dokuda kanlanmanın kesilmesine iskemi denir. Hücre ölümü ve organ yetmezliği ile birlikte olan iskemi genellikle dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının dolaşım tarafından sağlanamaması ve oluşan artık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılmaması sonucu oluşur. Sonuçta akut hücresel şişme, intertisyel ödem ve hücresel disfonksiyon meydana gelir. Tekrar dokunun kanlanması sağlanamazsa sonunda hücresel ölüm gerçekleşir. 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 (24,29). İ/R hasarının yaygın bir nekroz aracılığıyla oluştuğu düşünülür. Bu olayın mekanizması henüz tam aydınlatılmamış olmakla beraber arterlerin tıkanması ve reperfüzyonu sonucunda hasar mekanizmasında rol oynayan lokal ve sistemik kaynaklı serbest oksijen radikalleri, NO, transkripsiyon faktörleri, serotonin ve pankreatik proteazlar gibi sitotoksik metabolitler salınır ve nötrofil ile endotel hücreler arasındaki etkileşim artar (1).

İ/R'a bağlı doku hasarını başlatan en önemli faktör SOR'dir. 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 (83).

Oksijen hücre fonksiyonları için kritik bir öneme sahiptir. Oksijen yokluğu, anaerobik metabolizma ve lokal laktik asit konsantrasyonunun artışına neden olur. Meydana gelen asidoz, normal enzim kinetiklerini değiştirerek daha az sayıda yüksek enerjili fosfat bağı oluşumuna neden olur ve sonuçta hücre homeostazını devam ettirebilmek için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (84). Dokular hipoksiye farklı sürelerde dayanıklılık gösterirler. Çizgili kaslar saatler süren iskemiden

etkilenmezken, nöronal hasar iskemi oluşumundan sadece dakikalar sonra meydana gelmektedir (85). Önceki yapılan çalışmalar incelendiğinde iskemi ve reperfüzyon süreleri farklılık göstermektedir. Korosec ve Jezernik farklı iskemi sürelerini uygulayarak rat mesanesinde meydana gelen erken sellüler ve ultrastrüktürel değişiklikleri araştırdıkları bir çalışmada, 30 dk iskemi sonucu ürotelyumda sadece süperfisyonel hücrelerde tek tek ayrılma, 120 dk iskemi sonrası ise dokuda irreversibl değişiklikler meydana geldiğini bildirmişlerdir. 40 dk iskemi ve sonrasında 60 dk reperfüzyon uygulandığında ise ürotelyumda hasarın daha belirgin olduğunu ve bu hasarın da reperfüzyon uygulanan gruplarda daha fazla olduğunu saptamışlardır. Ayrıca 1 saat iskemi uygulanmasının mesanedeki hücrelerin ATP içeriğinde %80 azalmaya neden olduğunu belirtmişlerdir (86).

Mesanenin iskemisi ve sonrasında reperfüzyonu idrar retansiyonu, ateroskleroz, vazospazmlar, emboli ve tromboz gibi yaşla ilişkili bozukluklarda görülebilir. Bu hastalıklar sonrası gelişen İ/R, mesane disfonksiyonuna neden olabilir (10,87). Parsiyel mesane çıkım obstrüksiyonunda mesane duvarındaki kan akımında (iskemi) ve oksijen basıncında (hipoksi) azalma olduğu ve mesanede artmış duvar kalınlığının her miksiyonda siklik bir İ/R'na aracılık ettiği gösterilmiştir (14,88). Bununla beraber akut overdistansiyon veya retansiyondan sonra yapılan dekompresyon ya da kateterizasyondan sonra görülen mesane disfonksiyonunun İ/R'a bağlı olduğu bildirilmiştir (7,8).

Güler ve arkadaşları akut idrar retansiyonunda mesanede oluşan İ/R hasarının reaktif oksijen metabolitleri üzerine olan etkilerini değerlendirmek ve farklı antioksidan ajanlarla bu etkilerin ne kadarının önlenebileceğini görmek için yaptıkları deneysel çalışma sonucunda, retansiyon grubunda dekompresyon sonucu mesanede hasar oluştuğunu ve bu hasarda lökositlerin de rolünün olduğunu göstermişlerdir. Endojen antioksidan ajanlardan hem *allopurinol*'ün hemde *verapamil*'in bu hasarı önlemede etkili olduğunu bildirmişlerdir (89).

Saito ve arkadaşları mesane İ/R hasarında mikrosirkülasyondaki rüptürün sonucu olarak şiddetli eritrosit ekstravazasyonu ve lökosit infiltrasyonu gibi histopatolojik değişikliklerin özellikle düz kas ve submukozal alanda görüldüğünü fakat mukozada görülmediğini, *L-NAME* tedavisiyle de İ/R hasarına bağlı gelişen bu histopatolojik değişikliklerin önlendiğini bildirmişlerdir (15). Tavşan mesanesinin

mukoza ve düz kas tabakasının anoksiye verdiği cevabın karşılaştırıldığı bir başka çalışmada, anoksik/iskemik hasara mukozanın düz kas hücrelerinden daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir (90). Yenilmez ve arkadaşları tarafından mesanenin İ/R hasarına karşı *Ginkgo biloba*'nın koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmada, mukozada oluşan histopatolojik değişiklikleri tanımlamışlardır ve *Ginkgo biloba*'nın İ/R hasarına karşı koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir (91). 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 (92).

Matsumoto ve arkadaşları akut idrar retansiyonu sonrası meydana gelen İ/R sonrası oluşan mesane disfonksiyonunda lipid peroksidasyonunun önemli rol oynadığını göstermişlerdir. Burada oluşan mesane disfonksiyonu ve lipid peroksidasyonunun bir antioksidan olan *edaravone* verilmesiyle önlenebileceğini belirtmişlerdir. *Edaravone* gibi serbest radikal temizleyicilerinin ve diğer nöron koruyucu ilaçların akut ve kronik retansiyonlu hastalarda meydana gelen hasarın onarılmasında etkili olabileceklerini göstermişlerdir (93).

Mesane İ/R hasarında çeşitli antioksidan ajanlar kullanılmasına karşın, *rotenon* kullanılan bir çalışmaya literatürde rastlayamadık. Biz de sıçan mesanesi İ/R hasarında antioksidan olarak *rotenon* kullandık ve *rotenon*'un etkisini değerlendirmek için Real-Time PCR analizi ile COX-2 ve iNOS gen ifadelerine baktık.

Bir antioksidan ajan olarak *rotenon* çeşitli organların İ/R hasarında kullanılmıştır. Ichikawa ve arkadaşları intestinal mukozada İ/R hasarını değerlendirdikleri çalışmalarında *rotenon* tedavisi alan grupta biyokimyasal analizler sonucunda hasarı meydana getiren ürünlerin iskemi grubuna oranla belirgin azaldığını göstermişler ve *rotenon*'un bu olumlu etkisini lipid peroksidasyonunu inhibe ederek ve mukozal inflamasyonu azaltarak gösterdiğini belirtmişlerdir (76). Ilan ve arkadaşları ratlarda hepatositlerdeki oksidatif stresi başlatan ajanlar içinde NO'nin çok önemli rolü olduğunu vurgulamışlardır. Antioksidan tedavi ile hücre içi serbest oksijen radikallerinin anlamlı derecede düşürülebileceğini gösterdikleri çalışmalarında, antioksidan olarak *rotenon* ve *buthiocine* vermişler ve NO sentezinin

azaldığını belirtmişlerdir. Bu etkiyi de serbest oksijen radikallerini arttırarak NOS enzimleri üzerindeki “down regülasyon” sayesinde yaptıklarını bildirmişlerdir (77). Vanden Hoek ve arkadaşları kardiyomyosit hücrelerinde oksidatif stres sonucu meydana gelen hasarı kompleks 1 inhibitörleriyle azaltmaya çalışmışlar ve bu amaçla *rotenon*, *siyanid* ve *antimisin* kullanmışlar, sonuçta *rotenon*’un diğer ajanlara göre daha etkili olduğunu göstermişlerdir (78). Biz de benzer olarak sıçanlarda mesane İ/R hasarının *rotenon* tedavisiyle azaldığını gözlemledik.

İ/R hasarını belirlemek için Real-Time PCR ile COX-2 ve iNOS değişik organlarda çalışılmasına rağmen, mesanede çalışılmadığını tespit ettik. Dupouy ve arkadaşları deneysel tek taraflı alt ekstremite İ/R hasarı modelinde COX-1 ve COX-2 düzeylerini araştırmışlar ve İ/R grubu iskelet kası COX-2 mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını ve COX-2 inhibitörlerinin dokuyu bu hasardan koruyabileceğini belirtmişlerdir (16). Hiratsuka ve arkadaşları ise deneysel mide İ/R hasarı modelinde, İ/R grubu mezenkimal hücre COX-2 düzeyinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığını bildirmişlerdir (94). Yapılan bir diğer çalışmada, karaciğer İ/R hasarı modelinde *Trolox*’un damar düzenleyici gen ifadesine etkisi çalışılmış ve İ/R grubu karaciğer doku örneklerinde COX-2 mRNA ifadesinin RT-PCR yöntemiyle kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır (95). Matsuyama ve arkadaşları böbrek I/R hasarı ile ilgili çalışmalarında COX-2’nin organ ve doku homeostasisinde çok önemli bir rol oynadığını ve böbrek İ/R hasarında COX-2 inhibitörlerinin kullanılmasının faydalı olacağını öne sürmüşlerdir (96). Kotani ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında mide İ/R hasarında yukarıdaki çalışmalara benzer olarak COX-2 mRNA düzeyinin arttığını bildirmişlerdir (97). Bizim çalışmamızda da İ/R ile COX-2 mRNA relatif konsantrasyonuna (GAPDH referans gen ile oranına) bakıldığında COX-2 mRNA düzeyinin arttığını ve *rotenon* tedavisi sonrasında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığını gözlemledik ($p<0.01$).

Real-Time PCR ile iNOS gen ifadesi retina dokusunda çalışılmış ve hipoksik grupta iNOS mRNA düzeyinin artış gösterdiği bildirilmiştir (98). Connors ve arkadaşları parsiyel mesane çıkım tıkanıklığına sekonder gelişen İ/R hasarında NO’in rolü ve *L-NAME* tedavisiyle bu hasarın ne kadarını önleyebileceklerini görmek için tavşanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında İ/R sonrası NO seviyesinin arttığını

görmüşlerdir. *L-NAME* verilen grupta postop 3. ve özellikle de 7. günde NO seviyesinin azaldığını bildirmişlerdir. Böylece *L-NAME* tedavisinin serbest radikallerin salınımını azaltarak mesaneyi NO salınımına bağlı hasardan koruduğunu ileri sürmüşlerdir (18). Chen ve arkadaşları olfaktor epitel dokusunda yaptıkları çalışmada stimülasyon ile iNOS düzeyinin çok kısa bir süre yükseldiğini ancak bunu takiben hızla düşüş gösterdiğini bildirmişlerdir (99). Biz de çalışmamızda Real-Time PCR ile yapılan iNOS gen (hedef gen) ifadesi analizlerinde, kontrol grubunda ölçülemeyecek kadar düşük düzeylerde olan iNOS gen seviyesinin İ/R gibi bir stimülasyonla arttığını gözlemledik. Ancak bunun relatif konsantrasyonuna (GAPDH referans gen ile oranına) bakıldığında ise İ/R grubundaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bulduk ($p>0.05$) ve *rotenon* tedavisiyle İ/R grubuna göre iNOS düzeyinin azalmadığını aksine bir miktar daha arttığını gözlemledik ($p>0.05$). Bizim çalışmamızda da iNOS düzeyi, İ/R sonucunda çok kısa bir süre yükselmiş ve sonra hızla düşmüş olabilir. Böylece İ/R grubunda iNOS düzeyi yükselmekle birlikte çok kısa sürede düştüğü için istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamış olabilir. İ/R hasarında dokuda GAPDH oranının zaten artmış olduğu ve referans gen olarak da GAPDH kullanıldığı için iNOS/GAPDH oranının İ/R grubunda kontrol grubuna göre artmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık koşullarında olmadığı söylenebilir. Tanaka ve arkadaşları beyin İ/R hasarında immünohistokimyasal olarak GAPDH birikimine bakmış ve İ/R ile GAPDH oranının arttığını tespit etmişler yani GAPDH'nın iskemik hasarın gelişiminde kritik bir rol oynadığını belirtmişlerdir (100).

Sonuç olarak sıçan mesane dokusu İ/R hasarında *rotenon* tedavisinin oksidatif stres ile ilişkili COX-2 düzeylerini azaltabileceğini gözlemledik. Ancak *rotenon* tedavisinin çeşitli durumlarda gelişen mesane İ/R hasarında tedavi amaçlı kullanımının olabilmesi için daha çok çalışmaya ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar

Mesaneyeye uygulanan 1 saat iskemi ve 1 saat reperfüzyondan sonra doku COX-2 değerleri kontrol grubuna göre yükseldi. Tedavi grubundaki sıçanlara iskemiden 1 saat önce *rotenon* 25 mg/kg olarak verildi.

İ/R'dan önce *rotenon* verilmesiyle COX-2 değerlerinin İ/R grubuna göre anlamlı derecede azaldığını gözlemledik ($p<0.01$).

İ/R grubunda iNOS düzeyleri kontrol grubuna göre bir miktar artmasına rağmen, *rotenon* uygulamasının iNOS düzeylerini azaltmadığını ve gruplar arasında fark olmadığını gözlemledik ($p>0.05$).

Öneriler

İ/R hasarı hücre zedelenmesine neden olan önemli bir süreçtir. İlerleyen yaşla birlikte, infravezikal obstrüksiyon sonucu ortaya çıkan idrar retansiyonuna sekonder gelişen mesane distansiyonu ve bu durum sonrası uygulanan kateterizasyonda ve normal miksiyon siklusunda İ/R hasarına bağlı ortaya çıkan SOR gibi birçok faktör dokuda hücre zedelenmesine neden olabilmektedir. *Rothenon* da birçok antioksidan ajan gibi özellikle COX-2 düzeyini düşürmeye yönelik etkilerinden dolayı mesane İ/R hasarını ortadan kaldırmak amacıyla klinik kullanıma girebilir.

KAYNAKLAR

1. Vinas JL, Sola A, Genesca M, Alfaro V, Pi F, Hotter G. NO and NOS isoforms in the development of apoptozis in renal ischemia/ reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40(6):992-1003.
2. McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway endothelial leukocyte interaction in shock, ischemia and reperfusion. *Am J Surg.* 1993;166(5):557-62.
3. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986; 250(6):749-53.
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. 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.
6. 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.
7. Lin AT, Chen KK, Yang CH, Chang LS. Mannitol facilitates rabbit urinary bladder recovery from overdistension injury. *Urology.* 2000;56(4):702-7.
8. Saito M, Miyagawa I. Bladder dysfunction after acute urinary retention in rats. *J Urol.* 2001;165(5):1745-7.
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. Saito M, Miyagawa I. Direct detection of nitric oxide in rat urinary bladder during ischemia-reperfusion. *J Urol.* 1999;162(4):1490–5.
14. 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.
15. 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.
16. Dupouy VM, Ferre PJ, Uro-Coste E, Lefebvre HP. Time course of COX-1 and COX-2 expression during ischemia-reperfusion in rat skeletal muscle. *J Appl. Physiol.* 2006;100(1):233-9.
17. Ding HL, Zhu HF, Dong JW, Zhu WZ, Yang WW, Yang HT, Zhou ZN. Inducible nitric oxide synthase contributes to intermittent hypoxia against ischemia/reperfusion injury. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(3):315-22.
18. Conners W, Whitebeck C, Chicester P, Legget L, Lin AD, Johnson A, Kogan B, Levin R, Mannikarottu A. L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor, diminishes oxidative damage in urinary bladder partial outlet obstruction. *Am j Physiol Renal Physiol.* 2006;290(2):357-63.
19. Feldkamp T, Kribben A, Roeser NF, Senter RA, Kemner S, Venkatachalam MA, Nissim I, Weinberg JM. Preservation of complex I function during hypoxia-reoxygenation-induced mitochondrial injury in proximal tubules. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(4):749-59.
20. 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.

21. 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.
22. Linsenmeyer TA. Neurogenic bladder following spinal cord injury. In: Kirshblum S, Ampagnolo DI, DeLisa JA, eds. Spinal cord medicine. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002:181–206.
23. 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.
24. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. British J of Surgery. 1994;81:637–647.
25. 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.
26. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. Circ Res. 2000;86:117–8.
27. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. J Lipid Res. 2000;39:1529–42.
28. Aker H. Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu. Çeviri: Çevikbaş U. Temel Patoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2000.s.6–12.
29. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surg Clin North Am. 1992;72(1):65–83.
30. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. N Engl J Med. 1985;312(3):159-63.
31. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. J Pathol. 2000;190:255–66.
32. Horton JW, Walker PB. Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischaemia and reperfusion. J Appl Physiol. 1993;74(4):1515–20.

33. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The “no-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in dog. *J Clin Invest.* 1974;54(6):1496–508.
34. 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.
35. Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, Brunt E, Turk J. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia–reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1989; 257(2):299–307.
36. Hatanaka N, Kamike W, Shimizu S, Miyata M, Inoue T, Yoshida Y, Tagawa K, Matsuda H. Ca²⁺ release from mitochondria induces cytosolic enzyme leakage in anoxic liver. *J Surg Res.* 1995; 58(5):485–90.
37. Shibasaki F, McKeon F. Calcineurin functions in Ca(2+)-activated cell death in mammalian cells. *J Cell Biol* 1995;131(3):735–43.
38. Parr Dr, Wimshurst JM, Harris EJ. Calcium-induced damage of rat heart mitochondria. *Cardiovasc Res.* 1975;9(3):366-72.
39. Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res.* 1990;66(1):135-46.
40. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ: Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1997;14(3):195-203.
41. Parvums DV. The pathology of ischemia-reperfusion. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury.* London: Blackwell Science. 1999.p. 3–19.
42. Banda MA, Lefer DJ, Granger DN. Postischemic endothelium-dependent vascular reactivity is preserved in adhesion molecule deficient mice. *Am J Physiol.* 1997;273(6 Pt 2):2721–5.
43. Jerome SN, Kong L, Korthuis RJ. Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle. *J Invest Surg.* 1994;7(1):3–16.
44. Bathe OF, Chow AWC, Phang PT. Splachnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery.* 1998;123(1):79–88.

45. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988;255(6 Pt 2):1269–75.
46. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation.* 1999;6(3):167–78.
47. Teke Z, Kabay B, Özden A. İskemi/Reperfüzyon hasarının patofizyolojisi. *Pamukkale Medical Journal.* 2008;1:65–72.
48. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6): 1133–38.
49. 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(6):651–5.
50. Davies MG, Juynh TTT, Hagen PO. Endothelial physiology. In: Grace PA, Mathie RT, eds. *Ischemia-Reperfusion Injury.* London: Blackwell Science;1999. p.157–79.
51. Karasawa A, Guo JP, Ma XL, Tsao PS, Lefer AM. Protective actions of a leukotriene B4 antagonist in splanchnic ischemia and reperfusion in rats. *Am J Physiol.* 1991;261(2 Pt 1):191–8.
52. Toledo-Pereyra LH, Toledo AH, Walsh J, Lopez-Neblina F. Molecular signaling pathways in ischemia/reperfusion. *Exp Clin Transplant.* 2004;2(1):174–7.
53. Semenzato G. Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer.* 1990;61(3):354–61.
54. 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.
55. 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.
56. 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. *J Heart Lung Transp.* 1999;18(9):862–8.

57. 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.
58. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984;222(1):1–15.
59. Farber JL. Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Environ Health Perspect.* 1994;102(Suppl 10):17–24.
60. Kako KJ. Free radical effects on membrane protein in myocardial ischemia reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;19(2):209–11.
61. Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. *Wiad Lek.* 2004;57(9–10):453–5.
62. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 1998;39(8):1529–42.
63. 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 Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(7):647–52.
64. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):361–370.
65. Timothy HL, Bishop-Bailey D, Liu CH, Schaefers HJ, Trifan OC. Cyclooxygenase 1 and 2 enzymes. *Cell Biology International.* 1999;31: 551-7.
66. Singh B, Lucci A. Role of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *J Surg Res.* 2002;108(1):173-9.
67. Singh-Ranger G, Mokbel K. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer and implications of COX-2inhibition. *EJSO* 2002; 28(7):729-37.
68. Arun B, Goss P. The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention. *Semin Oncol.* 2004;31:(2 Suppl 7)22-9.
69. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, eds Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Edition, Philadelphia: Elsevier Saunders, 2004.

70. Yates DH, Kharitonov SA, Robbins RA, Thomas PS, Barnes PJ. Effect of a nitric oxide synthase inhibitor and a glucocorticosteroid on exhaled nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(3):892-6.
71. Bassenge E. Clinical relevance of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Br J Clin Pharmacol.* 1992;34(1):37-42.
72. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998;25(4-5):434-56.
73. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994;78(6):915-8.
74. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* 2002;105(2):248-58.
75. Palmer RJM. Damar duvarında nitrik oksidin keşfi. *Cerrahi Arşivi* 1993; 2: 9-15.
76. Ichikawa H, Tagaki T, Uchiyama K, Higashihara H, Katada K, Isozaki Y, Naito Y, Yoshida N, Yoshikawa T. Rotenone, a mitochondrial electron transport inhibitor, ameliorates ischemia-reperfusion-induced intestinal mucosal damage in rats. *Redox Rep.* 2004;9(6):313-6.
77. Ilan E, Tirosh O, Madar Z. Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *J Nutr.* 2005;135(9):2090-5.
78. Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, Schumacker PT, Becker LB. Mitochondrial electron transport can become a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(9):2441-50.
79. Kubista M, Andrade JM, Bangtsson M, Forootan A. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):95-125.
80. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem.* 2003; 4(11):1120-8.
81. Vert V, Kenneth WK. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine.* 2004;10:789-99.

82. Mocellin S, Rossi CR, Plati P, Nitti D, Marincola FM. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med*. 2003;9(5):189-95.
83. Sahna E, Deniz E, Aksulu HE. Myocardial ischemia-reperfusion injury and melatonin. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2006;6(2):163-8.
84. Rhodens RS, DePalma RG. Mitochondrial dysfunction of the liver and hypoglycemia in hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet*. 1980;150(3):347-52.
85. Chervu A, Moore WS, Homsher E, Quinones-Baldrich WJ. Differential recovery of skeletal muscle and peripheral nerve function after ischemia and reperfusion. *J Surg Res*. 1987;47(1):12-9.
86. Korosec P, Jezernik K. Early cellular and ultrastructural response of the mouse urinary bladder urothelium to ischemia. *Virchows Arch*. 2000;436(4): 377-83.
87. 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.
88. 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.
89. Güler G, Sınık Z, Turan T, Aybek H, Sert S, Tuncay L. Rat mesanesinde akut idrar retansiyonu sonrası gelişen iskemi reperfüzyon hasarının biyokimyasal olarak değerlendirilmesi. *Türk üroloji dergisi*. 2004;30(4):391-7.
90. 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.
91. 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.
92. 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.

93. Matsumoto S, Hanai T, Yoshioka N, Shimizu N, Sugiyama T, Uemura H, Levin RM. Edaravone protects against ischemia/reperfusion-induced functional and biochemical changes in rat urinary bladder. *Urology*. 2005;66(4):892-6.
94. Hiratsuka T, Futagami S, Tatsuguchi A, Suzuki K, Shinji Y, Kusunoki M, Shinoki K, Nishigaki H, Fujimori S, Wada K, Miyake K, Gudis K, Tsukui T, Sakamoto C. COX-1 and COX-2 conversely promote and suppress ischemia-reperfusion gastric injury in mice. *Scand J Gastroenterol*. 2005;40(8):903-13.
95. Eum HA, Lee SM. Effect of Trolox on altered vasoregulatory gene expression in hepatic ischemia/reperfusion. *Arch Pharm Res*. 2004;27(2):225-31.
96. Matsuyama M, Nakatani T, Hase T, Kawahito Y, Sano H, Kawamura M, Yoshimura R. The expression of cyclooxygenases and lipoxygenases in renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2004;36(7):1939-42.
97. Kotani T, Kobata A, Nakamura E, Amagase K, Takeuchi K. Roles of cyclooxygenase-2 and prostacyclin/IP receptors in mucosal defense against ischemia/reperfusion injury in mouse stomach. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316(2):547-55.
98. He T, Xing YQ, Zhao XH, Ai M. Interaction between iNOS and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice. *Arch Med Res*. 2007;38(8):807-15.
99. Chen Z, Ni D, Gao Y, Lin J. Apoptosis related genes--Bcl-2, bax and iNOS, expressed in the olfactory epithelium of mice infected with influenza virus. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*. 2007;21(11):510-2.
100. Tanaka R, Mochizuki H, Suzuki A, Katsube N, Ishitani R, Mizuno Y, Urabe T. Induction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression in rat brain after focal ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(3):280-8.