



T. C.

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AKCİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON SONRASI, *Bmp-2*, *Bcl-X_L*, *Smad-1*, *Caspase-3*,
TGF, *b-FGF* VE *PDGFR* GEN İFADELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hasan ŞİMŞEK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK

Gaziantep
2012

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

AKCİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON SONRASI, *Bmp-2, Bcl-X_L, Smad-1, Caspase-3, TGF, b-FGF* VE *PDGFR* GEN İFADELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hasan ŞİMŞEK

Tez Savunma Tarihi: 24/07/2012

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr. Mehmet Tarakçıoğlu
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr. Cahit BAĞCI
Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası

- 1. Prof.Dr. Cahit BAĞCI**
- 2. Yrd. Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK**
- 3. Yrd. Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU**

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

09.08.2012

Hasan ŞİMŞEK

TEŞEKKÜR

Değerli bilimsel katkılardan ve desteğinden dolayı tez danışmanım değerli hocam **Yrd. Doç Dr. Şeniz Demiryürek**'e, çalışmamın gerçekleştirilmesinde her türlü olanağı sağlayan Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam **Prof. Dr. Cahit BAĞCI**'ya ve Dumlupınar Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam **Prof. Dr. Osman GENÇ**'e, tezimin deneysel aşamasından yazımına kadar geçen süre içerisindeki yardımlarından, faydalı yönlendirmelerinden, vermiş olduğu destekten, sabır ve özveriden dolayı değerli hocam **Yrd. Doç Dr. Beyhan CENGİZ**'e; tüm yardım, destek ve faydalı yönlendirmelerinden dolayı **Yrd. Doç. Dr. Tuncer Demir**'e ve **Yrd. Doç. Dr. Serdar Öztuzcu**'ya teşekkür eder, saygılarımı sunarım. Tez çalışmamın her aşamasında bana destek veren ve güzel bir uyum içinde çalıştığım **Esmâ Özkara, Ahmed Bulut** ve **Zeynep Eşlik**'e teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca vermiş oldukları destekten dolayı değerli **aileme** ve her zaman yanımda olan sevgili **eşime** teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
RESİM LİSTESİ.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Akciğer	
2.1.1. Akciğer Anatomisi	4
2.1.1.1. Akciğerlerin Yüzleri	6
2.1.1.2. Akciğerlerin Kenarları	7
2.1.1.3. Akciğerlerin Lobları ve Segmentleri	8
2.1.1.4. Akciğerin Damarları	9
2.1.1.5. Plevra (Akciğer Zarı).....	9
2.1.1.6. Akciğerlerin Lenfatik Drenajı	10
2.1.1.6.1. Lenf Düğümleri.....	10
2.1.1.6.2. Lenf Damarları.....	10
2.1.2. Akciğer Embriyolojisi	11
2.1.3. Solunum Mekanizması	11
2.1.3.1. Akciğer Hacim Ve Kapasiteleri.....	12
2.1.3.2. Pulmoner Ventilasyon	12
2.1.3.3. Difüzyon	13
2.1.4. Solunumun Düzenlenmesi.....	13
2.1.4.1. Solunumun Sinirsel Düzenlenmesi.....	13
2.1.4.2. Solunumun Kimyasal Düzenlenmesi.....	14
2.1.4.3. Solunum Membranında Gazların Difüzyonu	14
2.2. İskemi.....	15
2.2.1. Geri dönüşlü zedelenme	15

2.2.2. Geri dönüşsüz zedelenme	16
2.3. REPERFÜZYON	17
2.4. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI	19
2.5. AKCİĞERLERDE İSKEMİ-REPERFÜZYON (İ/R) HASARI.....	20
2.6. PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ	23
2.6.1. Mitokondriyal yolak	25
2.6.2. Ölüm reseptörü yolağı	26
2.7. TGF Süperailisi	28
2.7.1. TGF- α	28
2.7.2. TGF- β	29
2.8. Smad.....	30
2.8.1. Smad proteinleri aracılığı ile sinyal iletimi	31
2.9. Bmp	32
2.10. KASPAZLAR	33
2.11. <i>Bcl</i> GEN AİLESİ.....	35
2.12. PDGF	37
2.12.1. PDGF Sentez ve Salınımı.....	37
2.12.2. PDGF İzofomları.....	37
2.12.2.1. PDGF-A.....	37
2.12.2.2. PDGF-B.....	37
2.12.3. PDGF'nin Fizyolojik Fonksiyonları.....	38
2.13. Fibroblast Büyüme Faktörleri (Fibroblast Growth Factors, FGFs).	38
2.13.1. bFGF'nin Moleküler Yapısı ve Gen Yapısı	39
2.13.2. FGFs Reseptörleri.....	39
2.13.3. Biyolojik Aktiviteleri	39
3. MATERYAL – METOD	41
3.1. Deney Hayvanları.....	41
3.2. Kimyasal Maddeler Ve Hazırlanışı	41
3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	42
3.4. Kullanılan Kitler.....	42
3.5. Deneysel Protokol	42
3.6. Yöntem : Akciğer İ/R Modeli	43
3.7. Akciğer Histopatolojik Preparatlarının Hazırlanması	45
3.8. RNA izolasyonu	45

3.8.1. Dokuların homojenizasyon işlemi	45
3.8.2. Homojenize olmuş doku örneklerinin izolasyon işlemleri.....	46
3.9. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması	47
3.10. cDNA Sentezi.....	47
3.11. Primer Dizilerinin Hazırlanması	48
3.12. RT-PCR (Revers-Transkriptaz PCR).....	48
3.13. Gen bölgelerinin çalışma koşulları	49
3.13.1. <i>Smad1</i>	49
3.13.2. <i>Bmp-2</i>	50
3.13.3. <i>Bcl-Xl</i>	51
3.13.4. <i>Caspase-3</i>	52
3.13.5. <i>bFGF</i>	53
3.13.6. <i>PDGFRA</i>	54
3.13.7. <i>TGF</i>	55
3.13.8. <i>β-Actin</i>	56
3.8. İstatistiksel Değerlendirmeler	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. Gen İfadesi Sonuçları.....	58
4.2. Histopatoloji Sonuçları.....	66
5.TARTIŞMA	68
6. KAYNAKLAR	76
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ALP	Alkalen fosfataz
AMP	Adenozin monofosfat
ATP	Adenozin trifosfat
BMP-2	Bone morphogenetic protein-2
CDK	Siklin bağı kınaz
Ca ⁺²	Kalsiyum
cGMP	Siklik Guanozin Monofosfat
CO ₂	Karbondioksit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
eNOS	Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörleri
H ⁺	Hidrojen iyonu
H ₂ O	Su molekülü
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCO ₃ ⁻	Karbonik asit
H&E	Hematoksilen-Eozin
Hz.	Hertz
ICAM	Hücrelerarası adezyon molekülü
IL	İnterlökin
İ/R	İskemi/Reperfüzyon
K ⁺	Potasyum
KDH	Ksantin dehidrojenaz
KO	Ksantin oksidaz
Na ⁺	Sodyum
NAD	Nikotinamid adenindinükleotit
NO	Nitrik oksit
O ₂	Oksijen
PARP	poli (ADP-riboz) polimeraz
PDGF	Platelet-derived growth factor
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
RT-PCR	Revers Transkriptase-Polimerase Chain Reaction

SPA	Sol Pulmoner Arter
TGF- α	Transforming Growth Factor-alfa
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TK	Tirozin Kinaz
Tm	Erime sıcaklığı
TNF α	Tümör nekrozis faktör alfa
TNFR	Tümör nekrozis faktör Reseptörü

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo.2.1. Nekrozis ve programlı hücre ölümünün karşılaştırılması.....	24
Tablo.2.2. Farklı organ sistemleri üzerinde bFGF'nin fonksiyonları.....	40
Tablo 3.1. cDNA sentezi için kullanılan karışımın içeriği.....	47
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizi bilgileri.....	48
Tablo.3.3. <i>Smad1</i> genine ait RT-PCR karışım içeriği.....	49
Tablo.3.4. <i>Smad1</i> genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları.....	49
Tablo 3.5. <i>BMP-2</i> genine ait RT-PCR karışım içeriği.....	50
Tablo 3.6. <i>BMP-2</i> genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları.....	50
Tablo 3.7. <i>Bcl-X_L</i> genine ait RT-PCR karışım içeriği.....	51
Tablo 3.8. <i>Bcl-X_L</i> genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları.....	51
Tablo 3.9. <i>Caspase-3</i> genine ait RT-PCR karışım içeriği.....	52
Tablo 3.10. <i>Caspase-3</i> genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları.....	52
Tablo 3.11. <i>bFGF</i> genine ait RT-PCR karışım içeriği.....	53
Tablo 3.12. <i>bFGF</i> genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları.....	53
Tablo 3.13. <i>PDGFRA</i> genine ait RT-PCR karışım içeriği.....	54
Tablo 3.14. <i>PDGFRA</i> genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları.....	54
Tablo 3.15. <i>TGF</i> genine ait RT-PCR karışım içeriği.....	55
Tablo 3.16. <i>TGF</i> genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları.....	55
Tablo 3.17. <i>β-Actin</i> genine ait RT-PCR karışım içeriği.....	56
Tablo 3.18. <i>β-Actin</i> genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları.....	56
Tablo 4.1. <i>Bmp-2</i> genine ait istatistiksel veriler.....	59
Tablo 4.2. <i>Bcl- X_L</i> genine ait istatistiksel veriler.....	60
Tablo 4.3. <i>Caspase-3</i> genine ait istatistiksel veriler.....	61
Tablo 4.4. <i>bFGF</i> genine ait istatistiksel veriler.....	62
Tablo 4.5. <i>TGF</i> genine ait istatistiksel veriler.....	63
Tablo 4.6. <i>PDGFR</i> genine ait istatistiksel veriler.....	64

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil.2.1. Akciğer ve Yapısı.....	4
Şekil.2.2. Akciğerlerin projeksiyonu	5
Şekil.2.3. Akciğerlerin projeksiyonu.	5
Şekil.2.4. Akciğerlerin yüzleri, kenarları, fissura ve lobları (önden görünüş)	7
Şekil.2.5. Akciğerler	7
Şekil.2.6. Akciğer segmentleri.....	8
Şekil.2.7. Geri dönüşlü ve geri dönüşsüz zedelenme sırasında oluşan olaylar.....	17
Şekil.2.8. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	18
Şekil.2.9. İskemi/Reperfüzyon hasarında yer alan olaylar dizisi.....	19
Şekil.2.10. Pulmoner vasküler yatakta iskemi-reperfüzyon sırasında lökosit aktivasyonu ve sitokin salınımı arasındaki etkileşimin olası mekanizması	21
Şekil.2.11. Farklı canlı ve yapılardaki apoptozis kaynaklı değişimler	23
Şekil.2.12. İnternal apoptozis mekanizması	26
Şekil.2.13. Ölüm reseptörü yolağı	28
Şekil.2.14. TGF- β Süper ailesinin sınıflandırılması	30
Şekil.2.15. Smad proteinlerinin sınıflandırılması	31
Şekil.2.16. R- ve Co-Smad 'ların aktivasyonu.	32
Şekil.2.17. Kaspazlar	34
Şekil.2.18. Kaspaz kaskadı	34
Şekil.2.19. <i>BCL</i> gen ailesi.....	36
Şekil.2.20. Heparin tarafından arttırılmış reseptör dimerizasyonu ve aktivasyonu ...	39
Şekil 3.1. Deneysel protokol.....	44
Şekil 4.1. <i>Bmp-2</i> geninin çalışma gruplarına göre histogramları	59
Şekil 4.2. <i>Bcl- X_L</i> geninin çalışma gruplarına göre histogramları.....	60
Şekil 4.3. <i>Caspase-3</i> geninin çalışma gruplarına göre histogramları	61
Şekil 4.4. <i>bFGF</i> geninin çalışma gruplarına göre histogramları	62
Şekil 4.5. <i>TGF</i> geninin çalışma gruplarına göre histogramları.....	63
Şekil 4.6. <i>PDGFR</i> geninin çalışma gruplarına göre histogramları	64
Şekil 4.7. Gen ifadesi düzeylerine bakılan genlerin çalışma gruplarına göre histogramları	65

RESİM LİSTESİ

Resim 3.1.	İskemi modeli.....	44
Resim.3.2.	<i>Smad1</i> genine ait Gradient PCR sonuçları.....	49
Resim 3.3.	<i>Bmp-2</i> genine ait Gradient PCR sonuçları.....	50
Resim 3.4.	<i>Bcl-X_L</i> genine ait Gradient PCR sonuçları.....	51
Resim 3.5.	<i>Caspase-3</i> genine ait Gradient PCR sonuçları.....	52
Resim 3.6.	<i>bFGF</i> genine ait Gradient PCR sonuçları.....	53
Resim 3.7.	β - <i>Actin</i> genine ait Gradient PCR sonuçları.....	56
Resim 4.1.	Kontrol grubu akciğer görüntüsü.....	66
Resim 4.2.	60 dk iskemi+0 dk reperfüzyon grubu görüntüsü.....	66
Resim 4.3.	60 dk. iskemi+120 dk. reperfüzyon grubu görüntüsü.....	67
Resim 4.4.	60 dk. iskemi+240 dk. reperfüzyon grubu görüntüsü.....	67

ÖZET

AKCİĞER İSKEMİ-REPERFÜZYON SONRASI, *Bmp-2*, *Bcl-X_L*, *Smad1*, *Caspase-3*, *TGF*, *b-FGF* VE *PDGFR* GEN İFADELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Hasan ŞİMŞEK
Gaziantep Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Fizyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK
2012, 86 sayfa

İskemi, arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı olarak, organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanmaktadır. İskemik dokunun reperfüzyonu, dokuda paradoksal olarak iskemi ile oluşan hasara göre, çok daha ciddi bir hasara yol açar. İskemi ve sonrasında hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için gereken yeniden kan akımı sonucu oluşan hücre ölümünde birçok mekanizma rol oynamaktadır. İskemi/Reperfüzyon ile indüklenen akciğer hasarı akciğer transplantasyonunda sık karşılaşılan bir durumdur. Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır. Embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun yaşamının sürdürülmesinde anahtar rol oynar.

Çalışmamızda, akciğerde oluşturulan iskemi/reperfüzyon (İ/R) modeli sonrası, akciğer dokularındaki moleküler değişiklikler için *Smad1*, *Bmp-2*, *Bcl-X_L*, *b-FGF*, *Caspase-3*, *TGF*, *PDGFR* genlerinin gen seviyelerine bakıldı. Bunun için, toplam 40 Wistar albino sıçan eşit olarak 4 gruba ayrıldı. Grup I= Kontrol grubu, Grup II = 60 dakika iskemi + 0 saat reperfüzyon, Grup III= 60 dakika iskemi + 2 saat reperfüzyon, Grup IV= 60 dakika iskemi + 4 saat reperfüzyon grupları olarak belirlendi. RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR (Revers Transkriptaz-PCR) yapıldı. Ayrıca akciğer dokuları histopatolojik olarak incelendi.

Yapılan gen seviyesi sonuçlarına göre gruplarda *Caspase-3* ($p<0,0001$), *Bcl-X_L* ($p=0,0011$) ve *TGF* ($p<0.0001$) genlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p<=0,05$). *b-FGF* ($p<0.0001$) geninde istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p<=0,05$). *Bmp-2* ve *PDGFR* genlerinde istatistiksel olarak anlamlılık görülmedi. *Smad1* geninde ise mRNA ekspresyonu görülmemiştir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer iskemi/reperfüzyonu, apoptozis, gen ifadesi, *Smad1*, *Bmp-2*, *Bcl-X_L*, *b-FGF*, *Caspase-3*, *TGF*, *PDGFR*

ABSTRACT

THE ASSESSMENT OF GENE EXPRESSION OF *Bmp-2*, *Bcl-X_L*, *Smad1*, *Caspase-3*, *TGF*, *b-FGF* AND *PDGFR* AFTER LUNG ISCHEMIA- REPERFUSION

Hasan ŞİMŞEK

Gaziantep University

Institute of Health Sciences

Department of Pyhsiology

Master Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Şeniz DEMİRYÜREK (PhD)

2012, 86 pages

Because inadequate perfusion of body part and tissue due to ischemia arterial or reduction of venous blood flood, it is defined that the body part and tissue mentioned are empty of oxygen. Reperfusion of ischemiac tissue causes a crucially damage in comparison of damage happened with ischemia paradoxically in the tissue. Many mechanism play an important role in the death of cell that caused by both regeneration of cell and a new blood flood which is required to be cleaned up toxic metabolite after ischemia. Ischemia/Reperfusion-induced lung injury is a common situation occurring in lung transplantation. Apoptosis (programmed cell death) also known as suicide of cells is physiological event. It is playing a key role in embriyonic development and maintenance of adult tissues.

In our study, levels of the genes of *Smad1*, *Bmp-2*, *Bcl-X_L*, *b-FGF*, *Caspase-3*, *TGF*, *PDGFR* have been researched for lung tissues which were after the model ischemia/reperfusion (I/R) that created in lung. For that, 40 wistar albino rats were divided equally. Group I= Control group, Group II= İschemia for 60 minutes + reperfusion for 0 hour, Group III= İschemia for 60 minutes + reperfusion for 2 hours, Group IV= İschemia for 60 minutes + reperfusion for 4 hours determined as groups. RNA isolation, cDNA synthesis and RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) were made. Lung tissues were also histopathologically examined.

According to the results of gene levels, *Caspase-3* ($p<0,0001$), *Bcl-X_L* ($p=0,0011$) and *TGF* ($p<0.0001$) are statistically significant decrease in groups ($p\leq 0,05$). *b-FGF* ($p<0.0001$) gene is statistically significant increase ($p\leq 0,05$). *Bmp-2* and *PDGFR* genes aren't statistically significant showed. *Smad1* gene mRNA expression wasn't observed.

Key words: Lung ischemia/reperfusion, apoptosis, gene expression, *Smad1*, *Bmp-2*, *Bcl-X_L*, *b-FGF*, *Caspase-3*, *TGF*, *PDGFR*

1. GİRİŞ

İskemi, tanım olarak dolaşım tarafından dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılamamasıdır. İskemiye bağlı doku hasarında, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne neden olur (1). Reperfüzyon, kan akımının ve bununla birlikte O₂'nin, hipoksik dokuya tekrar geri sağlanmasıdır. Eğer hücre geri dönüşsüz şekilde hasara uğramadıysa, bu sayede enerji depoları ve hücresel hemostazis geri kazanılmış olur. İskemik organa tekrar kan sunumu yapılırken, hücrelerin geri dönüşsüz hasara uğramaları söz konusudur (2). Bu durum, iskemik dokunun reperfüzyonunun dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasarın oluşmasına yol açar (3).

Akciğerlerde iskemi-reperfüzyon(İ/R) hasarı kardiyopulmoner “bypass”, pulmoner tromboendarrektomi ve akciğer transplantasyonundan sonra sıklıkla oluşmaktadır (4). Pulmoner arter tromboendarrektomisini takiben, reperfüzyon sonrasında görülen pulmoner ödem, endotel hücrelerinin iskemi-reperfüzyona maruz kalması sonucu değişen vasküler denge, reperfüzyon sırasında azalan NO, siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeylerine bağlı olarak gelişen vasküler disfonksiyon sonucu bozulan koagülasyon, vasküler permeabilite, vazomotor tonus, lökositlerin adezyon ve agregasyon fonksiyonunda artışı gibi durumlar, klinikte akciğerlerde iskemiye takiben reperfüzyon ile karşılaşılan en önemli sorunlar olarak değerlendirilmektedir (5,6).

Akciğerde İ/R modeli oluşturarak, İ/R sonucu *Smad1*, *Bmp-2*(kemik morfogenetik protein-2), *Caspase-3*, *b-FGF*(bazik-fibroblast büyüme faktörü), *Bcl-X_L*, *TGF*(Transforme Büyüme Faktörü), *PDGFR* (Trombosit-aracılı Büyüme Faktörü Reseptörü) genlerinin mRNA ekspresyonundaki değişiklikleri göstermeyi planladık. *Smad1* ve *Bmp-2* genlerinin akciğer İ/R modeli sonrası oluşan apoptotik etkilerini tam olarak anlayabilmek için, antiapoptotik etkisi olan *Bcl-X_L* ve apoptotik etkisi olan *Caspase-3* genlerinin mRNA ekspresyonundaki değişikliklerin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, İ/R sonrası büyüme faktörleri olarak bilinen *b-FGF*, *TGF*, *PDGFR* genlerinin mRNA ekspresyonlarının kıyaslanması ve İ/R sonucu bu genlerin birbirleriyle olan ilişkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Elde edilen doku örneklerinin histopatolojik görünümüne bakarak da hasarın morfolojisini ortaya koymaya çalıştık.

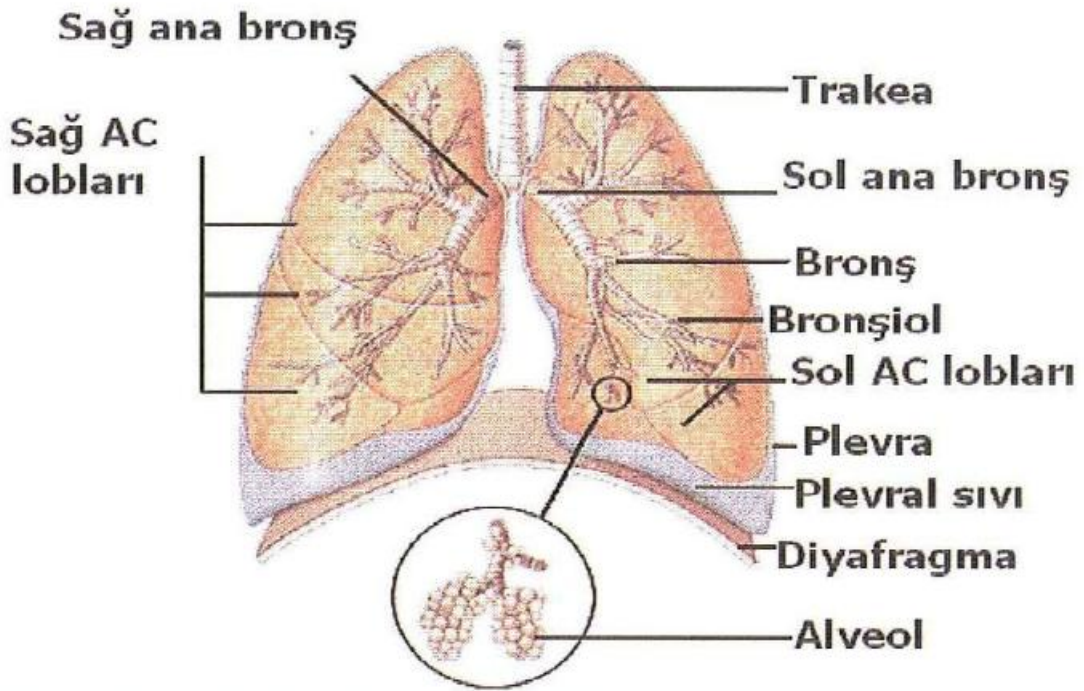
2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKCİĞER

2.1.1. AKCİĞERLERİN ANATOMİSİ

Solunum sisteminin esas organı olan akciğerler; göğüs boşluğunda, içerisinde kalbinde bulunduğu mediastinumun her iki yanında yer alır. Akciğerler sağ (pulmo dexter) ve sol (pulmo sinister) olmak üzere iki tanedir (7).

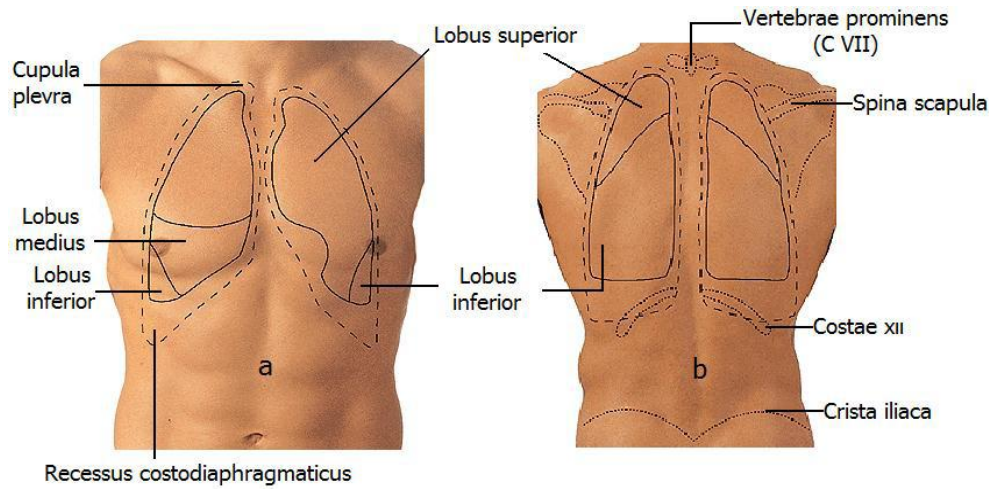
Sağ ve sol akciğerler temelde benzer olmakla birlikte, aynı değildirler. Sol akciğer sağa göre biraz daha küçüktür ve kalp ile uyumlu olarak iç yüzü üzerinde kalbin oluşturduğu bir çukurluk (impressio cardiaca) bulunur. Sağ akciğerde üç, sol akciğerde iki lobu bulunur (8). Akciğerin her bir lobu, pulmoner alveolleri içeren çok sayıda küçük lobüllere ayrılmıştır. Bir bronkopulmoner segment, tepesi; hilum pulmonis'e doğru yönelmiş, tabanı ise; akciğer dış yüzüne doğru olan bir piramit şeklindedir ve visseral pleura'nın uzantısı olan bağ dokusu ile sarılmıştır. Her segmental bronşun yanında akciğer segmentine gelen bir arter dalı ve sinirler vardır. Eğer bir segmental bronшта hastalık ortaya çıkarsa, cerrahi olarak izole edilebilir. Her bir akciğer, 10 bronşiyal içerir (8).



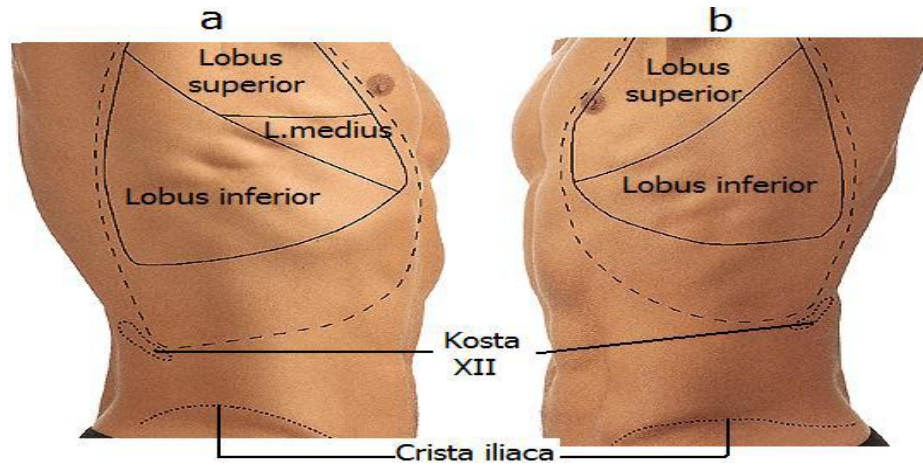
Şekil 2.1. Akciğer ve Yapısı (9).

Akciğerlerin büyüklüğü, göğüs kafesinin büyüklüğüne bağlıdır. Sağ akciğer yaklaşık 625 gr., sol akciğer ise 567 gr. kadardır. Sağ akciğer, sol akciğere göre daha geniş, daha kısa ve %10 daha büyüktür (7).

Akciğerler, yeni doğanlarda pembemsi-beyaz renkte olup zamanla rengi grileşir. Gri renk, daha sonra siyah renge dönüşür. Bu koyu renk, solunum ile alınan karbon zerreciklerinin, akciğerin dış yüzüne yakın kısımlarında birikmesiyle oluşur. Elastik bir organ olan akciğerler, parmaklar arasında sıkıştırıldığı zaman çıtırtı (krepitasyon) şeklinde ses çıkarır. Akciğerler, göğüs boşluğundan çıkarılması veya göğüs boşluğu delinerek negatif basıncın dış basınç ile eşitlenmesi halinde, 1/3 kadar küçülür. Solunum yapmamış bir akciğer, sudan ağırdır; ancak bir defa solunum yaptıktan sonra akciğer içerisinde mutlaka artık hava kalır. Bu yüzden solunum yapmış akciğer, sudan hafiftir ve suda yüzer. Bu durum adli tıpta önemlidir (7).



Şekil 2.2. Akciğerlerin projeksiyonu a) önden, b) arkadan görünüş (7).



Şekil 2.3. Akciğerlerin projeksiyonu a) sağ dış yan, b) sol dış yandan görünüş (7).

Akciğerler göğüs boşluğu içinde uzanır. Her akciğer diaphragma'dan klavikula'nın biraz üzerine kadar uzanır (8). Göğüs boşluğunda her iki tarafta pleural kese içerisinde yerleşmiştir. Ortada mediastinum'da yer alan, içinde kalbin de bulunduğu yapılarla birbirinden ayrılırlar. Bronşiyal ağaç ve akciğer alveolleri dahil olmak üzere ana bronş ve distalinde bulunan solunum sisteminin tüm yapıları, akciğerlerin içinde yer alır. Her akciğer, göğüs boşluğunun şekline uyacak şekilde, dört yüzeye sahiptir. Akciğerin mediastinal yüzeyi hafif iç bükeydir. Ayrıca akciğerin bu yüzünde pulmoner damarlar, sinirler ve bronşların geçtiği hilum pulmonis denilen dikey bir yarık bulunur (8).

2.1.1.1. Akciğerlerin Yüzleri

Her bir akciğerin üç yüzü vardır;

Facies Costalis: Akciğerlerin kostalara bakan konveks dış yüzüdür. Akciğerlerin en büyük yüzü olup göğüs duvarının iç yüzü ile komşuluk yapar. Göğüs boşluğunda tespit edilmiş akciğerlerin bu yüzünde, kaburgaların izleri görülür.

Facies Diaphragmatica: Akciğerlerin diaphragmaya bakan konkav alt yüzüdür. Sağ akciğerin diaphragmatik yüzü, diaphragma aracılığı ile karaciğerin sağ lobu; sol akciğerin diaphragmatik yüzü ise karaciğerin sol lobu ve midenin fundusu ile komşudur.

Facies Mediastinalis: Akciğerlerin mediastinuma dolayısıyla birbirine bakan iç yüzleridir. Bu yüzün omurlar ile komşu olan arka kısmına, pars vertebralis adı verilir. Facies mediastinalisde “*impressio cardiaca*” denilen ve kalbin oturduğu büyük bir çukurluk bulunur. *Impressio cardiaca* sol akciğerde; sağ akciğerdekine oranla daha derindir. *Impressio cardiacanın* arka ve üst kısmında hilum pulmonis yer alır. Buradan akciğerin damar, sinirleri ve bronşlar girip çıkar. Bu oluşumların tümüne, radix (pediculus) pulmonis denir (7).

Radix pulmonis, akciğer sapı olarak da bilinir ve hilum pulmonise bağlanır. Radix pulmonis ve tutunduğu hilum pulmonis, mediastinal yüzün hemen hemen ortasında bulunur. İçerisinde; akciğere giren ve çıkan yapılardan bronşlar, a. pulmonalis ve v. pulmonalisler, lenf damarları, a. bronchialis ve sinirler bulunur. Radix pulmonisde bulunan yapıların ön-arka yönde dizilimi her iki tarafta aynıdır. Her iki tarafta v. pulmonalisler önde, a. pulmonalisler ortada, bronşlar ise arkada bulunur. Mediastinal yüzde bazı organların izleri bulunmaktadır (7).

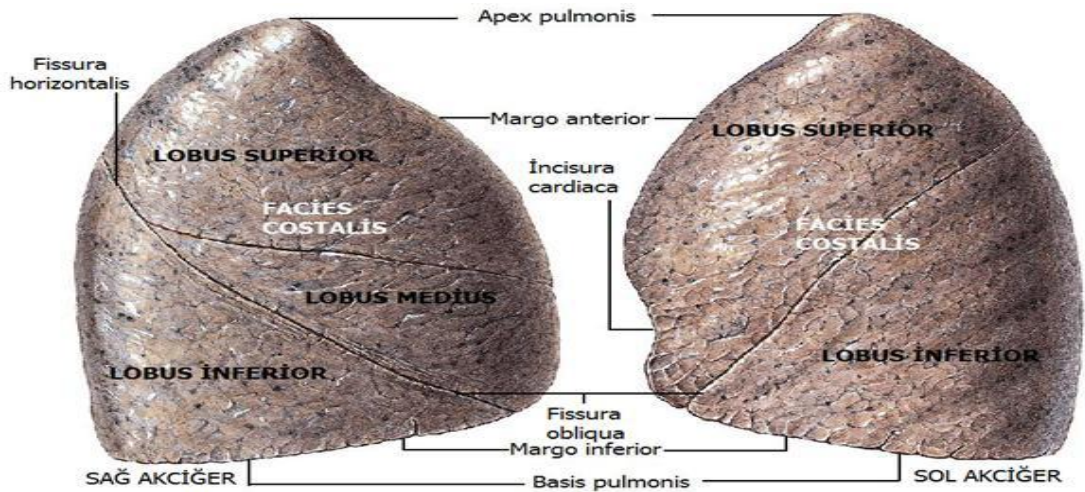
2.1.1.2. Akciğerlerin Kenarları

Her bir akciğerin üç kenarı vardır.

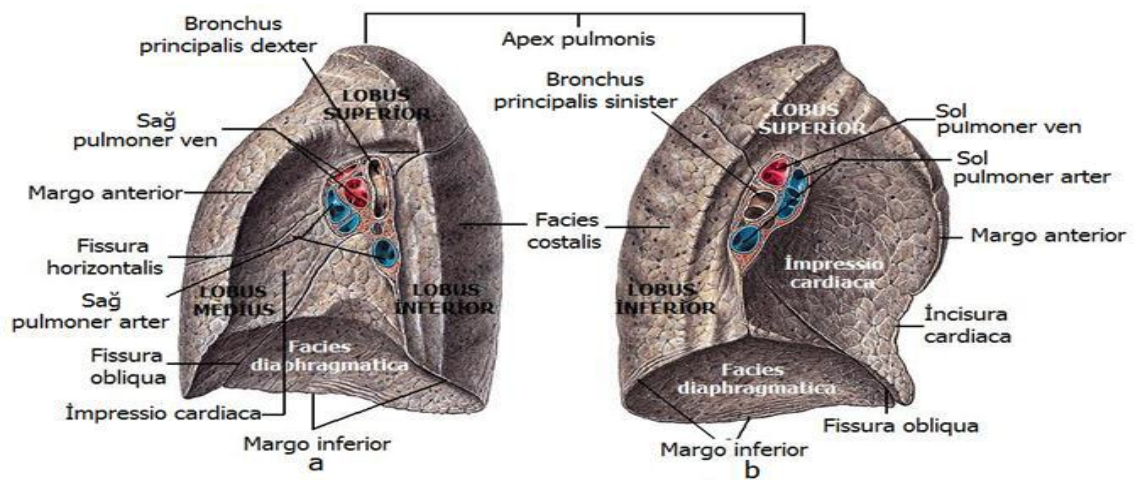
Margo Anterior: Akciğerlerin önde bulunan, mediastinal ve kostal yüzlerini birbirinden ayıran, ince ve keskin kenardır. Pericardiumun ön yüzünü kısmen örter.

Margo Inferior: Diaphragmatik ve kostal yüzleri birleştiren keskin, alt kenardır. Basis pulmonis ile facies costalis arasında olan kısmı ince ve keskindir. Facies mediastinalis ile basis pulmonis arasında kalan kısmı ise künttür.

Margo Posterior: Arkada, kostal yüz ile mediastinal yüzü birleştiren ve göğüs omurlarının yan taraflarında bulunan oluk (paravertebral oluk) içerisine oturan kalın ve künt kenardır (7).



Şekil 2.4: Akciğerlerin yüzleri, kenarları, fissura ve lobları (önden görünüş) (7).



Şekil 2.5: Akciğerler a) sağ akciğer b) sol akciğer (7).

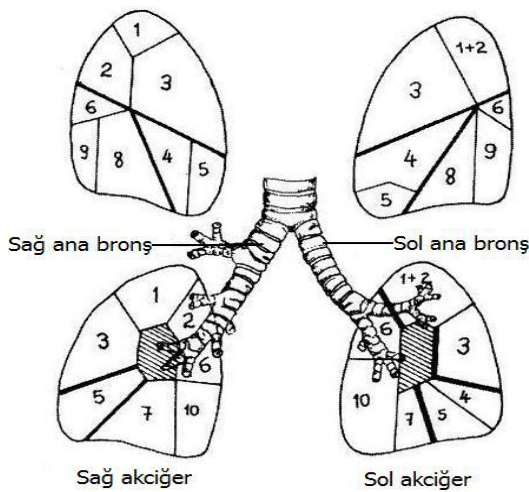
2.1.1.3. Akciğerlerin Lobları ve Segmentleri

Sağ akciğer lobus superior, lobus medius ve lobus inferior olmak üzere üç lobdan oluşur. Bu lobları birbirinden fissura obliqua ve fissura horizontalis adı verilen yarıklar ayırır. Sol akciğer ise lobus superior ve lobus inferior'dan oluşur. Bu lobların arasında “fissura obliqua” adı verilen yarık bulunur.

Fissura obliqua, her iki akciğerde, hilum pulmonisin arka kenarında başlar. Önce yukarı ve arkaya doğru giderek facies costalis'e gelir. Bu yüzde yukarıdan aşağıya ve arkadan öne doğru uzanarak, mediastinal yüze geçip arkaya ve yukarı doğru uzanarak hilum pulmoniste sonlanır.

Fissura horizontalis, sadece sağ akciğerde bulunur ve lobus superioru, lobus mediusdan ayırır.

Akciğerlere giren bronchus principalisler; bronchus lobarislere, bronchus lobarisler de bronchus segmentalis adı verilen daha ince dallara ayrılır. Her bir bronchus segmentalis, yapı ve fonksiyonel olarak ayrı bir birim oluşturan ve akciğerin diğer bölümleri ile fonksiyonel bir ilişkisi bulunmayan bir bölüme girer. Diğer bölümlerden bağımsız olarak çalışan ve cerrahi olarak çıkarıldığında, diğer bölümlere zarar vermeyen bu fonksiyonel birime, segmentum bronchopulmonale(bir akciğer segmenti) adı verilir. Her bir akciğer segmenti, tepesi akciğer hilusuna, tabanı ise akciğerin dış yüzüne doğru yönelmiştir. Her segment, bağ dokusu ile sarılmış ve sadece kendine ait damarları, bronchus segmentalisi ve sinirleri vardır (7).



Şekil 2.6: Akciğer segmentleri (7).

Sağ akciğer(pulmo dexter)de; lobus superior 3, lobus medius 2, lobus inferior 5 segmente ayrılır.

Sol akciğer(pulmo sinister)de ; lobus superior 5, lobus inferior 5 segmente ayrılır.

Akciğerlerde gaz alış verişinin yapıldığı birime, “asinus” adı verilir. Bir asinus bronchiolus respiratorius, ductus alveolaris, saccus alveolaris ve alveolus pulmonisden oluşur (7).

2.1.1.4. Akciğerin Damarları

Akciğerin, fonksiyonel ve besleyici olmak üzere iki grup damarı vardır. Fonksiyonel damarları; a.pulmonalis ve v. pulmonalisler; besleyici damarları ise a.bronchialis ve v. bronchiolislerdir.

Sağ ventrikülden çıkan ve venöz kanı taşıyan truncus pulmonalis, 5 cm uzunluğunda kalın bir kütük şeklindedir. Pericardiumdan çıktıktan sonra, a. pulmonalis dextra ve sinistra adını alan iki dala ayrılır. A. pulmonalis dextra, sinistraya oranla daha uzundur ve arcus aortae ile v. cava superiorun arkasından geçerek sağ radix pulmonise gelir ve burada iki dala ayrılır. Bu dallardan üstteki üst loba, alttaki ise tekrar iki dala ayrılarak orta ve alt loba gider.

Akciğer alveollerine, a. pulmonalisin terminal dallarından oksijeni azalmış kan gelir. Burada oksijen bakımından zenginleştikten sonra, alveol kapillerlerinden geçerek, v pulmonalisin dallarına direne olur. Bu dallar, segmentler arasındaki bağ dokusunda uzanarak radix pulmonise gelir. Her bir akciğerden, iki adet v. pulmonalis çıkar ve akciğer alveollerinde oksijen bakımından zenginleşen kanı sol atriuma getirir.

Akciğer dokusunu, bronchusları ve pleura visceralisi besleyen arterler, a. bronchialislerdir. Akciğer dokusunun venöz kanı, vv. bronchialesler tarafından toplanır (7).

2.1.1.5. Plevra (Akciğer Zarı)

Sağ ve sol akciğeri bir kese şeklinde ayrı ayrı saran, çift katlı seröz bir zardır (8). Plevranın parietal yaprağı, göğüs kafesinin iç yüzünü, diafragmanın çok büyük bir bölümünü örter ve mediastinum’u yanlardan sınırlar. Plevranın visseral yaprağı, akciğer

yüzeyini ve loblar arasındaki yüzleri örter. Aralarındaki kapiller aralığa, cavitas pleuralis denir ve solunum sırasında kolaylık sağlayan bir sıvı içerir. Plevranın iki yaprağının birbirlerine yaklaşıp oluşturdıkları bölüme, ligamentum pulmonale adı verilir. Bu ligament, akciğerleri destekler (10).

2.1.1.6. Akciğerlerin Lenfatik Drenajı

2.1.1.6.1. Lenf Düğümleri

Toraksın visseral lenf düğümleri akciğerler, plevra ve mediastinum'u drene eder. Bu lenf düğümleri, radix pulmonis ve hilum pulmonis'te çeşitli gruplar halinde düzenlenir: geniş bronşlar boyunca nodi lymphatici pulmonales, esas olarak hilum pulmonis'te, nodi lymphatici bronchopulmonales oluşturur (11). İkincisi interlober, lobar, segmental, subsegmental ve intraparenkimal intrapulmoner düğümleri oluşturur (12).

Trakeobronşiyal lenf düğümleri, bifurcatio trachea'nın yakınındadır. Trakeobronşiyal ve trakeal lenf düğümleri, akciğer ve bronşların bir çok bölümünün lenfatik drenajını alır (11). Bu gruplardan oluşan düğümleri, üst ve alt paratrakeal, subaortik, retrotracheal ve subkarinal düğümleri içerir (12).

2.1.1.6.2. Lenf Damarları

Akciğerlerin lenf damarları, ilk olarak nodi lymphatici pulmonales'lere gelir. Bu lenf düğümlerinin efferentleri, nodi lymphatici bronchopulmonales'lere, bunların efferentleri de nodi lymphatici tracheobronchioles'lere açılır.

Akciğerlerde iki tip lenf damarı vardır;

1-Yüzeyel lenf damarları: Fissür kenarları boyunca uzanır ve nodi bronchopulmonales'e drene olur.

2-Derin lenf damarları: Nodi lymphatici bronchopulmonales'e ulaşmak için hilum pulmonis'i geçer. Bronkus ve pulmoner damarlar ile birlikte radix pulmonis'e doğru seyreder ve akciğer dokusu içinde bulunan nodi lymphatici pulmonales'e dökülür. Buradan ayrılan lenf damarları, radix pulmonis'teki nodi lymphatici bronchopulmonalis'lere drene olur. Bu lenf nodüllerinde toplanan akciğer lenfası, önce

nodi lymphatici trocheobronchialis'e, daha sonra da nodi lymphatici bronchomediastinalis'e dökülür (13).

2.1.2. AKCİĞER EMBRİYOLOJİSİ

Embriyolojik gelişimin yaklaşık 4. haftasından itibaren, ön bağırsağın ventral duvarından ilk solunum sistemi taslağı çıkıntısı oluşur. Uzunlamasına büyüyen bu çıkıntı, laringotrakeal oluk adını alır. Bu oluşumdan daha sonra larinks, trakea ve akciğer parankimi oluşacaktır. 6. haftada sağ akciğer tomurcuğu 3, sol akciğer tomucuğu ise 2 dala ayrılarak lobların oluşmasını sağlar. Trakea ve akciğer epiteli, ön bağırsak endoderminin tomurcuklanması ile oluşur. Damarlar ve bağ dokusu, çevre mezenkimden farklılaşır. Plevra ise intraembriyonik çölm boşluğu ve onu çevreleyen mezotelyal hücrelerden gelişir.

Solunum sistemi gelişimi, 4. haftadan sonra 4 aşamada tamamlanır:

1-Psödoglandüler faz: 4 ve 16. haftaları kapsar. 4. haftadan itibaren tübüler ağaç, taşıyıcı hava yolları, pulmoner asinusler, 30. günde loblar, 41. günde segment bronşları, terminal bronşiolelere kadar olan hava yolu epiteli ve vasküler sistem gelişir (14).

2-Kanaliküler faz: 17. ve 26. haftaları kapsar. Akciğer havayollarının farklılaşması söz konusudur. Bu dönemde tüm bronşiyal havayolları gelişir (14).

3-Terminal kese faz: 26 ve 36. haftaları kapsar. Bu dönemde hava boşlukları gelişir (14).

4-Alveolar faz: Akciğerin bu evredeki gelişim prenatal ve postnatal hayatta devam eder. 36. hafta ile 3. yıl arasındaki dönemi kapsar. Bu dönemde, alveolar hava keseleri şekillenmeye başlar. Tip 1 pnömositler, farklılaşmaya başlarlar. Tip 2 pnömositlerin öncülleri de ortaya çıkar. Tip 2 hücreler, sürfaktan yapımından sorumludur (14).

2.1.3. SOLUNUM MEKANİZMASI

Oksijen bakımından zengin havanın solunum yollarından geçip alveollere dolmasına soluk alma (inspirasyon), karbondioksit bakımından zengin havanın (kirli hava) alveollerden geri çıkıp ortama verilmesine soluk verme (ekspirasyon) denir. Soluk alma ve verme işlemine ise; soluma devri denir. Soluma devri, insanların normal aktiviteleri esnasında dakikada 15–18 kez tekrarlanır. Solunum sayısı, vücudun çalışma ve dinleme durumuna göre değişiklik arz edebilir. Yetişkin bir insan 1 saatte 20 lt. oksijen alır ve 20

lt. karbondioksit verir. Buna göre solunum için saatte 5 m³ havaya ihtiyaç duyulur. İnsanlarda kaburga göğüs kasları ve diyafram kolayca hareket edebilir.

Göğüs kafesi daraltılıp genişletilebilir. Soluk alma esnasında kaburga yukarı ve dışa doğru çekilir ve göğüs boşluğu genişler. Göğüs hacminin genişlemesiyle birlikte, iç basınç düşer ve dışarıdaki hava basıncı, iç basınçtan yüksek konuma geldiği için, akciğerlere hava dolar. Soluk verme esnasında, kaburgalar aşağı doğru salınır ve göğüs kafesi daralır. Akciğerlerin hacmi küçülür, buna bağlı olarak ise iç basınç, dış basıncın üstüne çıkar ve akciğerlerdeki hava dışarı atılır (15).

2.1.3.1. Akciğer Hacim Ve Kapasiteleri

Akciğerlerin hacim ve kapasiteleri spirometre denen cihazla ölçülür. Soluk hacmi (tidal hacim); her normal solunum hareketi ile akciğerlere alınan veya akciğerlerden çıkarılan hava hacmidir. Ortalama hacmi 500 ml. kadardır. İnspirasyon rezervi; kişi tüm gücüyle inspirasyon yaptığında normal soluk hacminin üzerine alınabilen fazladan soluk hacmidir. Genel olarak 3000 ml. kadardır. Ekspirasyon rezervi; normal bir ekspirasyon hareketinden sonra zorlu bir ekspirasyonla çıkarılabilen hava hacmidir. Genel olarak 1000 ml. kadardır. Rezidüel hacim; en zorlu ekspirasyondan sonra akciğerlerde kalan hava hacmidir. Genel olarak 1200 ml. kadardır. İnspirasyon kapasitesi; soluk hacmi ile inspirasyon rezervinin toplamına eşittir. Yaklaşık olarak 3500 ml. kadardır. Fonksiyonel rezidüel kapasite; ekspirasyon rezervi ile rezidüel hacmin toplamına eşittir. Yaklaşık olarak 2300 ml. kadardır. Vital kapasite; inspirasyon rezervi, soluk hacmi ve ekspirasyon rezervlerinin toplamına eşittir. Yaklaşık olarak 4600 ml. kadardır. toplam akciğer kapasitesi; akciğerlerin mümkün olan en geniş inspirasyon hareketi ile gerilmesinden sonra ulaşılabilecek en yüksek hacimdir. Yaklaşık olarak 5800 ml. kadardır. tüm akciğer hacim ve kapasiteleri kadınlarda erkeklere oranla %20-25 daha düşüktür (16).

2.1.3.2. Pulmoner Ventilasyon

Akciğerlerdeki hava kesecikleri ile atmosferde mevcut hava arasındaki gaz alışverişine pulmoner ventilasyon adı verilir. Bu olay soluk alma ve soluk verme esnasında meydana gelir (15).

2.1.3.3. Difüzyon

Akciğer alveollerindeki O_2 'nin akciğer kapillerinin içindeki kana, kandaki CO_2 'nin de yine aynı yolla alveollere geçişi solunumun difüzyon fazını oluşturur (15).

2.1.4. SOLUNUMUN DÜZENLENMESİ

2.1.4.1. Solunumun Sinirsel Düzenlenmesi

Solunum kasları, ritim oluşturmaz. Dolayısıyla sinirsel kontrole ihtiyaç duyulur.

Sinirsel kontrol yardımıyla;

1-Sinirsel kontrolde inspirasyon ve ekspirasyon döngüsünün düzenlenmesi (solunumun ritmik kalıbı)

2-Solunum hızının yani ventilasyon hızının ayarlanması

3-Solunumun dışında; konuşma, öksürme gibi istemli ya da istemsiz hareketlerin ayarlanması gerçekleştirilir.

Solunum merkezi, medulla oblongata ve pons'ta bulunur ve solunumun kimyasal kontrolünde görev alır. Solunum, otonom sinir sistemi tarafından kontrol edilmektedir ve bu merkezde, çeşitli nöron grupları vardır. Medulla'da solunumun ritmik kalıbı gerçekleştirilir. Dorsal ve ventral solunum grubu olmak üzere 2 tipi vardır. Dorsal solunum grubu: Medullanın dorsal kısmında bulunur ve inspirasyonda görev alır.

Ventral solunum grubu: İnspirasyon ya da ekspirasyondan sorumludur. Pons'ta apnöstik ve pnömotaksik merkezler bulunur. Apnöstik merkez: Bazı nöronları uyararak inspirasyonda rol aldığına inanılıyor. Pnömotaksik merkez: Solunum rampasının kapanmasını kontrol eder, pnömotaksik merkezinin uyarılması inspirasyonun erken sonlanmasına neden olur. Bunun sonucunda solunum frekansı artar ve solunum hacmi azalır (17).

2.1.4.2. Solunumun Kimyasal Düzenlenmesi

Solunum, sadece dokulara oksijen sağlamak ve dokulardaki karbondioksiti uzaklaştırmak anlamına gelmez. Aynı zamanda bazı iyon yoğunlaşmalarını da sabit tutmaya çalışmaktır. Solunum sistemi, bunların miktarlarındaki değişikliklere karşı oldukça duyarlıdır. CO₂ ve H⁺ iyonu yoğunlaşmalarındaki değişiklikleri algılayan medulla oblongata'nın altındaki kimosensitif alanda bulunurlar. Kanda CO₂ ve H⁺ miktarındaki artış, esas olarak solunum merkezini uyarır, sonuçta inspirasyon ve ekspirasyon sinyalleri artar. Fakat CO₂ yoğunlaşmasındaki artış, aynı zamanda kimosensitif alanı da etkiler. Bu etki ile dokularda, H₂O ile CO₂ birleşir ve karbonik asit (H⁺ + HCO₃⁻) meydana getirir (18).

2.1.4.3. Solunum Membranında Gazların Difüzyonu

Solunum ünitesi, yaklaşık 300 milyon alveolden meydana gelir ve bu alveollerin yapısı oldukça incedir. Fakat aralarındaki kapillerlerle beraber sağlam bir yapı oluştururlar. Alveoller, bir sıvı ile dolar ve bu sıvı, yüzey gerilimini oluşturur. Bu yüzey geriliminin oluşturduğu zorlukları ortadan kaldırmak için ise, Tip II hücreleri sürfaktan salgılar ve yüzey gerilimini ortadan kaldırır. Membranın kalınlığı, membran yüzey alanı, gazın difüzyon katsayısı ve membranın iki yüzey arasındaki basınç farkı, gazların bir zardan geçişini etkileyen en önemli faktörlerdir. Membran kalınlığı ile gaz difüzyon hızı, ters orantılıdır. Membran kalınlığının 2-3 katına çıkması halinde, gaz alışverişi önemli ölçüde azalır. Ayrıca, solunum membranının yüzey alanının daralması da gaz alışverişini azaltır. Gazların difüzyon katsayısı, onun eriyebilirliği ile doğru orantılı ve molekül ağırlığı ile ters orantılıdır. Solunum membranında bulunan karbondioksitin difüzyon hızı, oksijeninkinden 20 kat daha hızlıdır. Basınç farkı da, gaz geçişini etkileyen önemli faktörlerden biridir. Membranın karşı tarafında da, aynı nedenlerden dolayı, bir gaz basınç farkı oluşur. Membrandaki gaz alışverişi, bu iki basınç farkı ile ortaya çıkar ve bu basınç farkı, net geçiş eğiliminin ölçüsü olarak kabul edilir. Normal solunum esnasında membranın iki tarafı arasında ortalama 11 mmHg basınç farkı vardır. Bu basınç, 1 dakikada 230 ml. difüzyona uğrayan oksijenin hacmine eşittir. Karbondioksitin difüzyonu, oksijenin difüzyonundan 20 kat daha fazla olduğundan dolayı, çok daha fazla difüzyona uğrar. Bu durumun, istirahat halinde 400–450 ml. /dk./ mmHg, egzersiz halinde ise 1200-1300 ml /dk/ mmHg olması beklenir (19).

2.2. İSKEMİ

İskemi tanım olarak; dolaşım tarafından, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılamamasıdır. İskemiye bağlı doku hasarında, hücresel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne neden olur (1). Hücrenin enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan Na^+ - K^+ - ATPaz pompası inhibe olur. Sonuçta, hücre içinde Na^+ ve Ca^{+2} iyon konsantrasyonları artar (21). Hücre içinde Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun artışı, hücre için sitotoksiktir (22). Nitekim yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflamatuvar sitokinlerin, lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma olur. Bu durum hücreyi, reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar. İskemi döneminde, adenosin trifosfat (ATP) üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için, ATP'den adenosinmonofosfat (AMP) ve adenosin oluşur. Adenosin, hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın(KDH) ksantin oksidaza(KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin, ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı NAD^+ (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle $\text{KDH} \rightarrow \text{KO}$ 'a dönüştüğünden, hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleştirilir. Elektron alıcı olarak oksijen kullanılır (23).

2.2.1. Geri Dönüslü Zedelenme

Hipoksinin ilk zarar verdiği yer, hücrenin aerobik solunumudur; ATP oluşumu yavaşlar ve durur. Özellikle hücre zarının ATP aktivitesinin azalması, zarda aktif sodyum pompasının yetersizliğine yol açarak, hücre içi sodyum birikimine ve hücreden potasyumun dışarı atılımına yol açar. Hücresel ATP azlığı, adenosin monofosfat artımı ile birliktedir. Sonuçta, fosfofrüktokinaz enzimi uyarılır ve anaerobik glikoliz hızı artarak, glikojenden ATP oluşumu ile birlikte, hücre enerji kaynakları korunur. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinden hidroliz sonucu oluşan inorganik fosfat birikimine yol açarak, hücre içi pH'yı düşürür. Granüllü endoplazmik retikulumdan, ribozomlar ayrılır ve polizomlar monozomlara parçalanır (24).

Hipoksi devam ederse, membran geçirgenliği artar ve mitokondri fonksiyonları azalır. Mitokondriler normal, şişmiş ya da gerçekten yoğunlaşmıştır. Endoplazmik retikulum genişlemiş ve tüm hücre belirgin olarak şişmiştir. Bu bozuklukların tümü, oksijen verilince geri dönüşlüdür. Eğer iskemi devam ederse, geri dönüşsüz zedelenme meydana gelir (24).

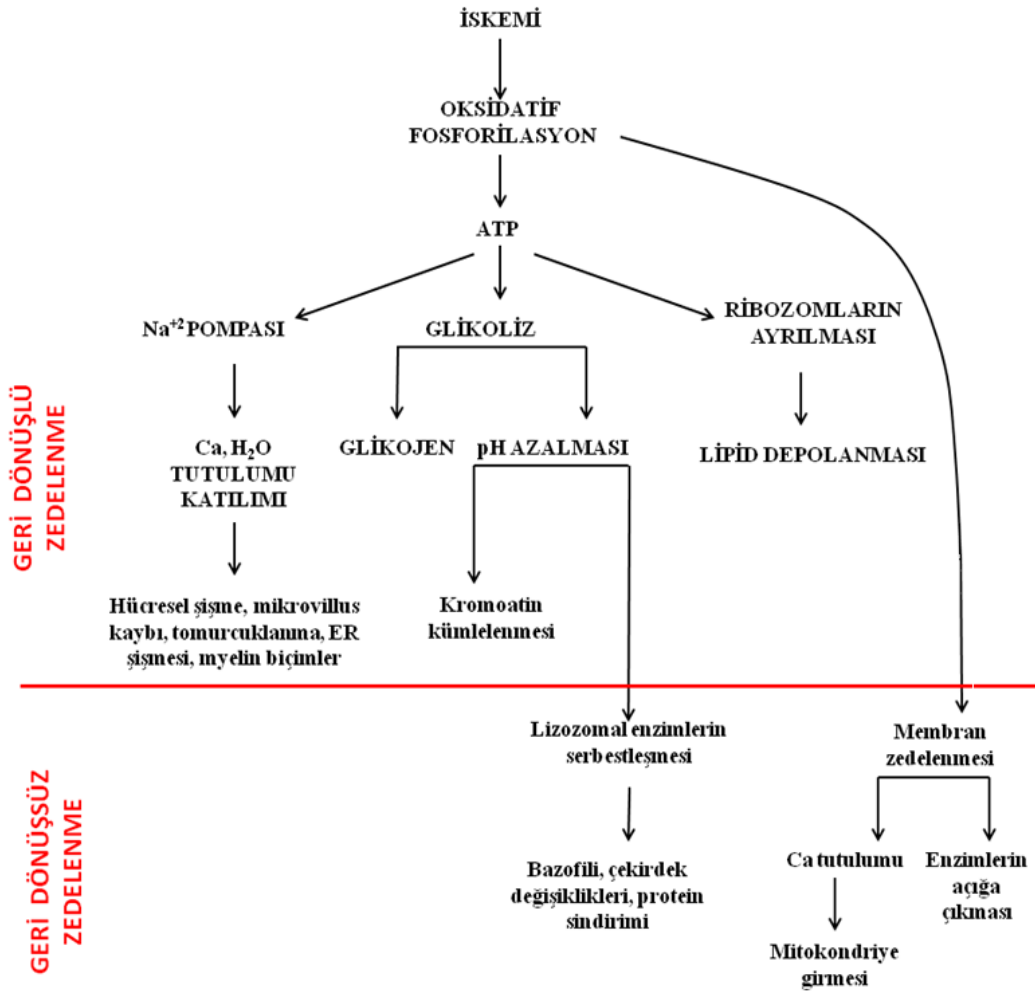
2.2.2. Geri Dönüşsüz Zedelenme

Geri dönüşsüz zedelenme, yapısal olarak mitokondri ve kristalarda aşırı vakuolizasyon, plazma zarında aşırı zedelenme, lizozomlarda şişme ve özellikle iskemik alan yeniden beslenirse, hücre içine yoğun kalsiyum tutulumu ile birliktedir. Amorf kalsiyumdan zengin yapılar, mitokondri matriksinde gelişir (24).

Proteinler, ribonükleik asitler, aşırı geçirgen zarlardan sürekli kaybedilir. Hücreler, ATP'nin yeniden oluşumu için, hayati önemi olan metabolitlerini de kaybeder. pH'nın düşmesi sonucu, lizozom zarları zedelenir. Enzimleri sitoplazmaya geçerek, sitoplazmik ve çekirdek yapılarının sindirimine yol açar. Hücre ölümünü takiben, hücre organelleri devamlı parçalanır. Hücresel enzimler, hücre dışı mesafeye sızarlar. Hücreler arasındaki makromoleküller, ölü hücreye girerler. Sonuçta ölü hücreler, miyelin biçimler ve fosfolipidlerden oluşan büyük kitlelere dönüşürler. Bunlar daha sonra diğer hücreler tarafından fagosit edilir ve yağ asitlerine parçalanır (24).

Geri dönüşsüz zedelenmeyi karakterize eden iki olay vardır. Birincisi mitokondri bozukluğunun reperfüzyon ve reoksijenasyonuna rağmen düzeltilemeyişi ve ikincisi membran fonksiyonlarının çok ciddi bozukluğudur (25).

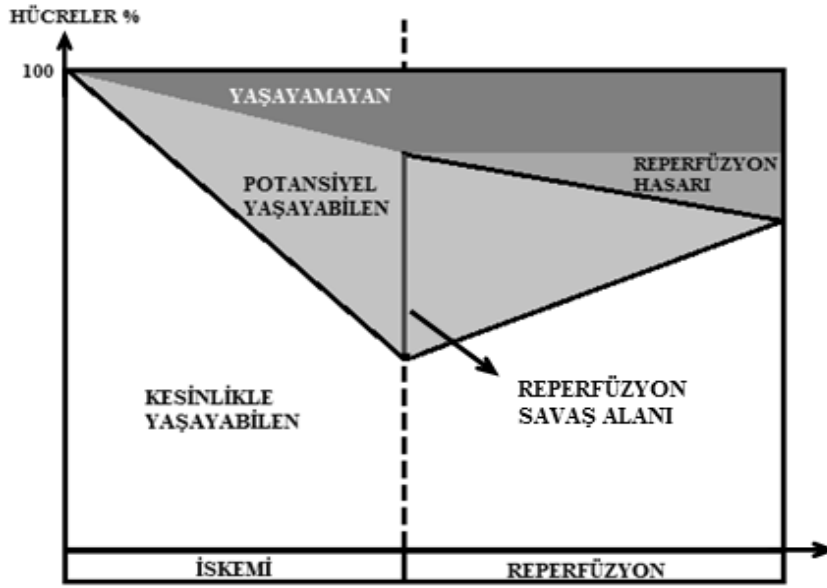
Membran bozukluğunun oluşumunun altında dört olası neden yatmaktadır. Bunlar; membran fosfolipidlerinin giderek artan kaybı, hücre iskelet proteinlerinin parçalanması, toksik oksijen türevlerinin hücre membranı ve diğer hücre yapılarında zedelenmeye yol açması, membranlar üzerinde yer alan fosfolipidlerin parçalanarak katabolik ürünlerin birikmesi (25).



Şekil.2.7. Geri dönüşlü ve geri dönüşsüz zedelenme sırasında gerçekleşen olaylar (25).

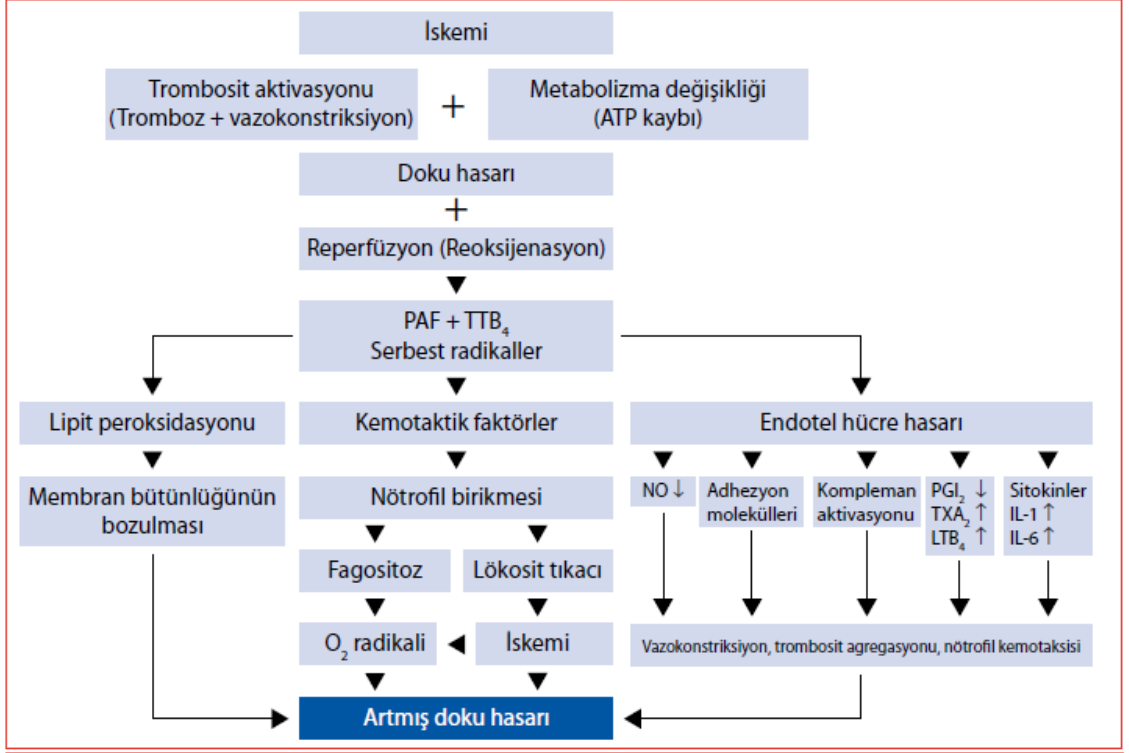
2.3. REPERFÜZYON

Reperfüzyon, kan akımının ve bununla birlikte O₂'nin, hipoksik dokuya tekrar geri sağlanmasıdır; yani dolaşımın yenilenmesidir. Eğer hücre geri dönüşsüz şekilde hasara uğramadıysa, bu sayede enerji depoları ve hücresel hemostazis geri kazanılmış olur. İskemik organa tekrar kan sunumu yapılırken, hücrelerin geri dönüşsüz hasara uğramaları söz konusudur (2). Bu durum, iskemik dokunun reperfüzyonunun dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasarın oluşmasına yol açar (3).



Şekil.2.8. İskemi-Reperfüzyon Hasarı (26).

Dokulara, ihtiyacı olan oksijenin yeterince sağlanamaması durumu, hücrelerde anaerobik metabolik yolların kullanımını zorunlu hale getirir. Dokularda meydana gelen iskemiyle azalan oksijen düzeyi; laktat birikimine, doku pH'sında düşüşe ve sonunda membran transport sisteminde hasara neden olur. Ayrıca transport sisteminin bozulması ile hücre içi kalsiyum yoğunluğunda artış meydana gelir. Artan kalsiyum, ikinci mesajcılara, çeşitli enzimlere etki eder. Bu durum, öncü inflamatuvarların birikmesine, membranların işlev ve bütünlüğünün olumsuz etkilenmesine ve hücre iskeletinin organizasyonunun bozulmasına neden olur. Tüm bu değişiklikler sırasında dokuların enerji depoları tükenirken, biyolojik olarak aktif ajanların(prostasiklin, nitrik oksit gibi) üretimi azalır, doku için toksik yeni bileşiklerin oluşum hızında artış meydana gelir. Öte yandan, süreç boyunca adezyon molekülleri, sitokinlere ilişkin bazı genlerin sentez hızı azalırken, bazı genlerin(cNOS, trombomodulin) iskemik hücrelerde sentez hızı artar (27).



Şekil 2.9. İskemi/Reperfüzyon hasarında yer alan olaylar dizisi (28).

2.4. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

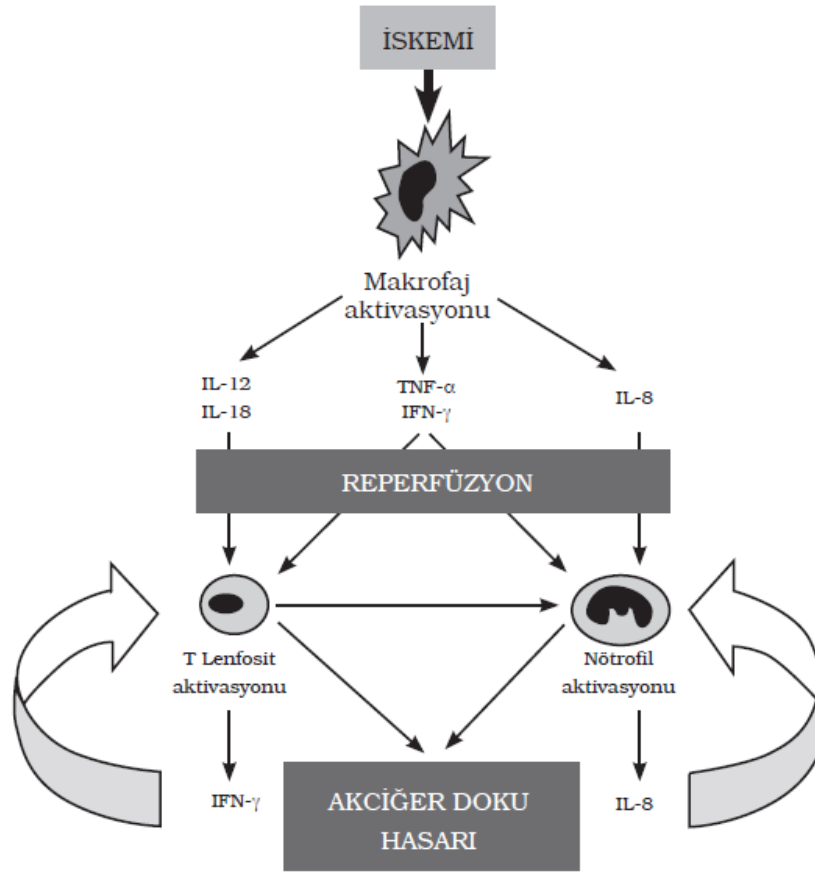
İskemi, organı veya dokuyu perfüze eden kan akımındaki yetersizliğine bağlı olarak gelişen, geriye dönüşümlü veya dönüşümsüz hücre/doku zedelenmesine neden olmaktadır (3). İskemi sonrasında hücrelerde pek çok metabolik ve yapısal değişiklikler oluşmaktadır. Bunlardan biri; iskeminin, hücrede oksidatif fosforilasyonu bozarak, hücre içi adenosin trifosfat (ATP) ve fosfokreatin sentezinde azalmaya yol açmasıdır. Bu durum, hücre membranının ATP'ye bağımlı iyonik pompa fonksiyonunu bozarak, iskemi sırasında adenin nükleotidinin yıkımını da arttırmaktadır. Bu yıkım da, reaktif oksijen türevlerinin (ROS) prekürsörü hipoksantin'in hücre içi birikimini arttırmaktadır. İskemi sonrasında, o bölgedeki kan akımının yeniden sağlanması (reperfüzyon) ve hücre içine moleküler oksijenin yeniden sunulması ile birlikte, ROS türevleri hızla oluşmaktadır. İskemi aynı zamanda endotel hücrelerinde bazı proinflatuvar gen ürünlerinin (lökosit adezyon molekülü, sitokinler vb.) ve biyoaktif bileşiklerin (endotelin, tromboksan A₂ vb.) sentezini arttırırken, bazı koruyucu gen ürünlerinin (yapısal nitrik oksit sentaz (eNOS), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve bu enzimlerin ürünlerinin nitrik oksit (NO), prostasiklin) ekspresyon ve sentezini baskılamaktadır (27).

Geri dönüşsüz hücre hasarını önleyebilmek için, organa/dokuya yeniden kan akımının sağlanması gerekmektedir. Ancak reperfüzyonun gerçekleştirilmesi, iskemik dokularda, iskeminin dokuda/organda oluşturduğu hasardan daha fazla bir hasara yol açabilmektedir. Hücreye daha fazla kalsiyum, sodyum ve su girmesi ile sonuçlanmaktadır (29).

2.5. AKCİĞERLERDE İSKEMİ-REPERFÜZYON (İ/R) HASARI

Akciğerlerde iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarı kardiyopulmoner “bypass”, pulmoner tromboendarrektomi ve akciğer transplantasyonundan sonra sıklıkla oluşmaktadır (4). Pulmoner arter tromboendarrektomisini takiben reperfüzyon sonrasında görülen pulmoner ödem, endotel hücrelerinin iskemi-reperfüzyona maruz kalması sonucu değişen vasküler denge, reperfüzyon sırasında azalan NO, siklik guanozin monofosfat (cGMP) düzeylerine bağlı olarak gelişen vasküler disfonksiyon sonucu bozulan koagülasyon, vasküler permeabilite, vazomotor tonus, lökositlerin adezyon ve agregasyon fonksiyonunda artış, klinikte akciğerlerde iskemiyi takiben reperfüzyon ile karşılaşılan en önemli sorunlar olarak değerlendirilmektedir (5,6).

Akciğerlerde iskemik doku hasarının patolojik tablosu, inflamatuvar yanıt ile ortak özellikler göstermektedir. İskemiye bağlı olarak akciğerlerde, proinflamatuvar sitokinlerin üretimi artmakta, mononükleer ve polimorfonükleer lökositlerin aktivasyonu ve dokuya invazyonu görülmektedir. Akciğer inflamasyon yanıtında interlökin (IL)-1 β ve IL-6 en çok üzerinde durulan sitokinlerdir. Transdermal growth faktör (TGF)- β 1’in İ/R ve akciğer transplantasyonundaki önemi, IL-10 ile birlikte akut akciğer reddi ve reperfüzyon hasarını azaltmasının gösterilmesi ile gündeme gelmiştir (30). İ/R hasarı sırasında, sitokin üretimi ile makrofaj, lenfosit ve nötrofil aktivasyonu paralel olarak gelişmektedir. İskemi, makrofajlardan proinflamatuvar sitokinlerin salınımını tetiklemekte ve erken reperfüzyon hasarı oluşturmaktadır. IL-8, IL-12, IL-18, Tümör nekroze edici faktör alfa (TNF- α), interferon gama (IFN- γ) gibi sitokinler ise geç dönemde nötrofil ve T-lenfosit aktivasyonuna yol açmakta ve beraberinde geç dönem reperfüzyon hasarı oluşmaktadır. Adezyon moleküllerinin de, iskemi sırasında pulmoner damar endotel hücrelerinde arttığı bilinmektedir. Bu moleküllerden P-selektin, intraselüler adezyon molekülü (ICAM-1), CD18 gibi moleküllerin deneysel olarak reperfüzyon sırasında bloke edilmelerinin de akciğer reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (3).



Şekil 2.10. Pulmoner vasküler yatakta iskemi-reperfüzyon sırasında lökosit aktivasyonu ve sitokin salınımı arasındaki etkileşimin olası mekanizması (de Perrot M. ve ark. Am J Respir Crit Care Med 167: 490-511, 2003'den alınmıştır.)

İ/R hasarının hipotermik koşullarda (+4°C) normotermik koşullara göre daha az olduğu bilinmektedir (31). Hipotermi, doku/organ metabolik hızını düşürmekte ve enerji ihtiyacını azaltmaktadır. Klinikte deneysel bulgular eşliğinde, transplantasyon için seçilen akciğerlerin, alıcıya implante edilene kadar geçen süre içerisinde, hipotermik bir solüsyon içerisinde bekletilmesi rutin olarak uygulanmaktadır. Hipotermi, transplantasyonda akciğer saklanması için gerekli olmakla beraber, reperfüzyon sırasında ortaya çıkan ve organ için zararlı olan olayların devam etmesini engelleyememektedir. Bu olaylar temel olarak; oksidatif stres, sodyum pompası inaktivasyonu, hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) birikmesi ve ortama demir iyonu salıverilmesidir (3).

Oksidatif stres, ROS oluşması ile karakterize bir durumdur. Bu türevler, süperoksit anyonu ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$)'dir (32). Bu türevler kararsız ürünler olup, hücre permeabilitesinin artmasından hücre zarının

erimesine kadar çeşitli derecelerde lipid peroksidasyonuna yol açmaktadırlar (32). Akciğerde birçok hücre tipi (endotel hücreleri, Tip II pnömositler, clara hücreleri) ROS oluşturabilmektedir (33).

Akciğerlerde, iki ana mekanizma ROS oluşumuna katkı sağlamaktadır. Bu mekanizmalardan biri, reperfüzyon ya da solunum sırasında ortama oksijenin yeniden sunulması ile O_2^- oluşumuna yol açan hipoksantin birikimidir. Anoksi sırasında, ksantin dehidrogenaz enzimi, ksantin oksidaz formuna dönüşmektedir. Enzimin oksidaz formu, ortamdaki oksijenin artışı ile, hipoksantini O_2^- dönüştürmektedir. Diğer mekanizma ise, iskemi ile aktive olan ve oksijenin O_2^- ve H_2O_2 dönüşümünü katalizleyen, NADPH oksidaz sistemidir (34). Bu sistem, yoğunlukla nötrofillerin, monosit ve makrofajların yüzey membranlarında bulunmaktadır.

Genelde organ transplantasyonunda I/R terimi, anoksi-reoksijenasyona karşılık gelmektedir. Ancak akciğer alveollerinde iskemi sırasında bulunan oksijen, iskemi sırasında belli bir süre hipoksiyi önlemekte ve aerobik metabolizmanın devamını sağlamaktadır (35). Akciğerde iskeminin ve hipoksinin sonucu olarak oluşan oksidatif stresin, birbirlerinden farklı olduğu düşünülmektedir. Hipokside, hızlı bir ATP yıkımı olmakta, dolayısıyla yıkım ürünü olan hipoksantin birikimi artmaktadır. İskemi sonucu oluşan oksidatif stresin de, ATP depolarının boşalmasından bağımsız bir oksidan hasar oluşturduğu öne sürülmektedir (36).

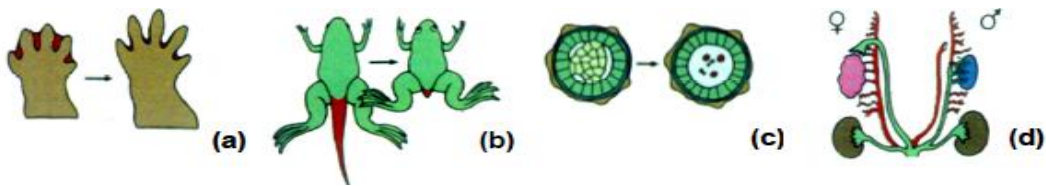
Hipotermi, hücredeki sodyum pompasının da (Na^+/K^+ ATPaz) fonksiyonunu bozmaktadır (37). Bunun sonucu olarak, hücre içinde aşırı Na^+ birikmekte ve hücre şişmektedir. Klinikte, hücre dışı bileşimindeki saklama çözeltileri ile (düşük K^+ , yüksek Na^+) reperfüzyon sırasında, sodyum pompasının fonksiyonunun daha iyi korunduğu görülmüştür (38).

Hücre içi Ca^{+2} yüklenmesi, hipotermi sırasında karşılaşılan bir başka önemli sorundur. Artmış sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu, ksantin dehidrogenaz enziminin ksantin oksidaza dönüşümünü hızlandırmakta bu durum mitokondri üzerinde serbest radikallerin zararlı etkisini potansiyelize etmektedir (32). Aynı şekilde esansiyel bir element olan demir de patolojik olaylarda veya stres durumlarında, oksidan yapımına katılabilmektedir. Demir, serbest demir lipid hidroperoksidlerinin dekompozisyonlarına ve glutatyonun non-enzimatik oksidasyonuna da yol açabilmektedir (39).

Hipotermik şartlarda tutulan akciğerlerin reperfüzyonundan sonra, hücrelerde apoptozis görülmektedir. Yapılan çalışmalarda tam fonksiyona sahip ve iyi bir klinik seyir gösteren insan akciğer transplantasyonlarında, 2 saatlik reperfüzyon içerisinde %30' a yakın apoptozis gözlemlendiği bildirilmiştir (40).

2.6. PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ (APOPTOZİS)

Normal koşullar altında zedelenmiş veya yaşlanmış hücreler, organizmanın hücresel homeostazının sağlanması için apoptozis olarak adlandırılan, iltihabi olmayan ve enerji gerektiren bir tür hücre ölümü ile kendilerini feda ederler (41). Apoptozis, fizyolojik hücre ölümünün en sık görülen formudur ve birçok mekanizmada kilit rol üstlenir. Apoptotik hücre ölümü, iskemik yaralanmayı ya da toksik hasarı takiben oluşanlardan farklı morfolojik değişikliklerle karakterize edilir. Apoptozis, programlanmış bir mekanizmadır ve embriyogenezis, immün repertuarının gelişimi ve iltihabi olayların çözülmesi gibi birbirinden farklı birçok süreçte istenmeyen hücrelerin yok edilmesi için gerekli bir olaydır (42). Apoptozis, tek bir hücrede büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni; Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapı 'zeiozis' olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (43). Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri, ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu, fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. (44).



Şekil.2.11. Farklı canlı ve yapılarındaki apoptozis kaynaklı değişimler. A)Parmak oluşumu sırasında aradaki mezeneşimal hücrelerin apoptozisi B)Amfibilerin kuyruk hücrelerinin apoptozis ile metamorfozu C)Bağırsak gibi lümenli organ oluşumunda D)Üreme organlarının oluşumunda (45).

Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen, programlı hücre ölümü hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Programlı hücre ölümü ile ölen hücreler, dokular tarafından etkin bir şekilde yok edilir. Buna karşın nekroziste, akut yaralanma sonucunda ölen hücreler, şişer ve patlar; hücre içerikleri dış ortama salınır ve inflamasyona neden olur (46).

Tablo.2.1. Nekrozis ve programlı hücre ölümünün karşılaştırılması. TNFR-1(Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü-1) (46).

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	- İskemi - Hipertermi - Hipoksi - Litik viral enfeksiyon - Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları - Şiddetli oksidatif stres	- Büyüme faktörü eksikliği - Hücre yaşlanması “Senescence” - HIV - Kanser ilaçları - Radyasyon - Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu - Sitotoksik T lenfositler - Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik özellikler	- Hücre membran bütünlüğünün kaybı - Kromatin “flocculation”u - Hücre şişmesi ve lizisi - Organellerin disintegrasyonu - Endoplazmik retikulumun dilatasyonu - Büyük vakuollerin oluşumu	- İntakt hücre membranı fakat membranda “bleb”lerin oluşumu - Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması - Organellerde disintegrasyon yok - Hücresinin intact mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	- Bozulmuş iyon hemostazisi - ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C’de gerçekleşebilir - DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde “smear” görüntüsü) - Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhasında)	- İyi kontrollu, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması - ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C’de gerçekleşmez - DNA internukleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonukleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven paterni) - Prelitik DNA fragmentasyonu(erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	- Hücreler gruplar halinde ölür - Fizyolojik olmayan(patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir - Lizozomal enzimler salınır - İnflamasyona neden olur	- Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür - Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir - Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler - İnflamasyon görülmez

Apoptozis temel olarak iki yolla başlatılır:

- 1) Hücre dışından tetiklenen, pozitif (TNF α varlığı) ya da negatif (TNF α yokluğu) ekstrinsek yol
- 2) Hücre içinde DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi ya da mitokondriden tetiklenen intrinsek yol.

Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol, aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortak kullanıldığı bir mekanizma oluşturur. İster hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apoptotik süreç “kaspazlar” adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Kaspazlar, bugüne dek bir düzine farklı türü tanımlanan, sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunan, aktif katalitik bölgesinde sistein olan ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen, proteaz enzimlerdir(**caspase**= cysteine-dependent **asp**artate spesifik proteases) (47).

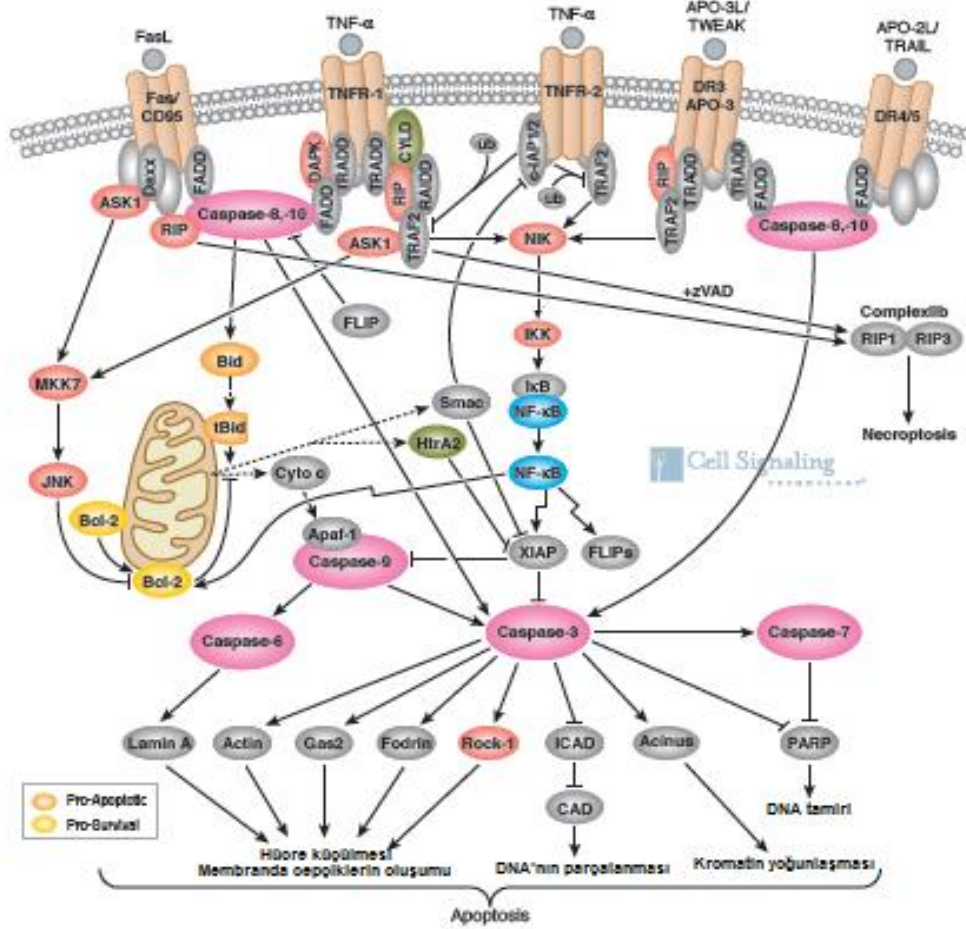
2.6.1. Mitokondriyal Yolak

Mitokondri, hücre içinde ATP üretiminin kaynağı olmasının yanı sıra, hücre içi ya da dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Mitokondri, iç ve dış zarla çevrili yapıdadır, bu zarlar tıpkı hücre zarında olduğu gibi bir zar potansiyeline sahiptir. Dış zar geçirgenliğindeki artış sonucu, mitokondri zarı potansiyeli bozulur, dış zarda hızlı bir şişmeyi takiben iki zar arasında bulunan çeşitli proteinler hücre sitoplazmasına çıkar. Bu proteinler arasında, sitokrom c ve endojen sitozolik apoptozis inhibitörlerinin antagonistleri bulunur. Hücrenin yaşamını sürdürmesi ile ölmesi arasındaki seçim; protipi Bcl-2 olan ve 20’den fazla protein içeren bir protein ailesi tarafından kontrol edilen, mitokondrilerin geçirgenlik derecesi ile belirlenir. Hücreler büyüme faktörlerinden, trofik hormonlardan yoksun kaldıklarında, DNA’yı zedeleyen ajanlarla karşılaştıklarında veya kabul edilemez düzeyde hatalı katlanmış protein içerdiklerinde, bir grup sensör aktifleşir. Sensörlerin Bcl-2 ailesinden olan bazıları, pro-apoptotik iki üyesi olan Bax ve Bak’ı aktifleştirir. Bunlar dimerize olur, mitokondriyal membranın yaprakları arasına girer ve sitokrom c ile diğer mitokondriyal proteinlerin sitozole geçebileceği kanallar meydana getirirler. İlişkili başka sensörler, anti-apoptotik moleküller olan Bcl-2 ve Bcl-X_L’i inhibe ederek aynı sonuca, mitokondrilerden sitozole protein geçişine katkıda bulunurlar. Sitokrom c, başka kofaktörlerle birlikte Kaspaz 9’u aktifleştirirken, başka proteinler de apoptozis

yapıya dönüşmesine yol açarlar ve hücre içinde “adaptör moleküller” adı verilen bir dizi molekülle etkileşerek, prokaspaz 8’i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz 8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7’nin bir zincir biçiminde aktiflenmesine yol açar. Aktiflenen tüm kaspazlar, hücre makromoleküllerini parçalayarak tipik apoptozis morfolojisinin oluşumuna yol açarlar. 6 Aktif kaspaz 8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid’in de proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar. Bid, mitokondriden sitokrom c, bazı başka proteinlerin (SMAC) ve kalsiyumun serbestlenmesine yol açar. Böylece ölüm reseptörleri yolu, mitokondriyal yolu da aktiflemiş olur (47).

Hücreye sitotoksik T reseptörleri yoluyla ulaşan Fas ligandı ya da $TNF\alpha$, hücre yüzeyinde bulunan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak, apoptozisi uyabilir. Fas reseptörünün ligandı, aktiflenmiş T lenfositlerde ayrıca dalak, testis, karaciğer ve böbrek hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir (50). Çeşitli virüslerle hücrelerin infekte olması ya da p53’ün aktiflenmesi sonucu Fas reseptörünün ifadesi, o hücrenin sitotoksik T lenfositler tarafından öldürülmesini sağlar. FAS ve $TNF\alpha$, dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de hücre içinde benzer yollarla ölümü uyabilir. TRAIL reseptörlerinin, FAS reseptöründen farklı olarak, karaciğer, nöronlar, miyositler, kolon, bronş epitel, Leydig hücreleri gibi dokularda yapısal biçimde ifade edildiği ve TRAIL in de bu dokularda bulunduğu gösterilmiştir (51).

Hücre dışından gelen sinyallerin, hücre içinde apoptotik mekanizmayı çalıştırmasına aracılık eden yollardan biri de sfingolipid yoludur. Sfingomiyelin, hücre zarının yapı taşlarından biridir. Radyasyon ve kemoterapinin yanı sıra, ölüm reseptörleri aracılığıyla da aktiflenebilen bir enzim olan sfingomiyelinaz tarafından seramid’e dönüştürülür. Seramid, ayrıca serin palmitol transferaz tarafından da sentezlenebilir. Seramid ve seramidaz enzimiyle seramidden oluşturulan sfingozin, Bid yapımını değişik yollarla arttırarak, mitokondriyal yol üzerinden apoptozisi tetikler (52).



Şekil.2.13. Ölüm reseptörü yolağı (49).

2.7. TGF SÜPERAİLESİ

TGF(Transforming Growth Factor): Dönüştürücü Büyüme Faktörü. Transforme hücreler tarafından sentezlenen, hücrelerin büyümesini sağlayan, polipeptid yapıda büyüme faktörleridir. Sitokinler olarak da isimlendirilirler. Alfa (α) ve Beta (β) olmak üzere 2 alt grubu bulunur (53).

2.7.1. TGF- α

TGF- α , uyarılmış makrofajlar, trombositler, keratinositler, beyin hücreleri ve vücuttaki diğer bazı hücrelerce sentezlenir. Yaklaşık 50 aminoasitlik yapısında 3 tane disülfid bağı içeren protein yapıda bir büyüme faktörüdür. TGF- α , Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) ile yaklaşık %30 yapısal benzerlik gösterir. EGF'nin daha otokrin çalışabilen bir varyantı olarak kabul edilebilir. Biyolojik etkilerini, EGF reseptörlerine bağlanarak gösterir. Mezenşimal, epitelyal, endotelyal hücre büyümesini ve endotel hücre kemotaksisini uyarır (54).

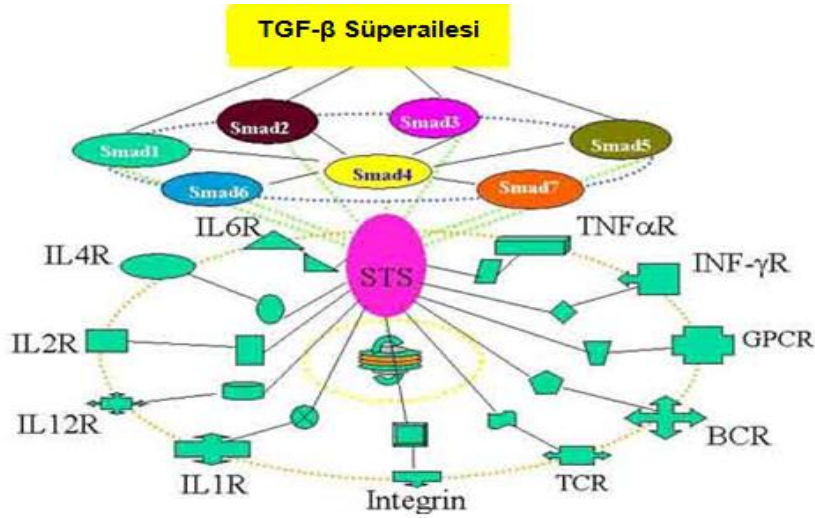
2.7.2. TGF- β

TGF- β , çok sayıda alt gruba sahip oldukları için süperaile olarak isimlendirilirler. TGF- β süperailesi polipeptid yapı gösteren hücre döngüsünün kontrolü, erken gelişimin düzenlenmesi, differansiyasyon, ekstrasellüler matriks oluşumu, hematopoezis, anjiogenezis, kemotaksis, immün fonksiyonlar, apoptozis gibi olaylarının düzenlenmesinde rol oynayan geniş dağılımlı multifonksiyonel bir sitokin ailesidir (55).

TGF- β , embriyoda gelişimi ve morfogenezisin oluşumunu korurken, erişkin dokularda homeostazisi sağlamaktadır (56). Özellikle epitelyum proliferasyonunu sınırlamak (sitostatik etki) ve farklılaşmayı indüklemek, primer fonksiyonlarından (57). TGF- β cevabında, hücre döngüsünün durdurulması, geç G1 fazında “restriksiyon noktasında” meydana gelir. Bunun nedeni, CDK (Cyclin dependent kinase)’ların inhibitörlerinin indüksiyonudur (58). Bununla birlikte, hücre büyümesi ve farklılaşmasını sağlayan transkripsiyon faktörleri (c-myc) ve hücre farklılaşmasını engelleyen faktörler de (örneğin; ID1,2,3) baskılanmaktadır (59). Bu baskılanma, Smad proteinleri ve transkripsiyon faktörleri ile birlikte sağlanır (58).

TGF- β sinyal yolundaki değişiklikler, insanda çeşitli somatik ve kalıtsal hastalıklar özellikle de kanserle ilişkilidir (57). TGF- β , Smad’lar ve bunların kofaktörleri ile beraber hücrelerde, tümör baskılayıcı ve hücre metabolizmasını düzenleyici etki gösterir. Ayrıca, kanserlerde tümör gelişimini indükleyici rol oynaması da insan sağlığı açısından önemlidir (58).

TGF- β süperailesinin omurgalılarda, 50 den fazla üyesi bulunmaktadır. Bunlardan bazıları; TGF- β , Aktivin, inhibin, Bmp, Glia hücre kaynaklı nörotrofik faktör (Glial cell line derived neurotrophic factor-GDNF), Müllerian inhibe Edici Madde (Mullerian inhibiting substance-MIS) gibi sıralanabilir (60). TGF- β süperailesi içinde ilk tanımlanan üye, normal sıçan böbrek hücrelerinden izole edilen, TGF- β ailesinin TGF- β 1 izoformu olmuştur. Bu moleküllerin ortak yapısal özelliği, sistin motifleri içermesidir (61).



Şekil.2.14. TGF-β Süper ailesinin sınıflandırılması (62).

Sinyal iletimi için Tip II reseptörlere bağlanmış ligand kompleksinin, tip I reseptörleri fosforile etmesi gerekmektedir. TGF-β sinyali için, bu fosforilasyon esastır. Çekirdeğe, sinyalin iletimi için Co-Smad'lar, R-Smad'lar ile heterooligomerler oluşturur ve birlikte çekirdeğe geçerler. Burada, transkripsiyonel faktörlerin yardımı ile DNA üzerindeki hedef gen bölgesine bağlanarak transkripsiyonel cevabı oluştururlar (63).

Transdermal growth faktör (TGF)- β 1'in İ/R ve akciğer tranplantasyonundaki önemi, IL-10 ile birlikte akut akciğer reddi ve reperfüzyon hasarını azaltmasının gösterilmesi ile gündeme gelmiştir (30).

2.8. Smad

Smad ailesi proteinleri, sinyal iletmeye kapasitesine sahip Tip I reseptör kinazların substratı olarak tanımlanmıştır. Reseptör sinyalinin, çekirdekteki hedef genlere iletilmesinde merkezi rol oynarlar (57).

Yapısal ve fonksiyonel etkenler göz önünde tutulduğunda, Smad'lar üç alt gruba ayrılır:

(a) Reseptör ile regüle edilen Smad'lar (R-Smad); TGF-β ailesi reseptör kinazlarının direkt substratlarıdır.

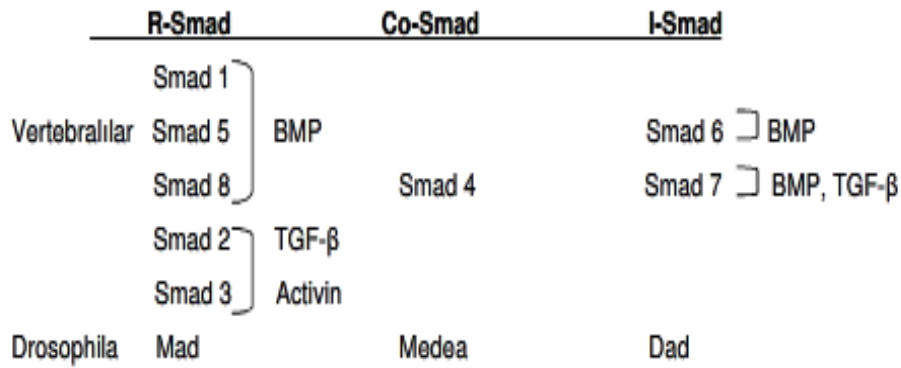
(b) Common-partner Smad'lar(Co-Smad); R-Smad'larla birleşerek sinyal iletimine katılan Smad'lar

(c) İnhibitör Smad'lar(I-Smad); R ve Co-Smad'ların sinyal fonksiyonunu inhibe eden antagonist Smad'lardır (64).

R-Smad'lar da kendi içlerinde iki gruba ayrılır.

1) Bmp Smad'lar: Bmp Smad'lar, Smad1 ve birbirine yakın homologlardan Smad5 ve Smad8, Bmpr-I'in (Bone Morphogenetic Protein Receptor-I) substratları ve Bmpsinyallerin aracılarıdır.

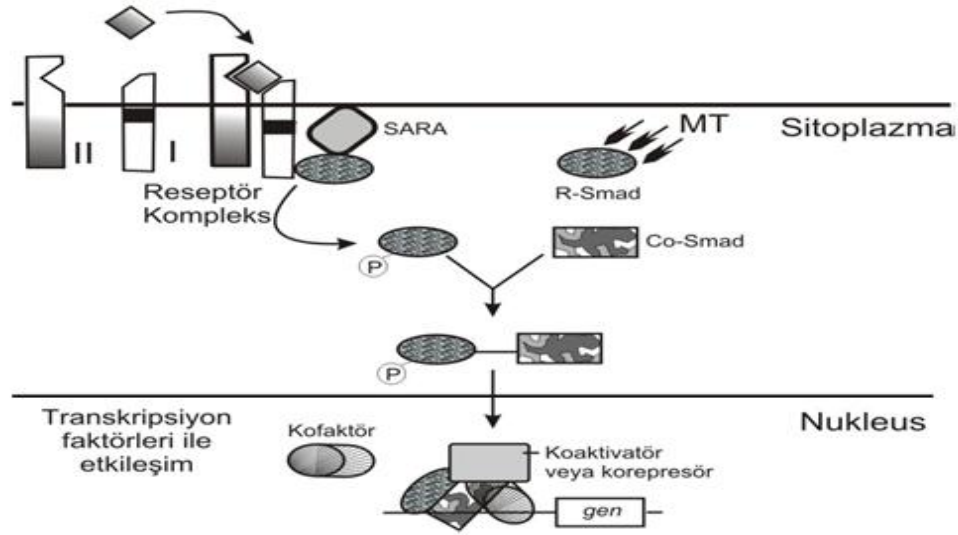
2) TGF- β /aktivin Smadlar: TGF- β /aktivin Smad'lar ise Smad2 ve 3, T β R-I'in substratları ayrıca TGF- β ve aktivin sinyallerinin aracılarıdır. Memeli epitel hücrelerinde Smad2 ve 3; gelişimin inhibisyonuna, haberci genlerden TGF- β ve aktivinin transkripsiyonuna aracılık ederler (65).



Şekil2.15. Smad proteinlerinin sınıflandırılması (66).

2.8.1. Smad Proteinleri Aracılığı İle Sinyal İletimi

Bazal kısımda Smad'lar, homo-oligomerler olarak bulunurlar. Ligandın bağlanmasıyla, reseptör kompleksinin aktivasyonundan sonra, tip I reseptör kinazlar spesifik Smad'ları fosforile ederler. Fosforile olan Smad'lar, daha sonra Smad4 ile birleşerek hücre çekirdeğine taşınırlar. Bu kompleksler, çekirdek içinde tek başına veya DNA-bağlanma altbirimi ile birleşik halde bulunabilirler; spesifik promotor elemanlarına bağlanarak, hedef genleri aktive ederler (60). Smad'lar, agonistlerinin uyarısıyla serin-fosforlarlar. Örneğin Smad1, Bmp2 veya 4'ün; Smad2, TGF- β veya aktivinin; ve Smad3, TGF- β 'nın uyarısı ile serin fosforlarlar (60).



Şekil.2.16. R- ve Co-Smad'ların aktivasyonu. Ligandın indüklediği heteromerik kompleks oluşumu, ve tip I ile tip II reseptörlerinin aktivasyonunun ardından, R-Smad'lar fosforlanır ve Co-Smad'lar ile heteromerik kompleks oluştururlar. Bu kompleks, hücre çekirdeğine taşınır, hücrenin çeşidine göre hedef genin ekspresyonu burada kontrol edilir. Aktive edilmemiş Smad'lar, mikrotübüllere(MT) birleşik olarak sitoplazma içinde tutulabilirler. SARA; reseptör aktivasyonu için Smad tutucu (64).

2.9. Bmp

Bmp'ler, yapısal özellikleri bakımından TGF- β ailesinde yer alan 15'den fazla farklı protein grubudur (67). İlk olarak 1965'de M. Urist tarafından, demineralize kemik matrisinin, kemik dışı bölgelere yerleştirildiğinde kemik oluşumunu indükleyici etkilerinin gösterilmesi ile tanımlanmışlardır (68). Bmp'lerin kemik, kıkırdak gibi mineralize dokuların gelişiminin yanı sıra embriyonik ve fetal gelişimde, böbrek, kalp gibi organların oluşum süreci üzerinde de etkileri vardır. Bmp'lerin; kemik ile kıkırdak dokularının, gelişim ve rejenerasyonlarındaki farklı aşamalarda belirgin etkileri vardır (69).

Kemik üzerindeki etkileri şu şekilde özetlenebilir:

- 1- Farklılaşmamış mezenşimal hücreler ve osteoprojenitör hücrelerin çoğalmasını, osteoblastlara farklılaşmalarını sağlarlar.
- 2- Osteoblast hücrelerinin alkalen fosfataz (ALP) ekspresyonunu arttırırlar.
- 3- Mezenşimal hücreler için kemoatraktandır ve bu hücrelerin tip 4 kollajene bağlanmalarını arttırırlar (67).

2.10. KASPAZLAR

Kaspazlar; bu ölüm proteazları, caspase (Sistein aspartatik asit proteazlar) olarak bilinen ve birbirleriyle homolog büyük protein ailesidir. Kaspazlar, proteolitik olarak bölünmesiyle aktifleşen, inaktif granüller olarak üretilir. Kaspazlar, apoptotik yolun cellatlarıdır ve apoptozdaki karakteristik değişikliklerin en önemli sebebidir (70). Apoptozis, gelişim sırasında ve normal hücrel homeostazisin sağlanmasında aktif rol oynarlar. Bir sistein proteaz olan kaspazlar, apoptozisin iç veya dış sinyallerle (DNA hasarı, UV vb.) uyarılması sonucu aktifleşerek, hücreyi geri dönüşümsüz bir yola sokarlar (71). Bu süreçte, kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek, proteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar. Bu mekanizma, hücre ölümü esnasında (fizyolojik veya orta şiddette zedelenme sonrası) yüksek oranda korunmakta ve zarar görmemektedir (72).

14 çeşit olan kaspazlar, apoptozisin farklı aşamalarında görev almaktadırlar. Kaspazların aktiviteleri, herhangi bir inhibitör tarafından engellenmediği sürece, hücre ölümünde aktif rol oynarlar (82).

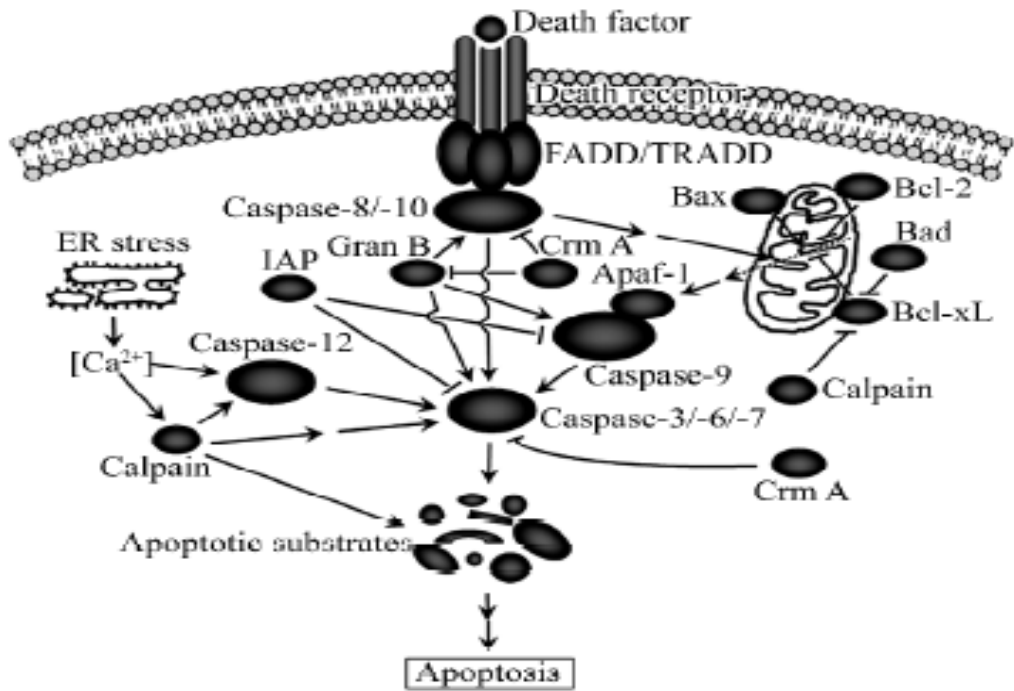
Başlatıcı kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9 ve 10. Başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini, efektör kaspazlara yani ikincil kaspazlara iletirler.

Etkili (Efektör) kaspazlar: Kaspaz 3, 6 ve 7. Efektör kaspazlar, ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri; aktin veya fodrin, nükleer membran proteini; lamin A, DNA tamirinde rol alan; poli (ADP-riboz) polimeraz(PARP)) parçalayarak, apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar.

Enflamatuvar kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14. Bunlar; lenfokin üretiminden sorumludur.

		Function
Caspase-1	119 297 317 404	Inflammation
Caspase-2	152 316 331 435	Apoptosis
Caspase-3	28 175 277	Apoptosis
Caspase-4	270 290 377	Inflammation?
Caspase-5	311 331 418	Inflammation?
Caspase-6	23 179 194 293	Apoptosis
Caspase-7	23 198 303	Apoptosis
Caspase-8	216 374 385 479	Apoptosis
Caspase-9	315 331 416	Apoptosis
Caspase-10	219 415 521	Apoptosis
Caspase-14	242	?

Şekil.2.17. Kaspazlar.



Şekil.2.18. Kaspaz kaskadı (73).

2.11. *Bcl* GEN AİLESİ

Bcl-2 geni, pek çok fizyolojik ve patolojik olayda, hücre ölümünün regülasyonunda kritik öneme sahiptir. *Bcl-2* ismi; ‘B-cell lymphoma/ leukemia-2’ geninden gelmektedir. İsminden de anlaşılacağı gibi bu gen ilk olarak, B hücreli malignansilerde keşfedilmiştir. Çoğunlukla folliküler non-Hodgkin B hücreli lenfomalarda bulunan *Bcl-2* genini aktive etmek için kromozomal bir translokasyon meydana gelir. Bu translokasyonla *Bcl-2* geni, normal kromozom lokalizasyonu olan 18q21’den 14q32’ye doğru taşınır. Bu translokasyon, *Bcl-2* geninin bozukluğuna ve *Bcl-2* mRNA’sının ve onun kodladığı proteinlerin aşırı üretimine neden olur. t(14;18)’in yalnızca malign lenfomalarda oluştuğu düşünülmesine karşın, benign folliküler hipertrofilerde azda olsa translokasyona uğramış kromozoma rastlanır. *Bcl-2* ekspresyonu; meme, prostat ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi hormonal, aktif epitelyum tümörleri gibi non-lenfoid tümörlerde de gösterilmiştir (73).

Bcl-2 geni, aynı adı taşıyan molekül ağırlığı 25 kD olan ve hidrofobik karboksil ucuyla intrasellüler membranlara yerleşen ve geri kalan kısmının sitozolde kaldığı bir membran proteinini kodlar. *Bcl-2* proteini, hücrenin dış membranında ayrıca nükleus membranı, endoplazmik retikulum ve mitokondriyal membranın iç kısmında antioksidan yol üzerinde lokalizedir (74).

Bcl-2’nin görevi; hücre ölümünü baskılamak ve bu yolla hücre proliferasyonunu etkilemeden yaşam süresini uzatmaktır. *Bcl-2* protein ekspresyonu, esansiyel büyüme faktörlerinin yokluğunda bile, hücrenin G₀ fazında kalarak yaşamının uzamasına ve böylece apoptotik hücre ölümünün inhibisyonuna neden olur (74). *Bcl-2* ile homolog sekansa sahip bir grup gen tariflenmiş ve bunlara *Bcl-2* gen ailesi adı verilmiştir. *Bcl-2* ailesi proteinler birkaç α -heliks yumağını içeren benzer protein yapısını paylaşır. Bunlar 4’e kadar numaralanan BH bölgesi olarak adlandırılır. *Bcl-2* ile ilgili proteinler, yapısal ve işlevsel durumlarına göre 3 grup altında sınıflandırılırlar (75):

1. *Bcl-2* alt grubu. *Bcl-2*, *Bcl-X_L* ve *Bcl-w*’den oluşur, dört bölgeleri (BH1, BH2, BH3, BH4) kuvvetli benzerlik gösterir. Hepsinin antiapoptotik aktivitesi vardır. Proteinin C ucundan zara tutunma bölgesi vardır ve mitokondri dış zarına yerleşirler.

2. *Bax* alt grubu. *Bax* ve *Bak*’dan oluşur. BH1, BH2 ve BH3 bölgelerinde *Bcl-2*’ye benzerlik gösterirler ve hepsi pro-apoptotiktir. Yapı olarak bazı bakteriyel toksinlerin

por oluşturan proteinlerine benzerlik göstermeleri, en azından kısmen hücre içi zarlarda(mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarı) kanallar oluşturma potansiyelleri olabileceğini düşündürür. Bax, difteri toksininin yapısal olarak tam benzeridir. Bu toksin, endozomal/lizozomal zarlarda mRNA çevirimi (translokasyon) baskılayıcı adenosin 5'-difosfat ribozile edici polipeptid A alt ünitesinin sitoplazmaya geçmesini sağlayacak büyüklükte kanallar oluşturarak hücreyi öldürür.

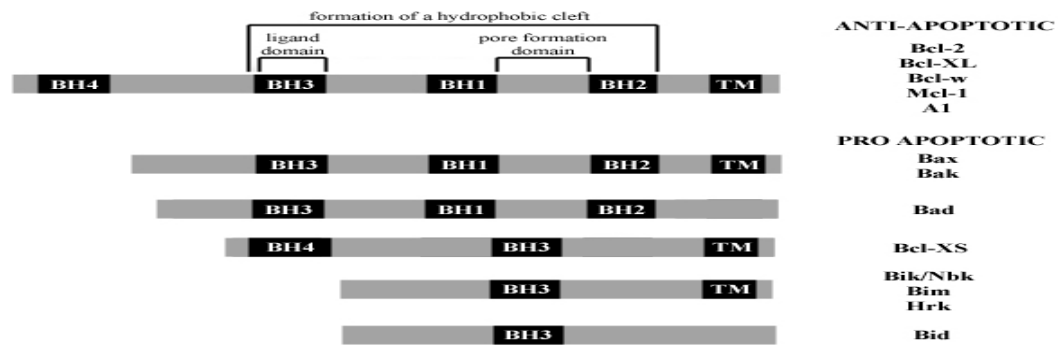
3) *Bik* alt grubu, proapoptotik. Bik, Bid ve Bim'den oluşur. Bunların sadece BH3 bölgeleri *Bcl-2*'ye benzerlik gösterdiğinden dolayı, BH3 proteinler olarak da adlandırılırlar. Belirgin özellikleri heterodimerlerle oluşturulmaları ve böylece eşlerinin aktivitelerinin düzenlenmesini sağlamalarıdır (76).

İnsanda en az 17 *Bcl-2* ailesi üyesi vardır. Bu ailedeki genler, fonksiyonel olarak antagonist iki gruba ayrılır:

Hücre ölümünü baskılayanlar: *Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *MCL-1*

Hücre ölümünü destekleyenler: *Bax*, *Bak*, *Bad*, *Bcl-X_s*.

Bcl-x, *Bcl-2*'ye fonksiyonel olarak benzemekle birlikte, farklı seri gösteren bir homologudur. *Bcl-x* aminoasitleri, %44 oranında *Bcl-2*'ye benzerlik gösterir ve gen ürünü iki şekilde bulunur. Bunlardan birincisi olan *Bcl-X_L*, 233 aminoasit içerir ve oldukça korunmuş BH1 ve BH2 bölgelerine sahiptir. Diğer *Bcl-X_s* olup, BH1 ve BH2'yi çevreleyen 63 aminoasidini kaybetmiştir. *Bcl-X_L*, *Bcl-2*'ye benzer ve pek çok sistemle apoptozisi inhibe eder. Diğer yandan *Bcl-X_s*, *Bcl-2* ve *Bcl-X_L*'nin koruyucu etkilerine zıt etki yapar. *Bcl-X_L*'nin fazla ekspresyonu, *Bcl-2*'de olduğu gibi, IL3 azalmasında bile hücreleri apoptosizden korur (73).



Şekil 2.19. *BCL* gen ailesi (77).

2.12. PDGF

2.12.1. PDGF Sentez ve Salınımı

PDGF'nin, hücrelerin çoğalmasını ve transformasyonunu sağladığı, apoptozisi düzenlediği ve doku yenilenmesi süresince fibroblastlar, kondrositler ve glia hücreleri gibi birçok hücre tarafından salındığı bildirilmiştir (78).

PDGF'nin bu hücrelerin yanı sıra trombositler başta olmak üzere makrofajlar, düz kas hücreleri, astrositler, endotel hücreleri, megakaryositler ve blastosist gibi embriyo hücreleri ile mesane kanseri, glioma, meme kanseri, lösemi, hepatoma ve kolon kanseri gibi çok sayıda tümör hücreleri tarafından da üretimi gerçekleştirilmektedir (79).

2.12.2 PDGF İzoformları

2.12.2.1. PDGF-A

PDGF-A zincirini kodlayan gen, kromozom 7 üzerinde lokalize olmuştur (80). *PDGF-A*; 2,1 veya 2,4 kb uzunlukta mRNA üreten, 196 ve 211 aminoasit polipeptid zincirlerini kodlayan iki farklı uçları birbirine eklenmiş bir şekilde meydana gelir. *PDGF-A* zinciri, farklı uçların birbirine eklenmesinin bir sonucu olarak, kısa ve uzun olmak üzere iki farklı yapıda görülür (81). *PDGF-A* geni, 7 ekzona sahiptir. Ekzon 1, sinyal uçları kodlar. Ekzon 2 ve 3, gelişim süresince haberci uçları taşıırken, ekzon 4 ve 5, olgun *PDGF-A* proteinlerinin çoğunu kodlar. Ekzon 6, C-terminal ucu kodlar.

PDGF-A, fibroblastlar, astrositler, damar düz kas hücreleri, makrofajlar ve epitel hücreleri gibi birçok hücre tipi tarafından sentezlenir (82). Organlarda ise, kalp, pankreas ve iskelet kaslarında en yüksek değerlerde bulunur (83).

2.12.2.2. PDGF-B

PDGF-B zincir gen üretimi, kromozom 22 üzerinde lokalize olmuştur (84). *PDGF-B* geni; 3,5 kb uzunlukta mRNA üretir ve 241 aminoasit uzunlukta bir protein zincir kodlar. Bu gen, yapı olarak *PDGF-A* ile aynıdır. Fakat, ekzon 2 ve 3'ün N-terminal ucu kodlanması ve ekzon 7'nin tamamıyla kodsuz olması gibi bazı farklılıklar gösterir (85). *PDGF-A* ve *PDGF-B* hücrede endoplazmik retikulumda disülfid bağlı dimerlerde toplanır ve haberci moleküller gibi sentezlenir fakat aktifleşmezler (79).

PDGF-B de *PDGF-A* gibi damar düz kas hücreleri, makrofajlar ve fibroblastlar gibi birçok hücre tarafından sentezlenir. Organlarda salınımı ise plasenta ve kalpte bildirilmiştir (83).

2.12.3. PDGF'nin Fizyolojik Fonksiyonları

PDGF; büyümeyi arttırıcı, kemotaksis, dokuların şekillenmesi, yara iyileşmesi, anjiyogenezis ve iskelet kas rejenerasyonları gibi birçok önemli fonksiyonlara sahiptir. Bunun yanında, artritis, arthelerosclerosis, kemik iliği fibrozlarını içeren patolojik durumlarda PDGF'nin düzenleyici rolleri vardır (86).

Erken embriyonik dönemde, PDGF'ler mitojenler gibi iş görerek farklılaşmamış mezenşim hücrelerinin ve bazı progenitör hücrelerin çoğalmasını sağlarlar. Sonraki dönemlerde ise, doku şekillenmesi ve hücrelerin farklılaşmasında etkilidirler (87). Örneğin, PDGF-A/PDGFR- α sinyali akciğer, deri, barsaklar, kıl folikülleri, testis ve böbreklerde intersitisyel hücre çoğalmasında önemli role sahiptir. PDGF-B/PDGFR- β sinyali, perivasküler hücrelerin bir araya gelmesinde önemli rol oynar. Örneğin, böbrekte filtrasyon ünitelerinin oluşmasında, glomerüler kapillerlerin gelişimi, PDGFR- β pozitif mezenşimal hücrelere bağlıdır. Ayrıca PDGFR- β , bütün kasların gelişiminden de sorumludur (88).

2.13. FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRLERİ (Fibroblast Growth Factors, FGFs)

Olipeptit büyüme faktörlerinin büyük bir ailesini oluşturmaktadırlar. FGFs, değişik organizmalarda (hematodlardan insanlara kadar geniş bir yelpazede) bulunurlar (89). FGFs çeşitli mezoderm ve nöroektoderm'den türeyen hücreler(fibroblastlar, osteoblastlar, düz kas hücreleri, endotel hücreler, kondrositler, melanositler gibi) için kuvvetli mitojenik aktiviteleri, nörotropik özellikleri ve heparin bağlama özellikleri ile karakterize edilmişlerdir (90).

Çok bilinen iki FGFs, izoelektrik noktalarının(pI) farklı olması nedeni ile birbirinden ayırt edilmiştir. Asidik FGF(aFGF, FGF-1; 15 kDa)'nin pI 4.5-6, bazik FGF(bFGF, FGF-2)'nin ise pI 9.6-9.8'dir. Bu iki büyüme faktörü % 55 sıra benzerliğine sahiptir (91).

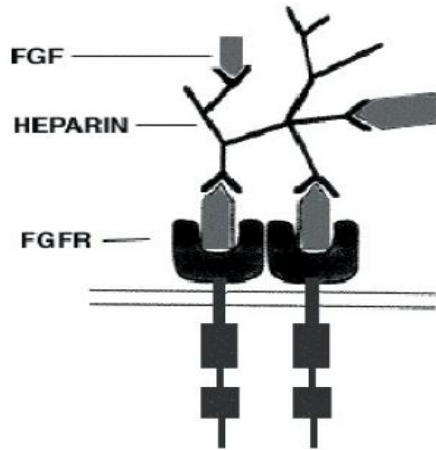
2.13.1. bFGF'nin Moleküler Yapısı ve Gen Yapısı

Çeşitli uzunluklarda insan bFGF vardır; dokulardan ilk izole edilen baskın formu 146 amino asit dizisi(Pro1-Ala-Leu.....-Ser146) içeren ve N(azot) ucundan en az 11 amino asit dizisi (Gly-Thr-Met-Ala1-Ala2-Gly3-Ser4-Ile5-Thr6-Thr7-Leu8) kadar uzatılabilen şeklidir (92).

Genom taraması ile birçok *FGF* geni bulunmuştur. İnsanda 22 tane *FGF* geni tanımlanmıştır (89). bFGF'yi kodlayan, *FGF-2* geni insanlarda; 4. kromozom, q26-q27 bandı üzerinde lokalize olmuştur (89).

2.13.2. FGFs Reseptörleri

bFGF veya aFGF'ye cevap veren tüm hücre tipleri spesifik FGF hücre yüzey reseptörleri taşımaktadırlar. bFGF yüksek (FGFRs, tirozin kinaz(TK) aktiviteli FGF reseptörleri) ve düşük afiniteli reseptörlere (HSPG) bağlanmaktadır (93). FGFs'nin reseptöre bağlanması ile reseptörler dimerize olmakta ve bunun sonucunda tirozin kinaz aktivitesi gerçekleşmektedir. Bu kinazlar birbirlerini fosforilleyerek, sinyal iletimini başlatmaktadırlar (94).



Şekil 2.20. Heparin tarafından arttırılmış reseptör dimerizasyonu ve aktivasyonu

2.13.3. Biyolojik Aktiviteleri

bFGF; çok sayıda hücre, doku, organ sistemlerinin fonksiyon ve gelişiminde etkili olan bir büyüme faktörüdür. bFGF, öncelikle fibroblastik hücreler için mitojenik bir faktör olarak tanımlanmıştır. bFGF, dokuların rejenerasyonunda etkilidir (95).

TABLO 2.2. Farklı organ sistemleri üzerinde bFGF'nin fonksiyonları (95).

Organ	Fonksiyonlar
Beyin	Sinir hücre farklılaşması ve yaşaması
Kan Damarı	Damar gelişimi (anjiogenez), düz kas hücre çoğalması atherogenez, kan basınç kontrolü
Akciğer	Nefes yollarının morfojenezi, fibrozit
Kol ve bacaklar	Kol ve bacak gelişimi
Kas	Miyojenez
Kemik	Kemik iyileşmesi, kırık dokunun oluşumu
Hematopoez	Granülositlerin oluşum ve gelişimi, megakaryosit oluşumu ve kök hücre yaşamının uyarılması
Üreme sistemi	Spermatojenez
Göz	Fotoreseptör yaşamı
Deri	Melanojenezi, doku tamiri, keratinosit morfojenezi

Endotel hücre çoğalması, göç etmesi ve yeni kan damarı oluşumunun uyarılması, bFGF'nin en iyi karakterize edilen fonksiyonlarıdır (96). bFGF; nöronlar, hipokampus, striatum, spinal kord, serebellum ve parasempatik gangliyonlar üzerinde tropik etkiye sahiptir. Mitoz sonrası farklılaşmış nöronların yaşamını arttırır (97). Nöronları serbest radikallere, nitrik okside, hipoglisemiye, eksitator aminoasitlere (glutamik asit) ve oksijensizliğe karşı korur (98). SSS yaralanmaları sonrasında, sistemin rejenerasyonunda bFGF önemli bir rol oynamaktadır (99). bFGF, beyni geçici ve devamlı iskemiye karşı korur (98).

3. MATERYAL – METOD

3.1. Deney Hayvanları

Deneylerde Gaziantep Üniversitesi hayvan bakım ve üretim ünitesinde üretilmiş olan, ortalama ağırlıkları 250-300 gr. arasında değişen, 40 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Denekler $21\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında 12 saat aydınlık 12 saat karanlık periyodunda bırakılarak senkronize edildi. Beslenmelerinde standart laboratuvar hayvan yemi ve içebilecekleri kadar musluk suyu verildi. Çalışma için, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 27.02.2012 tarihli 27.02.2012/9 karar numarası ile onay alındı.

Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Deney Hayvanları Laboratuvarında yapıldı. Histopatolojik incelemeler; Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. RNA izolasyonu ve RT-PCR çalışmaları, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Eğitim ve Araştırma Hastanesi Moleküler Genetik Tanı Laboratuvarında yapıldı.

3.2. Kimyasal Maddeler ve Hazırlanışları

- 35 mg/kg Ketamin(Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye)
- 5 mg/kg Ksilazin(Rompun, Bayer, Türkiye)
- %10'luk Povidon-iyot solüsyonu(Batticon, Adeka)
- Heparin 5000 İÜ/ml (Nevparin, Mustafa Nevzat, İstanbul, Türkiye), 1/10 oranında % 0.9 NaCl ile dilüe edilerek kullanıldı.

3.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Solunum pompası (SAR-830, IITC Life Science, Kaliforniya, A.B.D.)
- Qiagen TissueLyser LT (Katalog No. 85600, Poison Information Center Mainz, Germany)
- Cerrahi malzeme (makas, pens, v.b.) (Aygün A.Ş., Samsun, Türkiye)
- Thermal Cycler (Applied Biosystem GeneAmp® PCR System 9700 PCR)
- Gradient PCR (Corbett Research Model: RG-600, Avustralya)

3.4. Kullanılan kitler

- Roche High Pure RNA Tissue Kit (Katalog No. 12 033 674 001, Mannheim, Germany)
- Ipsogen Kit
- QIAzol Lysis Reagent (Katalog No:79306)
- RT-PCR Kit

3.5. Deneysel Protokol

Çalışmada sıçanlar, 4 gruba ayrıldı. Kayıpların olma ihtimali ve istatistiksel anlamlılık göz önünde bulundurularak her grup 10 sıçandan oluşturuldu.

Grup 1: Kontrol grubu. Göğüs kafesi açılarak, iskemi oluşturulmadan sadece akciğerler çıkarıldı.

Grup 2: 60 dk akciğer iskemisi

Grup 3: 60 dk akciğer iskemisi + 2 saat reperfüzyon

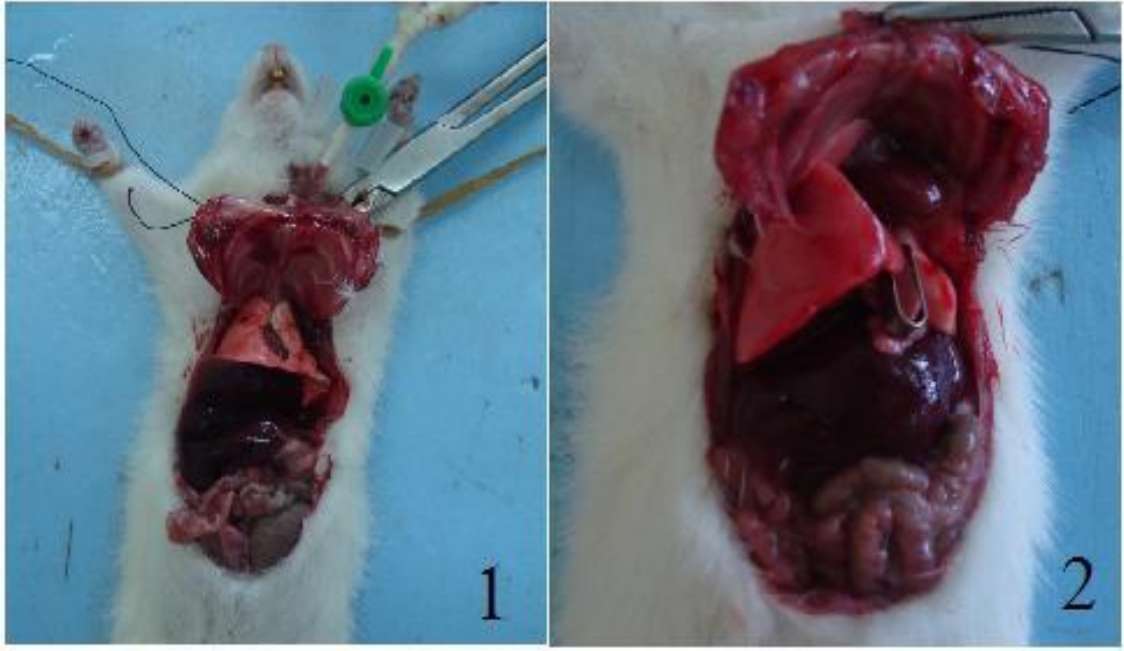
Grup 4: 60 dk akciğer iskemisi + 4 saat reperfüzyon sonrası akciğerleri çıkarıldı.

Çalışma sırasında sıçanların sol akciğerinde iskemi/reperfüzyon(İR) işlemi yapılırken, aynı sıçanın sağ akciğeri ise kontrol olarak alındı. Böylelikle İ/R oluşturulan kısım ile sağlam dokunun birbirinin kontrolü olarak değerlendirilmesi sağlandı.

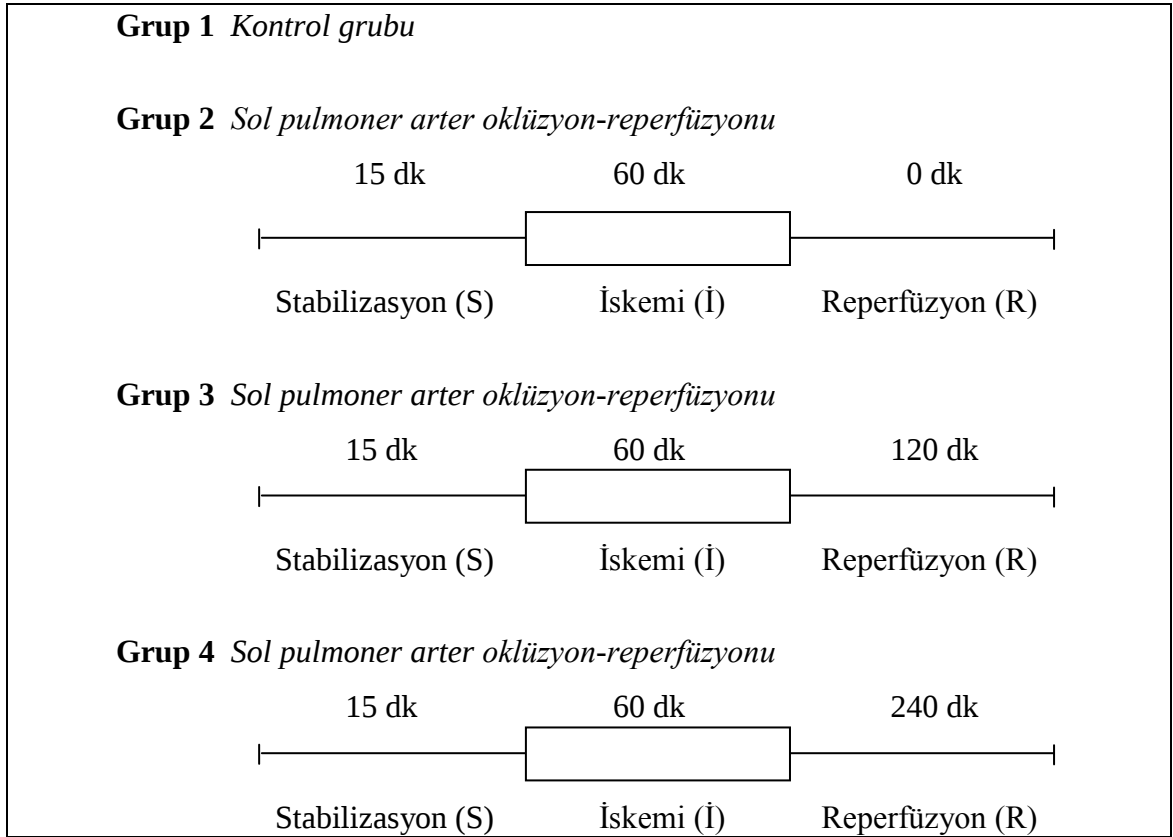
Alınan patolojik ve normal dokuların, hem ışık mikroskopunda iskemi durumları hem de moleküler analiz değerlendirmeleri yapıldı. Bu amaçla dokularda mRNA ekspresyonu, RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR(Reverse Transcriptase – PCR) yapıldı. PCR sonucu çıkan bulgular, histopatoloji olarak birbiriyle kıyaslanarak, hangi apoptotik genin ekspresyonunun arttığı veya azaldığına karar verilmesi planlandı.

3.6. Yöntem: Akciğer İ/R Modeli

Deneklerin anestezisi 35 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg Ksilazin anestezisi intraperitoneal(ip) olarak uygulandı. Cilt kesisinin ardından bez ve yağ dokusu ayrılarak, kas tabakaları açılmış ve trakea izole edilmiştir. Trakea'ya endotrakeal tüp yerleştirilmiştir. İ.v. 200 IU/kg dozda heparin (klemp takılması nedeniyle damarda olabilecek trombozu engellemek amacıyla) verilen denekler, trakea kanülasyonu ile solunum pompasına bağlanmış ve 70 kez/dk olacak şekilde oda havası ile solumaları sağlanmıştır (100). Göğüs kafesi tıraş edilip, kesi alanı göğüs orta çizgisi antiseptik özellikteki %10'luk povidon-iyot solüsyonu ile muamele edildi. Kesi; manubrium sterni'den, ksifoide kadar yapıldı. Plevral zar dikkatlice sıyrılarak, akciğerlerde sol pulmoner arter(SPA) izole edildikten sonra, atravmatik klemp takılarak, 60 dk sol akciğer iskemisi sağlandı. Klemp uygulaması sonrasında, sol akciğerde renk değişikliği gözlemlendi. Tüm gruplarda 60 dk iskemi süresince, açıkta kalan bölgelere, ılık serum fizyolojik ile ıslatılmış spanç konuldu. Bütün deneylerde cerrahi işlemlerin ardından deney protokollerine geçiş öncesi, stabilizasyon için 15 dk beklenildi. İskemi/reperfüzyon sırasında sıçanlar moniterize edildi ve normal vital fonksiyonlarının devam etmesi sağlandı. İskemi sonunda klemp çıkartılarak, iskemik bölgenin reperfüzyonu sağlandı. Her grupta, protokol uygulamasının sonunda, klemp uygulaması yapılan sol akciğer dokusu ile kontrolü olarak sağ akciğer dokusu alındı. Alınan akciğer dokusu bisturi yardımıyla 2'ye kesildi. Bir parçası histopatolojik inceleme için %10 luk formalin solüsyonuna konuldu. Diğer parçası ise RNA izolasyonu yapılincaya kadar -80 °C de saklandı. Denekler, intrakardiyak yolla kanları alınarak kurban edildi.



Resim 3.1. iskemi modeli. Kesi, manubrium sterniden ksifoide kadar yapıldı (1). Akciğerlerde sol pulmoner arter(SPA) izole edildikten sonra klemp takılarak 60 dk iskemi sağlandı (2).



Şekil 3.1. Deneysel protokol

3.7. Akciğer Histopatolojik Preparatlarının Hazırlanması

Histopatolojik analiz için; %10'luk formalin içinde tespit edilen akciğer örnekleri fiksasyon sonrası rutin histolojik parafin takip metodu kullanmak için alkol ve ksilen serilerinden geçirilmek suretiyle parafine gömüldü. Parafin bloklara gömülen dokulardan mikrotom yardımı ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler, Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenerek fotoğrafları çekildi.

3.8. RNA İzolasyonu

İ/R deney süresi sona erdiğinde, her bir gruba ait sıçanların her iki akciğer dokusu hızlı bir şekilde çıkarıldı. RT-PCR çalışmaları için dokular -80 °C muhafaza edildi.

RNA izolasyonu aşamasında dokuların parçalanması ve homojenizasyonu için Qiagen TissueLyser LT (Katalog No. 85600, Poison Information Center Mainz, Germany) cihazı ve QIAzol Lysis Reagent kiti kullanıldı. İzolasyon aşaması için Roche High Pure RNA Tissue Kit (Katalog No. 12 033 674 001, Mannheim, Germany) kullanıldı. RNA izolasyon işlemi üretici firmanın talimatları doğrultusunda yapıldı.

3.8.1. Dokuların homojenizasyon işlemi

2 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin içine 1 adet çelik bilye konuldu ve 15 dk. boyunca kuru buzda bekletildi.

30 mg dondurulmuş veya hazır doku örneği önceden soğutulmuş olan mikrosantrifüj tüplere kondu ve yine 15 dk. boyunca kuru buzda bekletildi.

Mikrosantrifüj tüpleri TissueLyser LT adaptör kısmına yerleştirilerek 2 dk. boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

2 dk. sonunda mikrosantrifüj tüplerinin içerisinde bulunan dokuların üzerine parçalama solüsyonu (Lysis Buffer) olarak 350 µl QIAzol Lysis Reagent'dan konuldu.

Mikrosantrifüj tüplerinin kapakları ve adaptör kısmının kapakları kapatıldı. 50 Hz. (Hertz)' de 5 dk. boyunca dokuların parçalanması sağlandı.

Santrifüj sonunda dokular homojenize olmuş şekilde izolasyon aşaması için hazır duruma getirildi.

3.8.2. Homojenize olmuş doku örneklerinin izolasyon işlemleri

Homojenize olmuş doku örnekleri, maksimum hızda (13.040 rpm) 1 dk. boyunca santrifüj edildi ve santrifüj sonunda üstteki supernatan kısmı 1,5 ml.'lik ependorf tüplere alındı.

Supernatan kısmın üzerine 350 µl %70'lik ethanol eklendi ve iyice karışması için vorteks yardımı karıştırıldı. Supernatan ethanol karışımı altında toplama tüpleri bulunan filtreli tüplere alındı.

30 sn. boyunca 13.040 rpm hızda santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki toplama tüpleri (Collection Tube) yenisi ile değiştirildi.

Daha sonra her doku örneği için 90 µl DNase Incubation Buffer ve 10 µl DNase I karışımı filtreli tüplere dağıtılarak 15-25 °C'de 15 dk. inkübasyon gerçekleştirildi.

İnkübasyon sonunda 500 µl yıkama solüsyonu (Wash Buffer I) filtreli tüplere eklendi ve 15 sn. 8.460 rpm hızda santrifüj edildi ve santrifüj sonunda toplama tüpü yenisi ile değiştirildi.

Daha sonra 500 µl yıkama solüsyonu (Wash Buffer II) filtreli tüplere eklendi ve 15 sn. 8.460 rpm hızda santrifüj edildi ve santrifüj sonunda toplama tüpü yenisi ile değiştirildi.

Son yıkama işlemi için 300 µl yıkama solüsyonu (Wash Buffer II) filtreli tüplere eklendi ve 2 dk. 13.040 rpm hızda santrifüj edildi.

Santrifüj sonunda filtreli tüpler 1,5 ml.'lik ependorf tüplere alındı. Filtreli tüp üzerine, 70 µl Elution Buffer eklendi ve 1 dk. 8.460 rpm hızda santrifüj edildi.

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

3.9. RNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

RNA miktarını ve saflığını belirlemek amacıyla 995 µl distile su + 5 µl RNA olacak şekilde karıştırıldı ve spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda optik dansite ölçülerek hesaplandı (101).

3.10. cDNA Sentezi

cDNA sentezi için, aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi toplam hacim 25 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlandı ve cDNA sentez işlemi aşağıdaki koşullarda gerçekleştirildi. cDNA sentezi için Ipsogen Kit kullanıldı.

Tablo 3.1. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği

Karışım	Miktar(µl)
5X Buffer RT	5
dNTP	2
Random-dT Primer	5.25
RNase	0.5
Reverse Transcriptase	1
ddT	1.25
RNase Free Water	5
RNA	5
TOPLAM	25

cDNA tepkime koşulları;

25° C’de 10 dk

50° C’de 60 dk

85° C’de 5 dk

+4° C’de 5 dk

Uygulanan karışım ve tepkime koşulları sonucunda RNA’ dan cDNA elde işlemi tamamlanmış oldu. Elde edilen cDNA’lar -20 °C de saklandı.

3.11. Primer Dizilerinin Hazırlanması

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan gen bölgelerine ait primer dizi bilgileri

GEN	DİZİ
<i>Smad-1</i>	Sense: 5' - CCGCCTGCTTACCTGCCTCCTGAA-3'
	Anti-sense: 5' - GAACGCTTCGCCCACACGGTTGT-3'
<i>Bmp-2</i>	Sense: 5' -AAGGCACCCTTTGTATGTGG-3'
	Anti-sense: 5' - CATGCCTTAGGG"ATTTTGGA-3'
<i>CASPASE-3</i>	Sense: 5' -GACTGCGGTATTGAGACAGA-3'
	Anti-sense: 5' - CGAGTGAGGATGTGCATGAA-3'
<i>Bcl-X_L</i>	Sense: 5' -AGGCTGGCGATGAGTTTGAA-3'
	Anti-sense: 5' -TGAAACGCTCCTGGCCTTTC-3'
<i>β-Aktin</i>	Sense: 5' -AGGCCAACCGTGAAAAGATG-3'
	Anti-sense: 5' -ACCAGAGGCATACAGGGACAA-3'
<i>b-FGF</i>	Sense: 5' -GGCTATGAAGGAAGATGGAC-3'
	Anti-sense: 5' - GTTCGTTTCAGTGCCACA-3'
<i>PDGFR</i>	Sense: 5' -GTCCAGGTGAGGTTAGAGG-3'
	Anti-sense: 5' - CACGGAGGAGAACAAAGAC-3'
<i>TGF</i>	Sense: 5' -GCTAATGGTGGACCGCAACAAC-3'
	Anti-sense: 5' -CAGCAGCCGGTTACCAAG-3'

3.12. RT-PCR(Revers-Transkriptaz PCR)

RT-PCR aşamasından önce analizi yapılacak genlerin primerlerinin dizaynı sonucunda elde edilen %GC, T_m(Melting Temperature-Erime sıcaklığı) ve her gene ait baz uzunluk değerleri göz önünde bulundurularak, her gen bölgesine özgü, optimum PCR şartları belirlendi. Optimum şartların belirlenmesi için yapılan Gradient PCR aşaması, Corbett Research (Model: RG-600, Avustralya) ile gerçekleştirildi. Her gene ait belirlenen PCR koşulları ise Applied Biosystem GeneAmp® PCR System 9700 PCR cihazı ile gerçekleştirildi. Her gene ait PCR koşulları aşağıda gösterilmiştir.

3.13. Gen Bölgelerinin Çalışma Koşulları

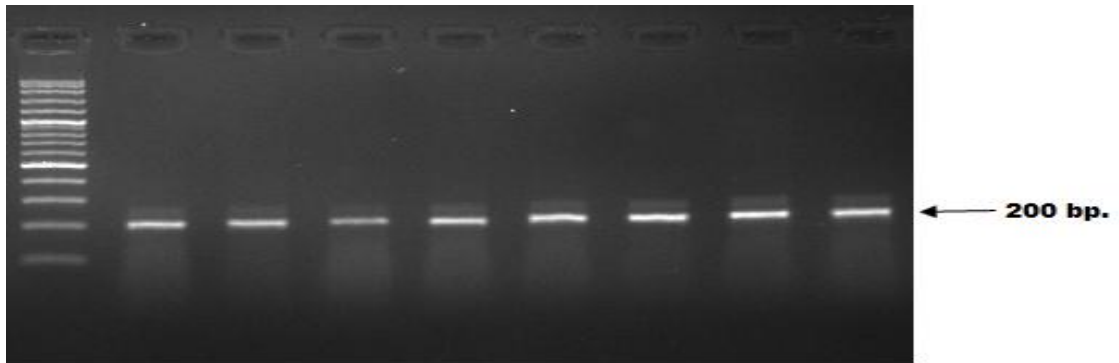
3.13.1. *Smad-1*

Tablo.3.3. *Smad-1* genine ait RT-PCR karışım içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
ddH ₂ O	16,8
10x Buffer	2,5
MgCl ₂	1,0
dNTPs	2,0
Forward Primeri	0,3
Revers Primeri	0,3
Taq DNA Polimeraz	0,1
cDNA	2,0
Toplam	25

Tablo.3.4. *Smad-1* genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	3 dk.	1
2.denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma (Annealing)	71	45 sn	
Uzama (Elongation)	72	30 sn	
Son Uzama (Final Elongation)	72	2 dk	1



Resim.3.2. *Smad-1* genine ait Gradient PCR sonuçları

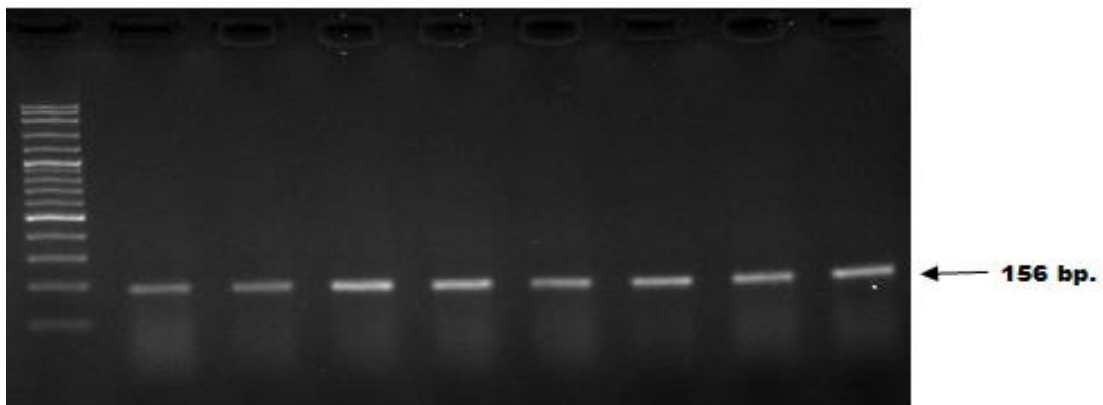
3.13.2. *Bmp-2*

Tablo 3.5. *Bmp-2* genine ait RT-PCR karışım içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
ddH ₂ O	16,8
10x Buffer	2.5
MgCl ₂	2,5
dNTPs	1,5
Forward Primeri	0,3
Revers Primeri	0,3
Taq DNA Polimeraz	0,1
cDNA	1,0
Toplam	25

Tablo 3.6. *Bmp-2* genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	4 dk.	1
2.denatürasyon	94	45 sn	35
Bağlanma (Annealing)	60	30 sn	
Uzama (Elongation)	72	30 sn	
Son Uzama (Final Elongation)	72	2 dk	1



Resim 3.3. *Bmp-2* genine ait Gradient PCR sonuçları

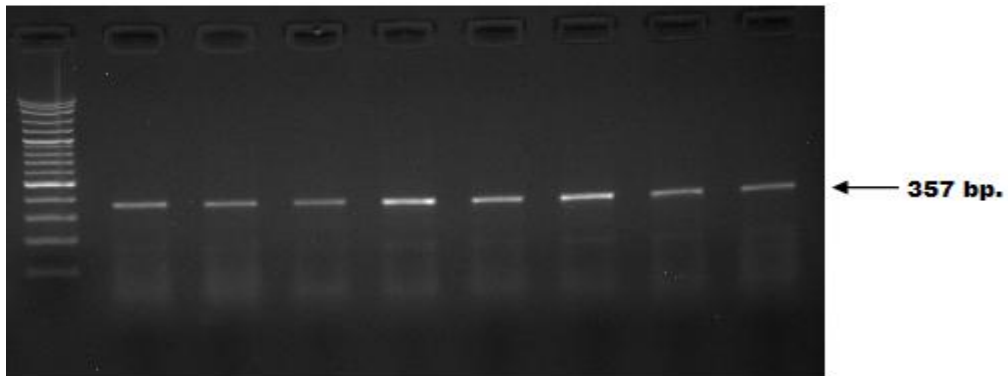
3.13.3. *Bcl-X_L*

Tablo 3.7. *Bcl-X_L* genine ait RT-PCR karışım içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
ddH ₂ O	15,8
10x Buffer	2,5
MgCl ₂	1,5
dNTPs	2,5
Forward Primeri	0,3
Revers Primeri	0,3
Taq DNA Polimeraz	0,1
cDNA	2,0
Toplam	25

Tablo 3.8. *Bcl-X_L* genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	4 dk.	1
2.denatürasyon	94	45 sn	35
Bağlanma (Annealing)	60	30 sn	
Uzama (Elongation)	72	30 sn	
Son Uzama (Final Elongation)	72	2 dk	1



Resim 3.4. *Bcl-X_L* genine ait Gradient PCR sonuçları

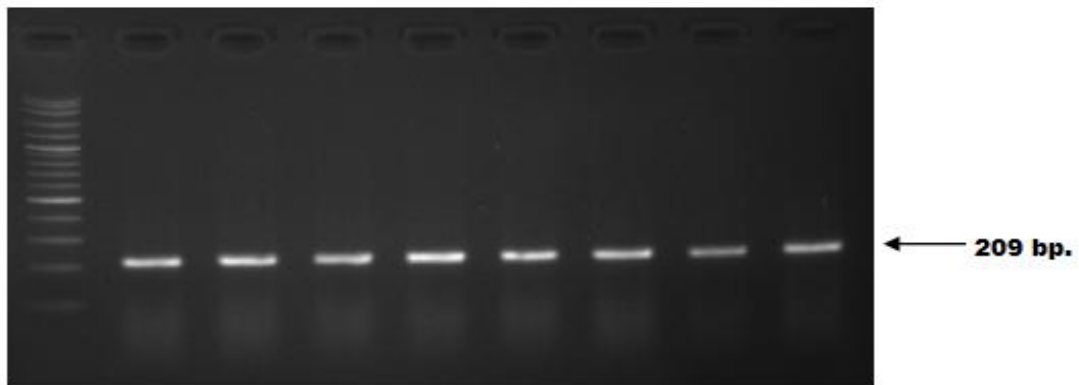
3.13.4. Caspase-3

Tablo 3.9. Caspase-3 genine ait RT-PCR karışım içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
ddH ₂ O	15,6
10x Buffer	2,5
MgCl ₂	2,0
dNTPs	2,0
Forward Primeri	0,4
Revers Primeri	0,4
Taq DNA Polimeraz	0,1
cDNA	2,0
Toplam	25

Tablo 3.10. Caspase-3 genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	3 dk.	1
2.denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma (Annealing)	59,1	45 sn	
Uzama (Elongation)	72	30 sn	
Son Uzama (Final Elongation)	72	2 dk	1



Resim 3.5. Caspase-3 genine ait Gradient PCR sonuçları

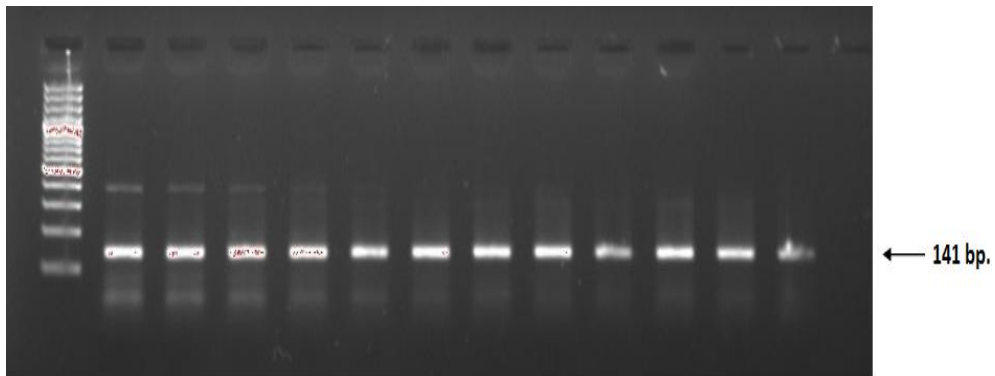
3.13.5. *bFGF*

Tablo 3.11. *bFGF* genine ait RT-PCR karışım içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
ddH ₂ O	16,9
10x Buffer	2.5
MgCl ₂	1,5
dNTPs	1,0
Forward Primeri	0,5
Revers Primeri	0,5
Taq DNA Polimeraz	0,1
cDNA	2,0
Toplam	25

Tablo 3.12. *bFGF* genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	5 dk.	1
2.denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma (Annealing)	60	30 sn	
Uzama (Elongation)	72	30 sn	
Son Uzama (Final Elongation)	72	2 dk	1



Resim 3.6. *bFGF* genine ait Gradient PCR sonuçları

3.13.6. *PDGFR-α*

Tablo 3.13. *PDGFR-α* genine ait RT-PCR karışım içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
ddH ₂ O	15,8
10x Buffer	2,5
MgCl ₂	2,0
dNTPs	2,0
Forward Primeri	0,3
Revers Primeri	0,3
Taq DNA Polimeraz	0,1
cDNA	2,0
Toplam	25

Tablo 3.14. *PDGFR-α* genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	3 dk.	1
2.denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma (Anneling)	59,1	30 sn	
Uzama (Elongation)	72	30 sn	
Son Uzama (Final Elongation)	72	2 dk	1

3.13.7. *TGF*

Tablo 3.15. *TGF* genine ait RT-PCR karışım içeriği.

Karışım	Miktar (µl)
ddH ₂ O	15,1
10x Buffer	2,5
MgCl ₂	2,0
dNTPs	2,0
Forward Primeri	0,4
Revers Primeri	0,4
Taq DNA Polimeraz	0,1
<u>cDNA</u>	<u>2,0</u>
<u>Toplam</u>	<u>25</u>

Tablo 3.16. *TGF* genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	3 dk.	1
2.denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma (Annealing)	60,9	30 sn	
Uzama (Elongation)	72	30 sn	
Son Uzama (Final Elongation)	72	2 dk	1

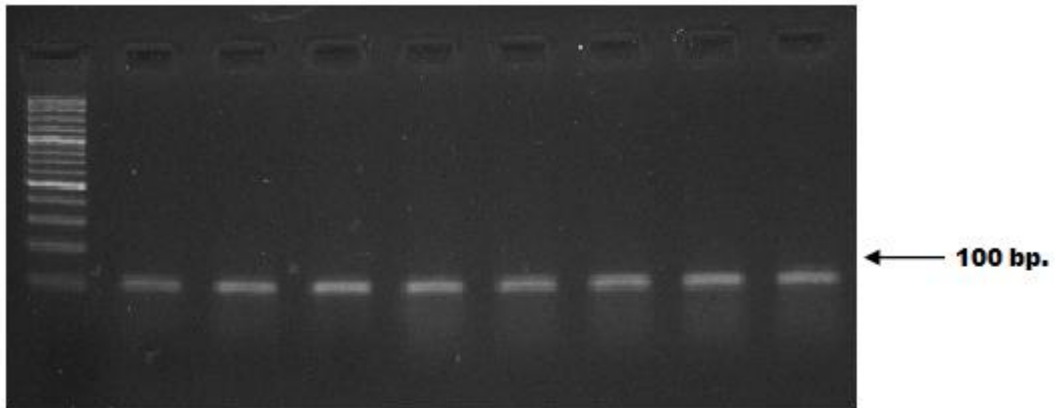
3.13.8. β -Actin

Tablo 3.17. β -Actin genine ait RT-PCR karışım içeriği

Karışım	Miktar (μl)
ddH ₂ O	15,5
10x Buffer	2,5
MgCl ₂	2,5
dNTPs	1,0
Forward Primeri	0,2
Revers Primeri	0,2
Taq DNA Polimeraz	0,1
cDNA	2,0
Toplam	25

Tablo 3.18. β -Actin genine ait RT-PCR reaksiyonu koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	2 dk.	1
2.denatürasyon	94	30 sn	35
Bağlanma (Anneling)	60	45 sn	
Uzama (Elongation)	72	30 sn	
Son Uzama (Final Elongation)	72	2 dk	1



Resim 3.7. β -Actin genine ait Gradient PCR sonuçları

RT-PCR sonucu çalışılan tüm örnek gruplarına ve gen bölgelerine ait PCR rnleri, %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Elektroforez sonucu elde edilen jel görüntüleri, dijital ortama aktarıldı. Image J programı kullanılarak, çalışılan genlerin ekspresyon düzeyleri ölçüldü.

3.14. İstatistiksel Değerlendirmeler

Verilerin istatistiksel analizleri, gruplar arasındaki farkın anlamlılık derecesi ikiden fazla gruplar arasındaki karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) testi ile değerlendirildi. Bütün testlerde 0.05'den küçük P ($P < 0,05$) değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (123).

4. BULGULAR

Bu çalışmada kontrol, 60 dk. iskemi, 60 dk. iskemi+120 dk. reperfüzyon ve 60 dk. iskemi+240 dk. reperfüzyon olarak 4 gruba ayrılmış toplam 40 sıçanda, akciğer iskemi/reperfüzyon modeli oluşturuldu. Daha sonra akciğer dokularından elde edilen RNA ve bu RNA'lerden elde edilen cDNA örnekleri ile *Smad-1*, *Bmp-2*, *Caspase-3*, *Bcl-X_L*, *TGF*, *b-FGF* ve *PDGFR* olmak üzere 7 gen bölgesinin gen ifade düzeylerine RT-PCR tekniği ile bakıldı.

Gen ifadesi sonuçlarının değerlendirilmesi için Image J bilgisayar programı kullanılmıştır. Elde edilen gen ifade düzeylerinin kantitatif değerleri tek yönlü varyans analizi (One-way analysis of variance, ANOVA) ile değerlendirilmiştir.

Elde edilen akciğer dokularının ayrıca genel histolojik değerlendirilmesi yapıldı.

4.1. Gen İfadesi Sonuçları

RT-PCR sonucu agaroz jelde yürütülen her gene ait sonuçların dijital ortamda ölçümü sonrası yapılan istatistikî analize göre; *Caspase-3* ($p<0,0001$), *Bcl-X_L* ($p=0,0011$) ve *TGF* ($p<0.0001$) genlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p\leq 0,05$). *b-FGF* ($p<0.0001$) geninde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p\leq 0,05$). *Bmp-2* ve *PDGFR* genlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık görülmedi. *Smad1* geninde ise mRNA ekspresyonu görülmemiştir.

***Smad-1* geninin gruplara göre ekspresyon durumları ise şöyledir:**

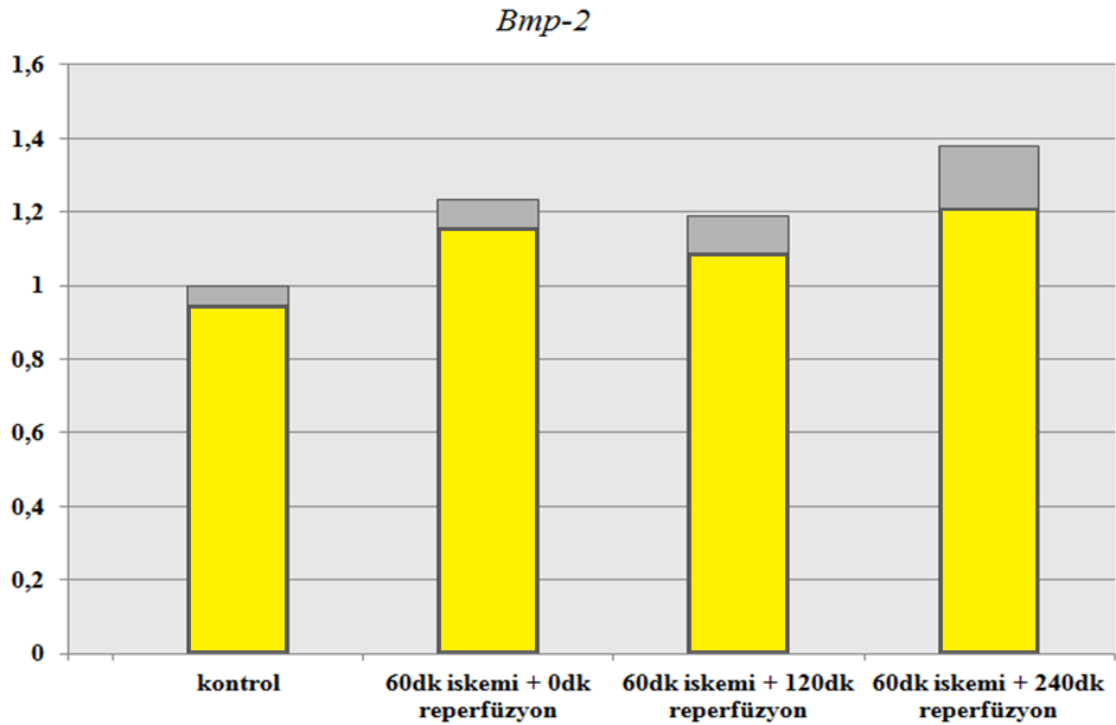
Smad-1 geni gen ifadesi; 60 dk. İskemi + 0 dk reperfüzyon, 60 dk. İskemi + 120 dk reperfüzyon ve 60 dk. İskemi + 240 dk reperfüzyon gruplarında yapılan kontrollü çalışmalarda ekspresyon görülmemiştir.

Bmp-2 geninin gruplara göre ekspresyon durumları ise şöyledir:

Bmp-2 geni gen ifadesi; 60 dk. İskemi + 0 dk reperfüzyon, 60 dk. İskemi + 120 dk reperfüzyon ve 60 dk. İskemi + 240 dk reperfüzyon gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Kontrol grubu dışındaki gruplar kendi arasında kıyaslandığında istatiki olarak anlamlılık görülmemiştir.

Tablo 4.1. Bmp-2 genine ait istatistiksel veriler. 1.grup: Kontrol, 2.grup: 60 dk iskemi+0 dk reperfüzyon, 3.grup: 60 dk iskemi+120 dk reperfüzyon, 4.grup: 60 dk iskemi+240 dk reperfüzyon.

Gruplar	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
				Lower Bound	Upper Bound		
1	,94466	,176147	,055703	,81865	1,07067	,700	1,232
2	1,15771	,225557	,075186	,98433	1,33109	,765	1,379
3	1,08952	,302648	,100883	,85688	1,32215	,710	1,766
4	1,20853	,509938	,169979	,81655	1,60050	,142	1,802
Anova							
	Sum of Squares		df	Mean Square	F	Sig. (p)	
Between Groups	,378		3	,126	1,187	,330	
Within Groups	3,499		33	,106			

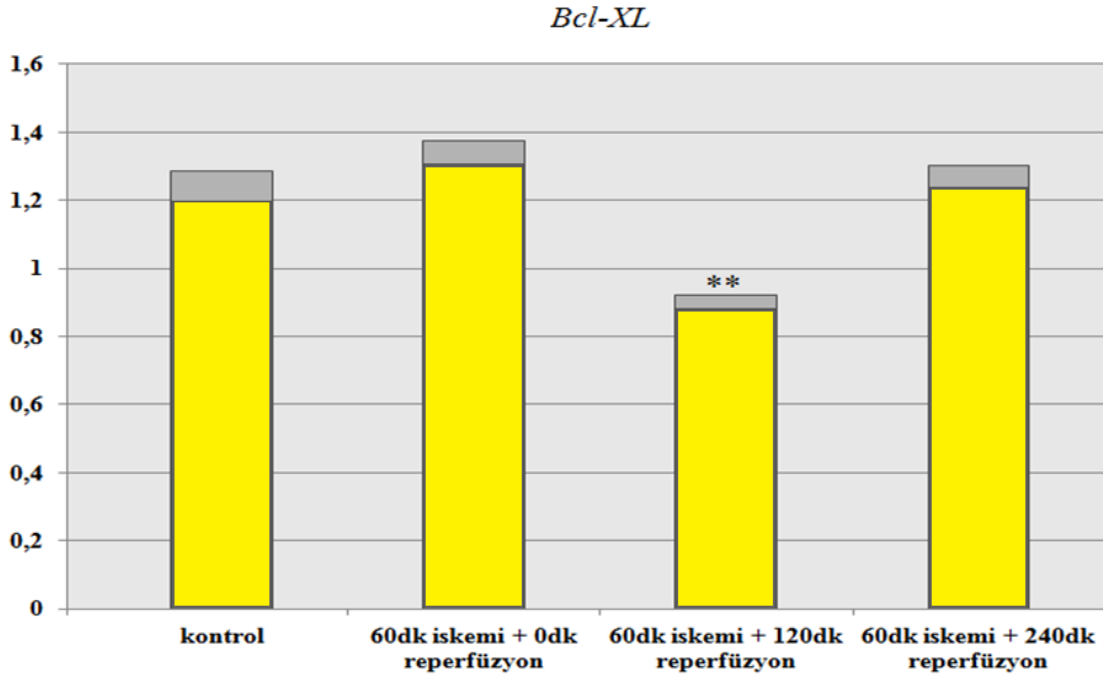


Şekil 4.1. Bmp-2 geninin çalışma gruplarına göre histogramları

Bcl-X_L geninin gruplara göre ekspresyon durumları ise şöyledir: *Bcl-X_L* geni gen ifadesi; 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon ve 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon gruplarında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. 60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir.

Tablo 4.2. *Bcl-X_L* genine ait istatistiksel veriler. 1.grup: Kontrol, 2.grup: 60 dk iskemi+0 dk reperfüzyon, 3.grup: 60 dk iskemi+120 dk reperfüzyon, 4.grup: 60 dk iskemi+240 dk reperfüzyon.

	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
				Lower Bound	Upper Bound		
1	1,1964	,28805	,09109	,9904	1,4025	,73	1,75
2	1,3075	,18136	,06855	1,1398	1,4752	1,10	1,59
3	,8832	,11025	,03675	,7984	,9679	,68	1,05
4	1,2361	,19907	,06636	1,0831	1,3892	,99	1,52
Anova							
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.		
Between Groups	,903	3	,301	6,867	,001		
Within Groups	1,358	31	,044				

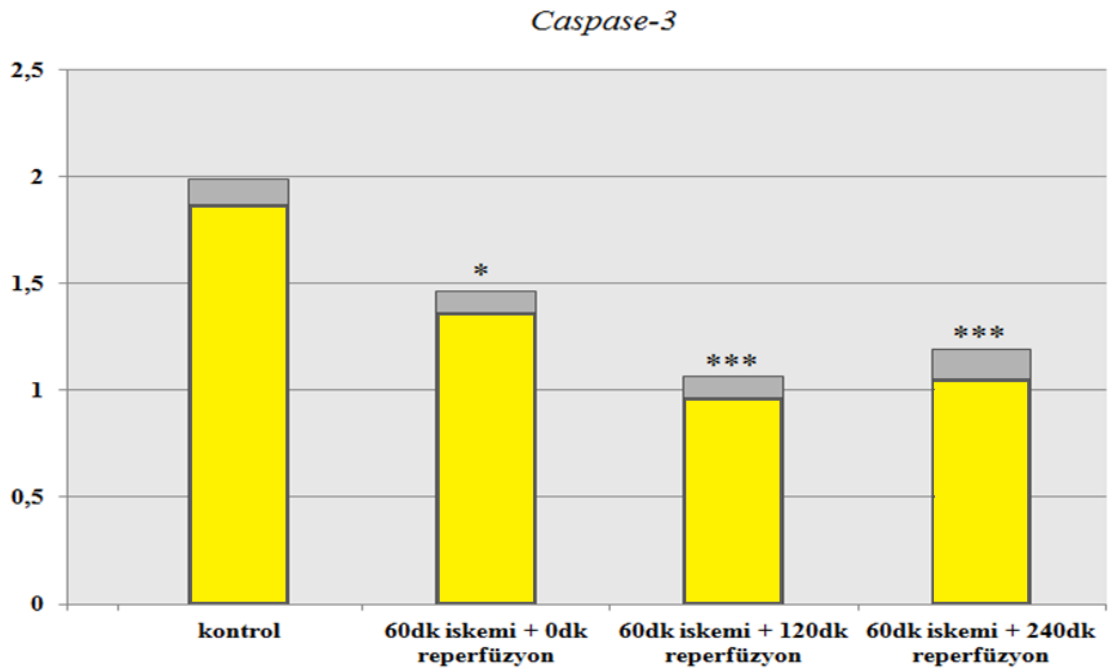


Şekil 4.2. *Bcl-X_L* geninin çalışma gruplarına göre histogramları

Caspase-3 geninin gruplara göre ekspresyon durumları ise şöyledir: *Caspase-3* geni ifadesi; 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon, 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon ve 60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Kontrol grubu dışındaki gruplar kendi arasında kıyaslandığında istatiki olarak anlamlılık görülmemiştir.

Tablo 4.3. *Caspase-3* genine ait istatistiksel veriler. 1.grup: Kontrol, 2.grup: 60 dk iskemi+0dk reperfüzyon, 3.grup: 60 dk iskemi+120 dk reperfüzyon, 4.grup: 60 dk iskemi+240 dk reperfüzyon.

	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
				Lower Bound	Upper Bound		
1	1,8720	,36047	,12016	1,5949	2,1490	1,25	2,43
2	1,3613	,32043	,10681	1,1150	1,6076	1,07	2,11
3	,9635	,31943	,10648	,7180	1,2090	,61	1,60
4	1,0528	,42654	,14218	,7250	1,3807	,69	2,04
Anova							
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.		
Between Groups	4,541	3	1,514	11,722	< 0.0001		
Within Groups	4,133	32	,129				

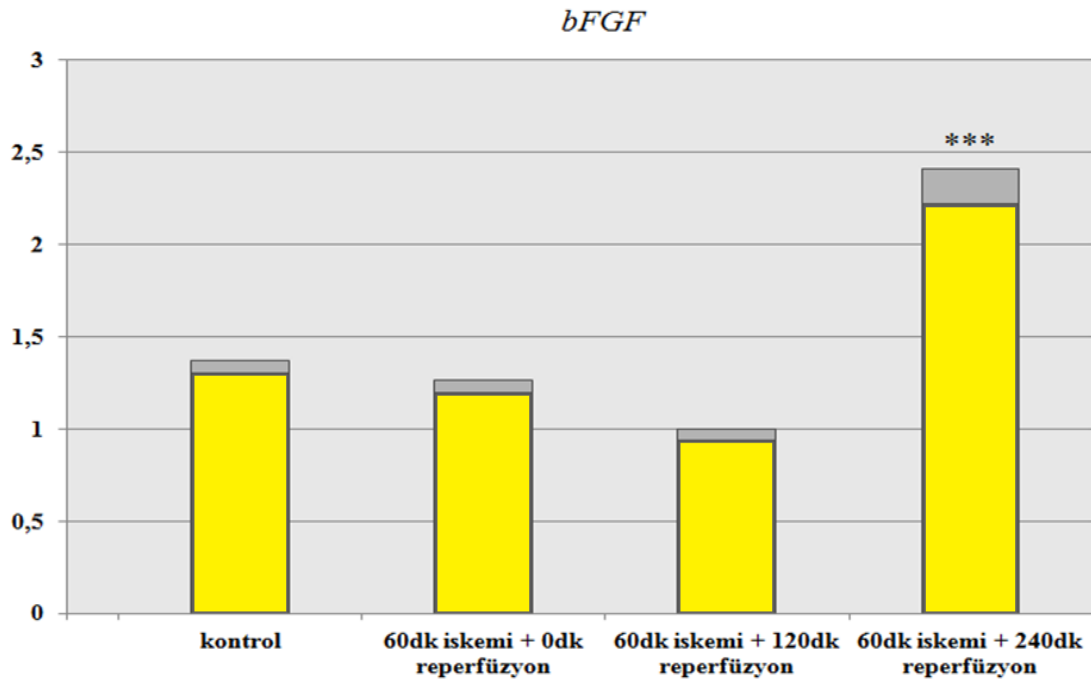


Şekil 4.3. *Caspase-3* geninin çalışma gruplarına göre histogramları

***bFGF* geninin gruplara göre ekspresyon durumları ise şöyledir:** *bFGF* geni gen ifadesi; 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon ve 60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon gruplarında anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir. Kontrol grubu dışındaki gruplar biribiriyle kıyaslandığında 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon grubu, 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon ve 60 dk. İskemi + 120 dk. reperfüzyon gruplarına göre istatiki olarak anlamlı bir artış göstermiştir.

Tablo 4.4. *bFGF* genine ait istatistiksel veriler. 1.grup: Kontrol, 2.grup: 60 dk iskemi+0 dk reperfüzyon, 3.grup: 60 dk iskemi+120 dk reperfüzyon, 4.grup: 60 dk iskemi+240 dk reperfüzyon

	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
				Lower Bound	Upper Bound		
1	1,3052	,21984	,06952	1,1480	1,4625	1,00	1,74
2	1,1937	,20681	,06894	1,0348	1,3527	,85	1,54
3	,9362	,19324	,06441	,7877	1,0847	,79	1,40
4	2,2212	,56179	,18726	1,7894	2,6530	1,45	3,19
Anova							
	Sum of Squares		Df	Mean Square	F	Sig.	
Between Groups	8,473		3	2,824	25,887	< 0.0001	
Within Groups	3,601		33	,109			

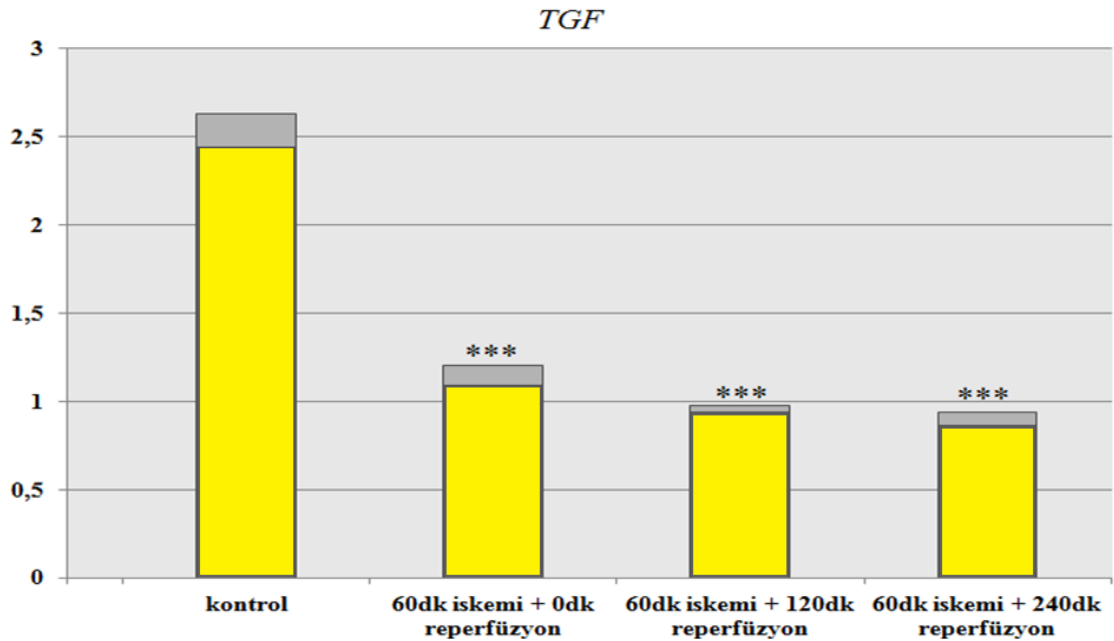


Şekil 4.4. *bFGF* geninin çalışma gruplarına göre histogramları

TGF geninin gruplara göre ekspresyon durumları ise şöyledir: TGF geni gen ifadesi; 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon, 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon ve 60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma göstermiştir. Kontrol grubu dışındaki gruplar kendi arasında kıyaslandığında istatiki olarak anlamlılık görülmemiştir.

Tablo 4.5. TGF genine ait istatistiksel veriler. 1.grup: Kontrol, 2.grup: 60 dk iskemi+0 dk reperfüzyon, 3.grup: 60 dk iskemi+120 dk reperfüzyon, 4.grup: 60 dk iskemi+240 dk reperfüzyon

	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
				Lower Bound	Upper Bound		
1	2,4393	,60223	,19044	2,0085	2,8701	1,76	3,78
2	1,0876	,32472	,11481	,8161	1,3590	,39	1,52
3	,9398	,12012	,04004	,8475	1,0322	,77	1,12
4	,8644	,23119	,07706	,6867	1,0421	,48	1,21
Anova							
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.		
Between Groups	16,038	3	5,346	37,637	< 0.0001		
Within Groups	4,545	32	,142				

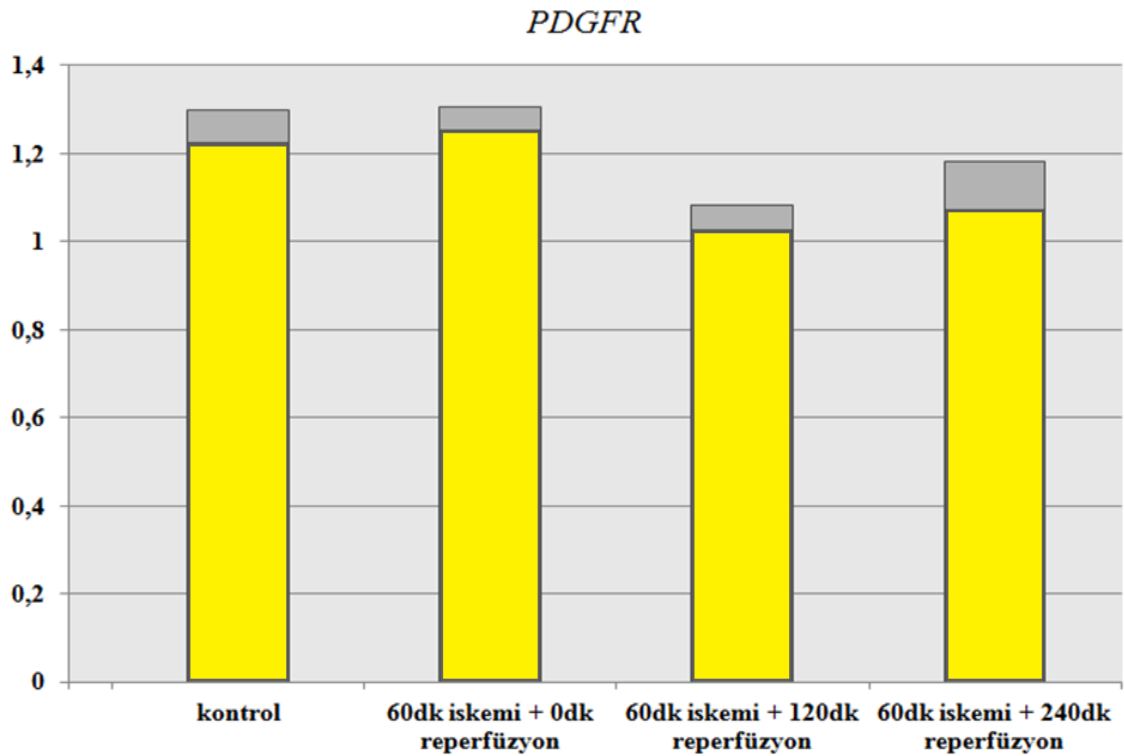


Şekil 4.5. TGF geninin çalışma gruplarına göre histogramları

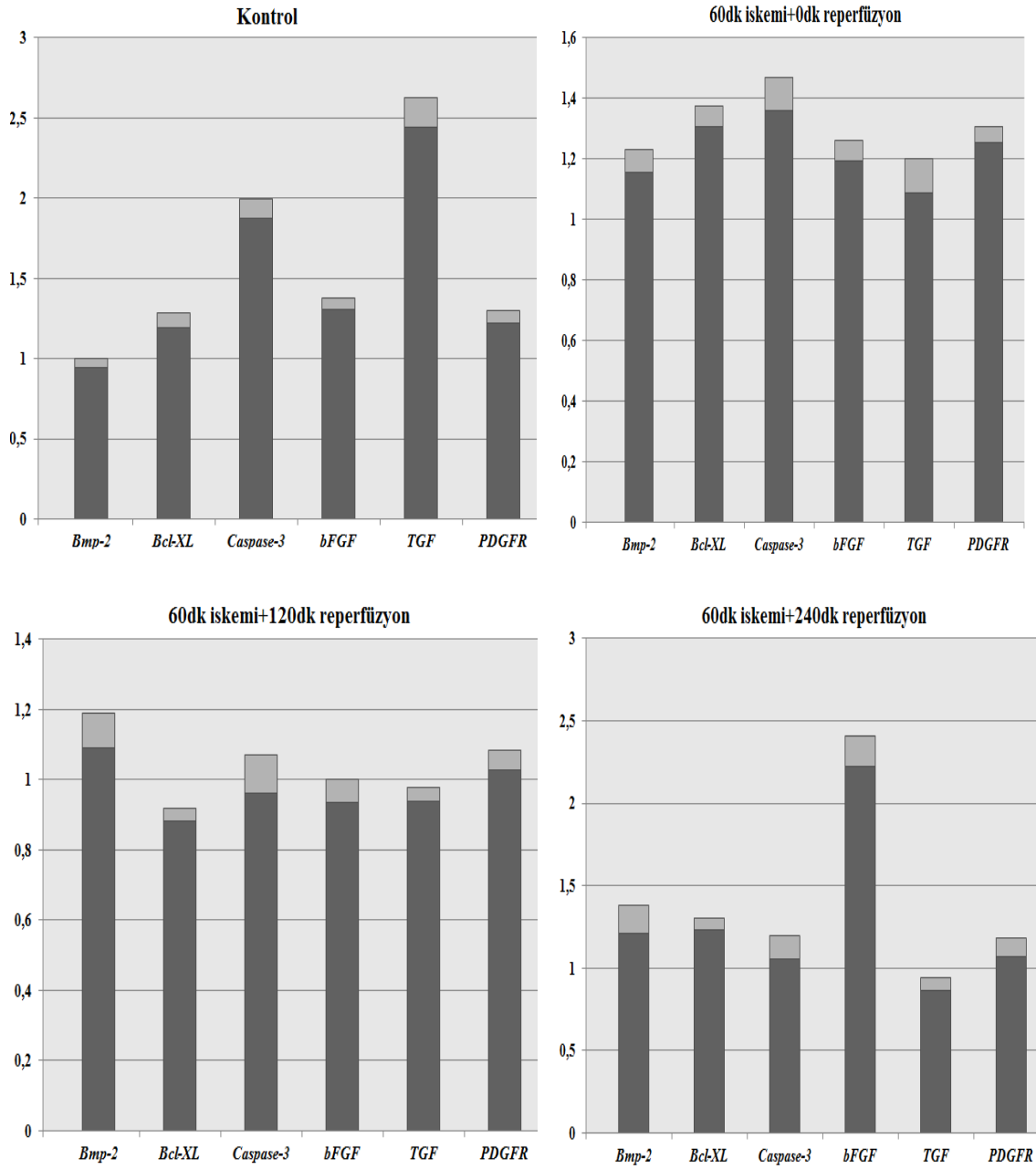
PDGFR geninin gruplara göre ekspresyon durumları ise şöyledir: *PDGFR* geni gen ifadesi 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon, 60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon ve 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Kontrol grubu dışındaki gruplar kendi arasında kıyaslandığında istatiki olarak anlamlılık görülmemiştir.

Tablo 4.6. *PDGFR* genine ait istatistiksel veriler. 1.grup: Kontrol, 2.grup: 60dk iskemi+0dk reperfüzyon, 3.grup: 60dk iskemi+120dk reperfüzyon, 4.grup: 60dk iskemi+240dk reperfüzyon

	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
				Lower Bound	Upper Bound		
1	1,2237	,24132	,07631	1,0511	1,3963	,97	1,73
2	1,2540	,15511	,05170	1,1348	1,3732	1,09	1,58
3	1,0276	,16840	,05613	,8982	1,1571	,78	1,35
4	1,0726	,33322	,11107	,8164	1,3287	,67	1,53
ANOVA							
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.		
Between Groups	,340	3	,113	2,041	,127		
Within Groups	1,832	33	,056				



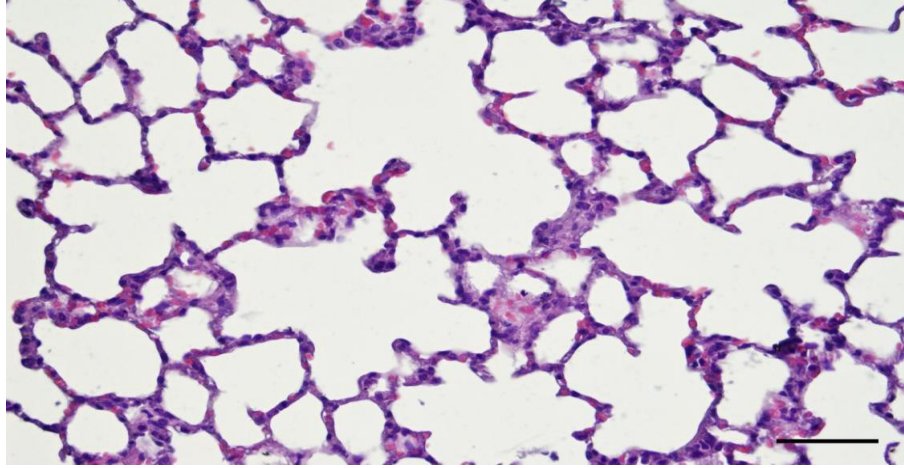
Şekil 4.6. *PDGFR* geninin çalışma gruplarına göre histogramları



Şekil 4.7. Gen ifadesi düzeylerine bakılan genlerin çalışma gruplarına göre histogramları

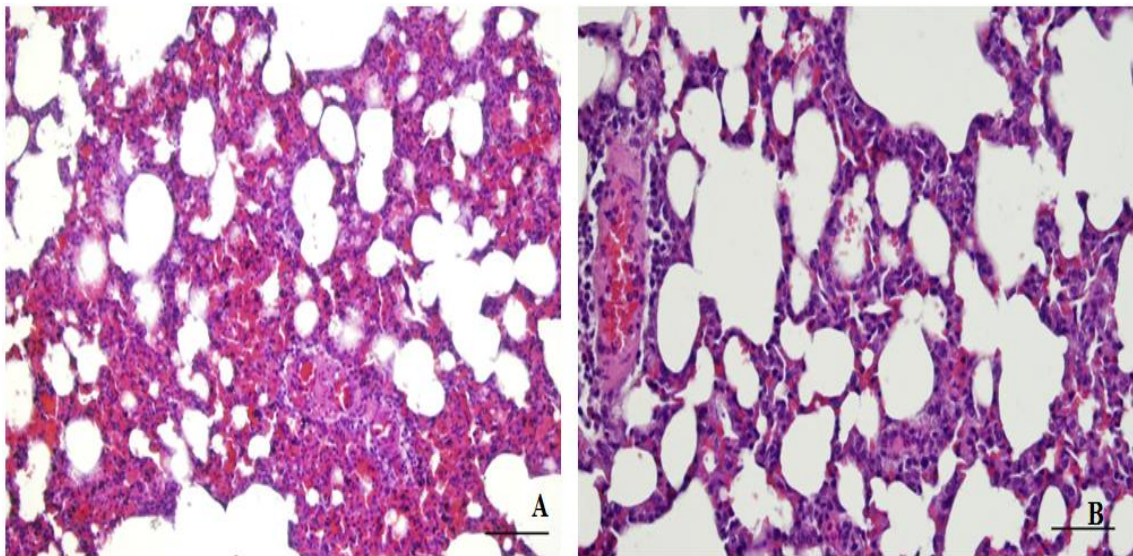
4.2. Histopatoloji Sonuçları

Kontrol grubundaki hayvanlarda; akciğer parankiminin normal histolojik görünümünü koruduğu gözlemlendi.



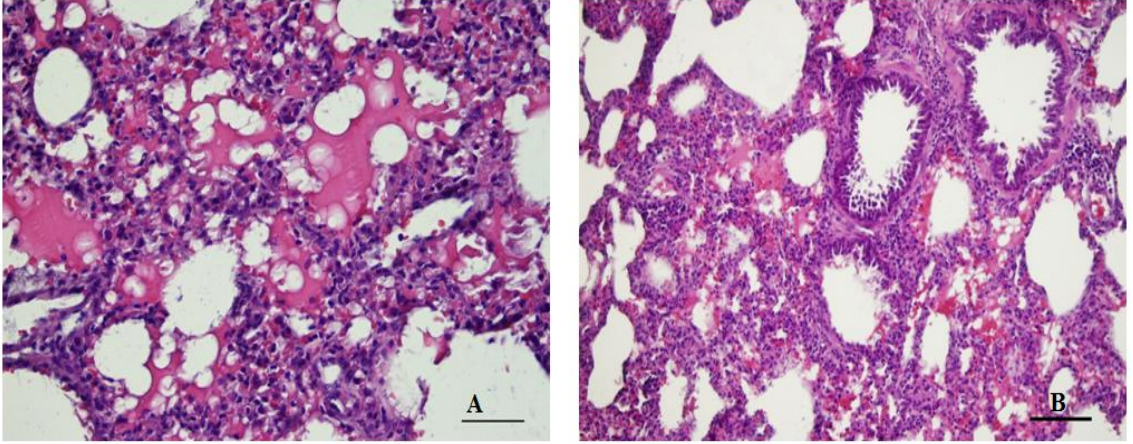
Resim 4.1. Kontrol grubu akciğer görüntüsü. Normal doku yapısı uyumlu görülmektedir. H-E Bar= 50µm

60 dk iskemi+0 dk reperfüzyon grubunda; pulmoner venlerde ve interalveolar septumlarda şiddetli konjesyon ile birlikte, alveol lümenlerine geçmiş bazı eritrosit birikimleri mevcuttur. İnter alveolar septumlarda, belirgin kalınlaşmalar vardır. Hafif şiddette Perivasküler nötrofil infiltrasyonları görülmüştür. Solunum yolu mukoza epitelinde, tek tük deskuamasyonlar mevcuttur. Sağ lopta hafif şiddette interalveolar septumlarda kalınlaşma ve perivasküler tek tük nötrofil infiltrasyonlarına rastlanmıştır.



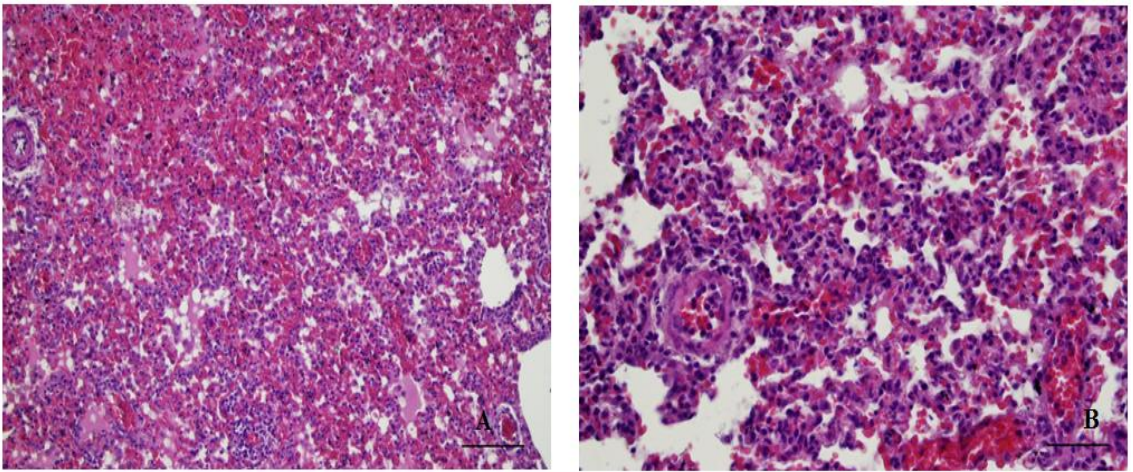
Resim 4.2. 60 dk iskemi+0 dk reperfüzyon grubu görüntüsü. A) Sol akciğer H-E Bar= 100µm B) Sağ akciğer H-E Bar= 50µm

60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon grubunda; Konjestif bulgulara ek olarak, bu grupta şiddetli perivasküler nötrofil ve lökosit infiltrasyonları ile birlikte intraalveolar ödem dikkati çekmektedir. Alveolar epitelde dejenerasyon ve deskuamasyon, belirgin değişimlerdir. Bronş ve bronşiyol epitelinde de dejenerasyon ve deskuamasyon saptanmıştır. Sağ lopta da şiddetli konjestif değişimler ile birlikte hafif şiddette ödem, alveol ve bronşiyol epitelinde dejeneratif ve nekrotik değişimler gözlemlenmiştir.



Resim 4.3. 60 dk. iskemi+120 dk. reperfüzyon grubu görüntüsü. A) Sol akciğer H-E Bar= 50µm B) Sağ akciğer H-E Bar= 50µm

60 dk. iskemi+240 dk. reperfüzyon grubunda; Bütün hayvanlarda, değişen şiddette konjestif atalektazi şekillenmiştir. Şiddetli perivasküler ödem, nötrofil ve lökosit infiltrasyonlarına ek olarak, alveol lümenlerinde belirgin alveolar makrofaj hiperplazisi mevcuttur. Alveolar epitelinde, şiddetli nekrotik değişimlerin varlığı dikkati çekmiştir. Bronş ve bronşiyol epitelinde de deskuamasyonun belirginleştiği gözlenmektedir. Sağ akciğer lobunda da ödematöz ve konjestif değişimler belirgindir.



Resim 4.4. 60 dk. iskemi+240 dk. reperfüzyon grubu görüntüsü. A) Sol akciğer H-E Bar= 100µm B) Sağ akciğer H-E Bar= 50µm

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda 40 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan; Kontrol grubu, 60 dk. akciğer iskemisi grubu, 60 dk. akciğer iskemisi + 2 saat reperfüzyon grubu, 60 dk. akciğer iskemisi + 4 saat reperfüzyon grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Alınan patolojik ve normal dokuların, hem ışık mikroskobunda iske mi durumları hem de moleküler analiz değerlendirmeleri yapıldı. Bu amaçla dokularda mRNA ekspresyonu, RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve RT-PCR(Reverse Transcriptase – PCR) yapıldı.

RT-PCR sonucu agaroz jelde yürütülen her gene ait sonuçların dijital ortamda ölçümü sonrası yapılan istatistikî analize göre *Caspase-3* ($p<0,0001$), *Bcl-X_L* ($p=0,0011$) ve *TGF* ($p<0.0001$) genlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma görüldü ($p\leq 0,05$). *b-FGF* ($p<0.0001$) geninde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış görüldü ($p\leq 0,05$). *Bmp-2* ve *PDGFR* genlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlılık görülmeydi. *Smad1* geninde ise kontrol grubunda dahi mRNA ekspresyonu görülmemiştir.

İske mi tanım olarak; dolaşım tarafından, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılamamasıdır. İske miye bağı dokusu hasarında, hücre sel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne neden olur (1). İske mik hasarın giderilmesi için bu kritik zaman dilimi içinde dokunun tekrar oksijen ile beslenmesi gerekmektedir. İske mi oluşmuş dokunun kan akışının, ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle tekrar sağlanmasına reperfüzyon denilmektedir. İske minin kritik süresi dolmadan, dokusu reperfüze edilirse hücreler ölümden kurtulabilir. İske mi süresinin uzaması, reperfüzyona rağmen ölüm riski olan hücrelerin sayısını artırır ve dokuda geri dönüşümsüz hasarlara yol açabilir.

İske mik dokuların reperfüzyonu, toksik ROS oluşumuna yol açar. Bunlar süperoksit anyonlar, hidroksil radikalleri, hipoklorik asit, hidrojen peroksit ve nitrik oksitten kaynaklanan peroksinitrittir. Oksijen kökenli serbest radikaller aracılığı ile oluşan hasarda başlangıç olay, ksantin oksidaz kökenli süperoksit anyonlarının üretilmesidir (103).

İskemi ve reperfüzyon hasarı, şok, vasküler cerrahi, travma ve transplantasyon sonrası sıklıkla karşılaşılan bir sorundur. Oluşan lokal ve uzak doku hasarını en aza indirmek için araştırmalar devam etmektedir. Değişik kaynaklarda, bir çok dokuda; kalp, akciğer, iskelet kası, santral sinir sistemi, böbrek ve gastrointestinal sistemde, iskemi reperfüzyon hasarının meydana geldiği gösterilmiştir (104).

Akciğerlerde uzamış iskemik süreç; endotel hücre hasarına, endojen surfaktan azalmasına ve sonuçta artan pulmoner kapiller basınç ve pulmoner ödeme bağlı olarak solunum yetmezliği tablosu ile ortaya çıkmaktadır. Akciğer transplantasyonunun yapılmaya başlandığı tarihten itibaren, akciğer korunması hakkındaki çalışmalar gün geçtikçe artmıştır. Pulmoner flush solüsyonlarına pek çok kimyasal madde eklenmiştir. 1993'de Kirk, 1995'de Unruh ve 1996'da Novick gibi araştırmacılar, akciğer korunması ile ilgili derleme yapmışlardır (105,106,107).

İskeminin neden olduğu hasarın önemli bir kısmının reperfüzyon sırasında postiskemik dönemde olduğu düşünülmektedir. Livesay ve ark., çapraz-klemp zamanının 30 dk. yı aşması halinde, felç riskinin %3'ten %11'e yükseldiğini göstermişlerdir (108).

Duke ve arkadaşları 1983 yılında, jel elektroforezi ile apoptozisde endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına yol açtıklarını göstermişlerdir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtları elde edilmiştir (109). Bu tarihten sonra, apoptozis konusunda çalışmalar hızla artmıştır. Nörodejeneratif durumlarda, inflamatuvar hastalıklarda ve iskeminin sebep olduğu sinir sistemi hasarlarında son zamanlarda apoptozis büyük ilgi görmüştür.

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoziste, metabolik olayların devamlılığı için gerekli olan yaşamsal sinyaller yerine, komşu hücrelerden ölüm sinyali aldığı veya hücresel hasarın tamir edilemediği durumlarda uyarıldığı ve bu mekanizmanın genler tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (42).

Apoptozis çok sayıda ek genler tarafından regüle edilmektedir. Bu genler programlı hücre ölümünü ya güçlendirir (*p53*, *Bak*, *c-myc*) ya da inhibe eder (*bcl-2*, *Bcl-X_L*, *setrin*) (110).

Berliocci ve ark.(2005), apoptozisin oluşumunda hücre içi Ca^{++} iyonlarının arttığını ve bunun da hücre ölümünde önemli bir belirteç olduğunu vurgulamışlardır (111).

Hipotermik şartlarda tutulan akciğerlerin reperfüzyonundan sonra, hücrelerde apoptozis görülmektedir. Yapılan çalışmalarda tam fonksiyona sahip ve iyi bir klinik seyir gösteren insan akciğer transplantasyonlarında, 2 saatlik reperfüzyon içerisinde, %30'a yakın apoptozis gözlemlendiği bildirilmiştir (109).

Baltalarlı ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada; hayvanlarda oluşturulan gövde alt yarısı İ/R modeli yardımıyla, iskemik preconditioning'in akciğer hasarı üzerinde etkisi olup olmadığını araştırmışlar. Bunun için İ/R grubunda distal abdominal aortaya 3 saat iskemi sonrası 1 saat reperfüzyon yapmışlar. Yaptıkları çalışmanın histopatolojik bulgularında; İ/R grubunda intraalveoler ve interstisyel belirgin derecede polimorf nüveli lökosit birikimi saptamışlardır. Kontrol grubunda normale yakın bir akciğer histolojisi gözlemişlerdir (112). Kontrol grupları bulgularımız uyumludur. Bizim yaptığımız çalışmadaki 60dk iskemi+120dk reperfüzyon ve 60dk iskemi+240dk reperfüzyon gruplarının histopatoloji bulguları ile bu çalışmadaki İ/R grubunun bulguları uyumludur.

İskemik dokunun reperfüzyonu, dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasarın oluşmasına yol açar (3). Çalışmamızın histopatoloji sonuçları incelendiğinde, reperfüzyon süresi arttıkça, dokularda oluşan hasar sadece 60dk. iskemi+0dk.reperfüzyon yapılan dokulara oranla artmaktadır. Özellikle 4 saatlik reperfüzyon grubunda, şiddetli derecede hasar meydana gelmiştir.

Patolojik inceleme sonucu elde edilen veriler; reperfüzyon süresinin artmasıyla, dokuda oluşan hasarın artması arasında doğru bir orantı olduğunu bizlere göstermektedir.

Kaspazlar, iskemi aracılı hücre ölümünde rol oynayan aspartata özel sistein proteaz ailesidir (113). Kaspazlar, proteolitik olarak bölünmesiyle aktifleşen, inaktif granüller olarak üretilir. Kaspazlar, apoptotik yolun cellatlarıdır ve apoptozdaki karakteristik değişikliklerin en önemli sebebidir (70).

Li ve ark., apoptotik süreçte, kaspaz-3'ün en önemli rolü üstlendiğini ve kaspaz-9'un da kaspaz-3'e benzer özellikler gösterdiği vurgulamışlardır (114).

Hampton ve ark. nın yaptığı çalışma ile apoptotik programın merkezi bileşeninin kaspazlar olduğu gösterilmiştir (115).

Chen ve ark., beyin iskemisinde, reperfüzyondan 1 saat sonra, kaspaz ekspresyonunun meydana geldiğini gözlemişlerdir (116). Bizim çalışmamızda *kaspaz-3* mRNA ekspresyonu, kontrol grubuna göre, her 3 grupta da azalmıştır. Özellikle 1 saatten sonraki reperfüzyon grupları olan 60dk. iskemi+120 dk. reperfüzyon ve 60dk. iskemi+240dk. reperfüzyon gruplarında aktivasyon kontrol grubuna göre daha da fazla azalmıştır. Bizim çalışmamızın sonucu ile Chen ve ark., sonucu birbiriyle çelişmektedir. Bu zıtlık, organların farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Yadav ve ark. nın çalışmasında da, karaciğer iskemisinde, *Bcl-2* genlerinin aktive olarak, kaspazları aktive ettiğini belirlemişlerdir (117). Bizim çalışmamızda ise, *Bcl-2* gen ailesinden olan *Bcl-X_L*'nin mRNA ekspresyonu, sadece 60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon grubunda anlamlı olarak azalmasına karşın, *kaspaz-3*'ün mRNA seviyesi her 3 grupta da azalmıştır.

Chun ve ark. nın kalpte yaptıkları iskemi-reperfüzyon çalışmasında, kaspaz-3 aktivasyonu ile oligonükleozomal DNA parçalarının oluştuğunu ve hücrenin geri dönüşümsüz bir yola girerek, apoptotik cisimciklerin varlığını göstermişlerdir (118).

Dilsiz ve ark., sıçan retinasında iskemi oluşturarak, apoptozisten birinci derece sorumlu olan kaspaz-3'ün varlığını belirlemişlerdir (119).

Zhang ve ark. 2012 yılında sıçan akciğerinde iskemi/reperfüzyon hasarı yaparak *kaspaz-3*'ün mRNA ekspresyonunun arttığını gözlemlemişlerdir (120). Bizim yaptığımız çalışmada ise tam tersine, *kaspaz-3*'ün mRNA ekspresyonu azalmıştır. Zhang ve ark. nın yaptığı çalışmada 45 dk. iskemi sonrası 3 saat ve 6 saat olmak üzere reperfüze yapılmıştır. Bizim yaptığımız çalışmada 60 dk. iskemi sonrası 0 saat, 2 saat ve 4 saat olmak üzere reperfüze yapılmıştır. Bu çalışma ile bizim çalışma arasındaki ekspresyon farklılıkları iskemi/reperfüzyon süresinden kaynaklanıyor olabilir.

Kaspaz-3'ün mRNA ekspresyonu; kontrol grubu dışındaki gruplar olan 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon, 60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon ve 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon gruplarında birbirleriyle kıyaslandığında istatiki olarak anlamlılık göstermemiştir. Bu bulgu bizlere *kaspaz-3*'ün mRNA ekspresyonuna reperfüzyon süresinin etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Ancak iskeminin etkisi olabileceğini

düşündürmektedir. Sadece 60dk. iskemi yaptığımız 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon grubunda da kaspaz-3 mRNA ekspresyonunun düşmesi bu görüşümüzü desteklemektedir.

Literatüre baktığımızda, akciğer iskemisinde *kaspaz-3* mRNA ekspresyonuna ilişkin yapılan çalışmalar az sayıdadır. Akciğer iskemi/reperfüzyon hasarında *kaspaz-3*'ün mRNA ekspresyonuna yönelik yaptığımız bu çalışma, bilimsel araştırmalarda nadir olması sebebiyle önem taşımaktadır.

bFGF; çok sayıda hücre, doku, organ sistemlerinin fonksiyon ve gelişiminde etkili olan bir büyüme faktörüdür. bFGF, öncelikle fibroblastik hücreler için mitojenik bir faktör olarak tanımlanmıştır. bFGF, dokuların rejenerasyonunda etkilidir (95).

bFGF, beyni geçici ve devamlı iskemiye karşı korur (98).

bFGF ve TGF- β , iskemi reperfüzyon hasarı sonrası, organ hasarı ve tamirinde önemli rol oynar. Akciğer onarımı ve *bFGF* ya da *TGF- β* gen ekspresyonu arasında önemli derecede bir ilişki vardır (121).

Fu XB ve ark. (2000), sıçan akciğerinde iskemi/reperfüzyon hasarı yaparak, bFGF ve TGF- β ekspresyonuna immünohistokimya metoduyla bakarak, ekspresyonlarının arttığını belirtmişlerdir (122). Fu XB ve ark. nın yaptığı bu çalışmada; 45 dk. iskemi+6 saat, 24 saat ve 48 saatlik reperfüzyon uygulamışlardır. Çalışmamızda ise, *bFGF* mRNA ekspresyonu sadece 60 dk. iskemi+240 dk. reperfüzyon grubunda kontrol grubuna göre artarken, *TGF- β* mRNA ekspresyonu 60dk. iskemi+0dk. reperfüzyon, 60dk. iskemi+120dk. reperfüzyon ve 60dk. iskemi+240dk. reperfüzyon gruplarında kontrol grubuna göre azalmıştır. Sonuçların farklı olmasının sebebi olarak; iskemi/reperfüzyon sürelerindeki farklılığı düşünmekteyiz.

bFGF mRNA ekspresyonu; kontrol grubu dışındaki gruplar birbiriyle kıyaslandığında 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon grubu, 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon ve 60 dk. İskemi + 120 dk. reperfüzyon gruplarına göre istatiki olarak anlamlı bir artış göstermiştir. Bu bulgu dayanarak reperfüzyon süresinin *bFGF* mRNA ekspresyonuna etkisi olabileceğini düşünmekteyiz.

TGF- β süperailisi, polipeptid yapı gösteren, hücre döngüsünün kontrolü, erken gelişimin düzenlenmesi, differansiyasyon, ekstrasellüler matriks oluşumu,

hematopoezis, angiogenezis, kemotaksis, immün fonksiyonlar, apoptozis gibi olaylarının düzenlenmesinde rol oynayan geniş dağılımlı multifonksiyonel bir sitokin ailesidir (55).

Transdermal growth faktör (TGF)- β 1'in I/R ve akciğer tranplantasyonundaki  nemi; IL-10 ile birlikte akut akciğer reddi ve reperfüzyon hasarını azaltmasının gösterilmesi ile gündeme gelmiştir (30).

Knudsen ve ark. (2011), sıçan karaciğerinde 30 dk. iskemi + 30 dk. reperfüzyon yaparak *TGF- β* mRNA ekspresyonunda herhangi bir anlamlılık bulamamışlardır (123). Bizim  alışmamızda ise 60dk. iskemi+0dk. reperfüzyon, 60dk. iskemi+120dk. reperfüzyon ve 60dk. iskemi+240dk. reperfüzyon gruplarında kontrol grubuna göre *TGF- β* mRNA ekspresyonunda ciddi bir azalma bulunmuştur. Çalışmamızdaki iskemi reperfüzyon sürelerinin bu çalışmaya oranla daha uzun olması, ekspresyonu etkiliyor olabilir. Ayrıca doku farklılığı da *TGF- β* mRNA ekspresyonunda etkili bir unsur olabilir.

Gen transfer çalışmaları; artmış TGF- β ekspresyonunun, akciğer hasarıyla ilgili iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruduğunu göstermiştir (124). Bizim  alışmamızda reperfüzyon süresi arttıkça, *TGF- β* mRNA ekspresyonu azalmıştır. Bu da reperfüzyon süresinin artmasının, *TGF- β* mRNA ekspresyonuna azalmasına doğrudan etkisi olduğunu gösterebilir.

TGF- β mRNA ekspresyonu; kontrol grubu dışındaki gruplar olan 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon, 60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon ve 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon gruplarında birbirleriyle kıyaslandığında istatiki olarak anlamlılık göstermemiştir. Bu bulgu bizlere *TGF- β* mRNA ekspresyonuna reperfüzyon süresinin etkisinin olmadığını düşündürmektedir. Ancak iskeminin etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Sadece 60dk. iskemi yaptığımız 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon grubunda da *TGF- β* mRNA ekspresyonun düşmesi bu görüşümüzü desteklemektedir.

Masaki ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada, *Smad1*'in kardiyomiyositleri I/R hasarına karşı koruduğunu göstermişlerdir (125). Oysaki bizim  alışmamızda, *Smad1* mRNA ekspresyonu görülmemiştir. Kontrol grubunda dahi *Smad1* mRNA ekspresyonun olmaması, akciğerde *Smad1* mRNA ekspresyonu olmadığını düşündürmektedir.

Bmp-2 geni gen ifadesi; 60 dk. İskemi + 0 dk reperfüzyon, 60 dk. İskemi + 120 dk reperfüzyon ve 60 dk. İskemi + 240 dk reperfüzyon gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Kontrol grubu dışındaki gruplar kendi arasında kıyaslandığında istatiki olarak anlamlılık göstermemiştir.

Smad1, Bmp-2 veya 4'ün; Smad2, TGF- β veya aktivinin; Smad3, TGF- β 'nin uyarısı ile serin fosforlarlar (60). Bizim yaptığımız çalışmada *Bmp-2* geninde istatistiki olarak anlamlılık tespit edilememesinin sebebi; *Smad1* geninin ekspresyonunun olmaması olabilir.

Bcl-X_L, İ/R hasarına karşı dokuyu koruma özelliği göstermiştir (126). Bcl-X_L'nin fazla ekspresyonu, Bcl-2'de olduğu gibi, hücreleri apoptosizden korur (73).

Masaki ve ark. nin çalışmasında, Bcl-X_L'in 1 saatlik reperfüzyon sırasında kalpte indüklendiği gösterilmiştir (125). Bizim çalışmamızda, *Bcl-X_L*'in mRNA ekspresyonu, 2 saatlik reperfüzyon grubunda kontrol grubuna oranla düşmüştür. Bu zıtlık; İ/R yapılan organların farklılığından veya reperfüzyon süresinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

PDGF'nin, hücrelerin çoğalmasını ve transformasyonunu sağladığı, apoptozisi düzenlediği ve doku yenilenmesi süresince fibroblastlar, kondrositler ve glia hücreleri gibi birçok hücre tarafından salındığı bildirilmiştir (86).

PDGFR- α ile yaptığımız bu çalışmada; *PDGFR* geni gen ifadesi 60 dk. iskemi + 0 dk. reperfüzyon, 60 dk. iskemi + 120 dk. reperfüzyon ve 60 dk. iskemi + 240 dk. reperfüzyon gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik göstermemiştir. Kontrol grubu dışındaki gruplar kendi arasında kıyaslandığında istatiki olarak anlamlılık göstermemiştir.

Akciğer iskemi reperfüzyon sonrası *PDGFR- α* ile yaptığımız bu çalışma, literatürde ilklerden olması sebebi ile büyük önem taşımaktadır. Bu konu ile yaptığımız çalışma ilklerden olması sebebi ile bundan sonra yapılabilecek çalışmalara yön vermesi de ayrıca bir öneme sahiptir.

Sonuç olarak; Akciğer İ/R hasarı sonucu *Smad1* ve *Bmp-2* genlerinin apoptotik etkilerini araştırdığımız bu çalışmada; *Smad1* geninin eksprese olmadığı görüldü. *Bmp-2* geninin mRNA ekspresyonunda ise herhangi bir istatistiki anlamlılık bulunamadı. Bu sonuç bizlere, Akciğer İ/R hasarına *Smad1* ve *Bmp-2* genlerinin herhangi bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir.

Öneriler;

Akciğer İ/R hasarı sonucu *Smad1* ve *Bmp-2* genlerinin apoptotik etkilerini araştırdığımız bu çalışmadan sonraki aşamada yapılabilecek analizler:

1. Akciğer İ/R hasarı sonucu apoptotik etkileri araştırdığımız bu çalışmadan sonra TUNEL yönteminin bir sonraki aşamada kullanılması, apoptozisin morfolojisini daha da iyi anlamamıza etkisi olabilir.
2. TAS (Total Antioxidant Status) ve TOS (Total Ooxidant Status) kitleri kullanılarak oksidan/antioksidan düzeyleri araştırılabilir.
3. Epinefrin gibi İ/R hasarını önleyici etkisi olduğu bilinen maddelerin çalışmamızda baktığımız apoptozisle ilgili olduğu belirlenen genlerin mRNA ekspresyonu üzerine etkisi araştırılabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusioninjury. SurgClinNorthAm 1992; 72:65-83.
2. Charles D. Collard, SimonGelman. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Preventio of ischemia-Reperfusion injury. Anesthesiology 2001; 94:1133-8.
3. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. Microsurgery, 24, 468-475 (2004).
4. Nakamura, T., Vollmar, B., Winning, J., Ueda M., Menger, M.D., Schäfers, H.-J.: Heparin and the nonanticoagulant N-acetyl heparin attenuate capillary no-reflow after normothermicischemia of the lung. Ann. Thorac. Surg., 72, 1183-1189 (2001).
5. Levinson, R.M., Shure, D., Moser, K.M.: Reperfusion pulmonary edema after pulmonary artery thromboendarterectomy. Am. Rev. Respir. Dis., 134, 1241-1245 (1986).
6. Vural, K.M., Öz, M.C.: Endothelial adhesivity , pulmonary hemodynamics and nitric oxide synthesis in ischemia-reperfusion. Eur. J. Cardiothorac. Surg., 18, 348-352 (2000).
7. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı. Solunum Sistemi Radyolojik Anatomisi. 720S00055. Ankara, 2011.
8. Kılıç C. Akciğerlerin Anatomisi. Journal of Clinical and Analytical Medicine DOI:10.4328/JCAM.964
9. Kızıltunç Özmen H., Lokal İleri Evre Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserli Hastalarda İki Farklı Kemoterapi Kolu İle Yapılan Radyokemoterapi Uygulamalarının Karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Erzurum, 2012.
10. Sinnatamby CS. Last's Anatomy; Regional and Applied. 11th ed. New York:Churchill Livingstone; 2006:219-224.
11. Weinberg JA. The intrathoracic lymphatics. In: Haagensen CD, editor. The lymphatics in cancer. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1972:231-299.
12. Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. Chest 1997;111:1718-23.
13. Johnson D, Shah P. Thorax. In: Standring S, editor. Gray's anatomy, 39th ed. Edinburgh,Scotland: Churchill Livingstone; 2005:951-1079.
14. Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli M. İnsan embriyolojisi İstanbul. Evrim Yayınevi 1992: 137-187.

15. Breeze RG, EWheeldon E. The cells of the pulmonary airways. *Am J Resp Dis*1977;116: 705.
16. Guyton&Hall, Tıbbi Fizyoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 11.Basım, 2007, sy 475-476
17. Bettalanffy FD. Respiratory tissue: structure, histophysiology and cytodynamics *Internat. Rev Cytol* 1997;16:233.
18. Stephen S, Sternberg MD. *Histology for Payhologists*.1991; 442-455.
19. Harper RM. The serebral regulation of cardiivascular and resiratory functions. *Semin Pediatr Neurol* 1996; 3: 13.
20. Jennings RB, Reimer KA. The cellbiology of acutemyocardialischemia. *AnnuRevMed* 1991; 42: 225-246.
21. Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. Theimportance of iron, calciumandfreeradicals in reperfusioninjury: an overview of studies in ischaemicrabbitkidneys. *FreeRadicResCommun* 1989;7: 255-64.
22. Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *AnnNeurol* 1992; 32 Suppl: S33-42.
23. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthinedehydrogenasetooxidase in ischemicratintestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* 1988 May;254(5 Pt 1):G768-74.
24. Robins SL, Kumar V, Cotran SR (Çeviri: U. Çevikbaş.) *Temel Patoloji*. İstanbul: Nobel ve Yüce Kitabevi; 1992:3-24.
25. Türkyılmaz Z: Karaciğer iskemi-reperfüzyon zedelenmesinde pentoksifilin, dimetilsülfoksit ve ekzojen melatoninin koruyucu etkilerinin karşılaştırılması. Edirne: TÜ Tıp Fak: 2003.
26. Özkaya Ferhat Can, Koçdor Hilal İskemi-Reperfüzyon ve Kanser Metastazı:Biyokimyasal Bakış: Derleme. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. Cilt 22, Sayı 2, (Mayıs) 2008, S: 89 – 98.
27. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury. *J Pathol*, 2000;190: 255–266.
28. Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 1345- 1352.
29. Collard, C.D., Gelman, S.: Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology*, 94, 1133-1138 (2001).

30. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, et al.: The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J. Thorac. Cardiovasc Surg.*, 125, 261-272 (2003).
31. Connaughton, P.J., Bahuth, J.J., Lewis, F.J.: Lung ischemia up to six hours; influence of topical cooling in situ on subsequent pulmonary function. *Dis. Chest.*, 41, 404-408(1962).
32. McCord JM.: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.*, 312, 159-163 (1985).
33. Al-Mehdi AB, Shuman H, and Fisher AB.: Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am J Physiol* 272, L294-300 (1997).
34. Kelly RF.: Current strategies in lung preservation. *J Lab Clin Med.*, 136, 427-440 (2000).
35. Date H, Matsumura A, Manchester JK, Obo H, Lima O, Cooper JM, Sundaresan S, Lowry OH, and Cooper JD.: Evaluation of lung metabolism during successful twentyfour-hour canine lung preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg.*, 105, 480-491 (1993).
36. Zhao, G., Al-Mehdi, A.B., Fisher, A.B.: Anoxia-reoxygenation versus ischemia in isolated rat lungs. *Am. J. Physiol.*, 273, L1112-1117 (1997).
37. Ware LB, Golden JA, Finkbeiner WE, and Matthay MA.: Alveolar epithelial fluid transport capacity in reperfusion lung injury after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.*, 159, 980-988 (1999).
38. Sugita M, Suzuki S, Kondo T, Noda M, and Fujimura S.: Transalveolar fluid absorption ability in rat lungs preserved with Euro-Collins solution and EP4 solution. *Transplantation*, 67, 349-354 (1999).
39. Huang YT, Ghio AJ, Nozik-Grayck E, Piantadosi CA.: Vascular release of nonheme iron in perfused rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 280, L474-L481 (2001).
40. Fischer S, Cassivi SD, Xavier AM, Cardella JA, Cutz E, Edwards V, Liu M, Keshavjee S.: Cell death in human lung transplantation: apoptosis induction in human lungs during ischemia and after transplantation. *Ann Surg.*, 231, 424-431 (2000).
41. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. 1972; Apoptosis : A basic biological phenomenon with widespread implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*; 26: 239-57.

42. Mene P, Amore A. 1998; Apoptosis: potential role in renal diseases. *Nephrol Dial Transplant*; 13: 1936-43.
43. Tomatır A G (2003): Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T. Klin. J. Med. Sci.*, 23: 499-508.
44. Hasan AKŞİT, Ayşegül BİLDİK. Apoptozis, *YYÜ VET FAK DERG* (2008) 19(1): 55-63
45. Gewles A. Introduction to apoptosis; 2003; Page 1-26. www.lheworld.com/_books/apointro.pdf den uyarlanmıştır.
46. Ulukaya E. Hücre Siklusu ve Apoptozis: Engin K, Özyardımcı N. Akciğer kanserleri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. Bursa, 2001 1-15.
47. Elmore S.:Apoptosis: a review of programmed cell death.-*Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495-516.
48. Robbins, Temel Patoloji; Sayfa 20-21; 8.baskı; Ekim,2008
49. www.cellsignal.com
50. Suda T. Nagata S.:Purification and characterisation of the Fas ligand that Induces Apoptosis *J. Exp. Med.* 179: 873-879 1994
51. Spierings D.C., de Vries E.G., Vellenga E. et al: Tissuedistribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 52(6): 821-831; 2004
52. Taha TA, Mullen TD, Obeid LM. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta.* 1758(12):2007-36. Epub 2006 Nov 1; 2006
53. Harvey, L., David, B., Arnold, B., Lawrence, Z., Paul, M., James, D., *Molecular Cell Biology*, Third edition. Scientific American Boks, 1160-1167, 1995.
54. David, C.T, Rosemary, R., George, J.T., Luis, P.V., Developmental Expression of Rat transforming Growth factor- α mRNA, *Molecular an Cellular Biology*, Dec: 3644-3646, 1985.
55. Massaque, J., Transforming growth factor – beta family, *Annu. rev. Cell. Biol.*, 6: 597-641, 1990.
56. Itoh, S.,Dijke, P.T., Negative regulation of TGF-beta receptor/smad signal transduction, *Curr. Opin. Cell. Biol.*,19: 176-184, 2007.
57. Massaqu  , J., Gomis, R.R., The logic of TGF- β signaling, *FEBS Letter*, 580: 2811-2820, 2006.

58. Alexsandrow, M.G., Moses, H.L., Transforming Growth Factor β and cell cycle regulation, *Cancer Res*, 55; 1452-1457, 1995.
59. Moses, H.L., Serra, R., Regulation of differentiation by TGF-beta, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 6(5) : 581-6, 1996.
60. Dijke, P.T., Hill, C., New insights into TGF-beta / smad signalling, *Trends in Biochemical Sciences*, 29(5): 267-273, 2004.
61. Böttner, M., Kriegelstein K., Unsicker, K., The Transforming Growth Factor-betas: Structure, signaling, and roles in nervous system development and functions, *Neurochem*, 75:2227–2240, 2000.
62. www.dls.ym.edy.tw/lesson3
63. Clarke, D.C., Betterton, M.D., Liu, X., Systems theory of Smad signaling, *IEE Proc. Syst.Biol*, 153(6): 412-24, 2006.
64. Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem* 2000; 267(24):6954-67.
65. Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF-beta signalling pathways. *Nature* 1996; 383:832-6.
66. Umar N., Nöral tüp kapanmasında TGF- β inhibitör ve aktivator sisteminin (smad's proteinleri) etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Celal Bayar üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008
67. Position paper. (1996). The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *Journal of Periodontology*. 67,545-53.
68. Caffesse RG, Quinones CR. (1993). Polypeptide growth factors and attachment proteins in periodontal wound healing and regeneration. *Periodontology* 2000, 1,69-79.
69. Park BW, Hah YS, Kim DR, Kim JR ve Byun JH. (2007). Osteogenic phenotypes and mineralization of cultured human periosteal-derived cells. *Archives of Oral Biology*, 52, 983-989 .
70. Hengartner MO. The Biochemistry of apoptosis.; *Nature* . 2000; 407.
71. A. Hotti, “Caspases in c-Myc-induced apoptosis” PhD Thesis, University of Helsinki Finland, 2000.
72. A.Güler, “Deneyisel akut spinal kort kontüzyon yaralanmalarında amifostine`nin nöroprotektif etkisi” PhD Thesis, Ankara Numune Eğitim ve Araşt. Hast., Türkiye, 1999.

73. Yang E, Korsmeyer S J. Molecular thanatopsis: A discourse on the Bcl2 family and cell death. *Blood*, 1996; 88: 386-401.
74. Stanley J. Korsmeyer. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulators of cell death. *Blood*, Vol 80, no. 4 (August 15), 1992: pp 879-86
75. Wickremasinghe RG, Hoffbrand AV. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*, 93(11):3587-600, 1999.
76. Rosse T, Olivier R, Monney L, Rager M, Conus S, Fellay I, Jansen B, Borner C. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature*, 391(6666):496-9, 1998.
77. <http://herkules.oulu.fi/isbn9514266676/html/i267425.html>
78. Deuel TF. Polypeptide Growth Factors: Roles in Normal and Abnormal Cell Growth. *Ann. Rev. Cel. Bio.*, 3, 443-492, 1987.
79. Hellstrom M., Kahen M., Lindahl P., Abramsson A., Betsholtz C., 1999. Role of PDGF-B and PDGFR- β in Recruitment of Vascular Smooth Muscle Cell and Pericytes During Embryonic Blood Vessel Formation in the Mouse. *Dev.*, 126, 304.
80. Bonthron DT., Morton CC., Orkin S.H., Collins T., 1988. Platelet-Derived Growth Factor A chain: Gene Structure, Chromosomal Location and Basis for Alternative mRNA Splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 1492-6.
81. Rorsman F., Bywater M., Knott TJ., Scott J., Betsholtz C., 1988. Structural Characterization of Human Platelet-Derived Growth Factor A-Chain cDNA and Gene Alternative Exon Usage Two Different Precursor Protein. *Mol. Cel. Bio.*, 8, 571-577.
82. Collins T., Pober JS., Gimbrone MA., Hammacher A., Betsholtz C., Westermarck B., Heldin CH., 1987. Cultured Human Cells Express Platelet-Derived Growth Factor A Chain. *Am. J. Pathol.*, 126, 7-12.
83. Fredriksson L., Li H., Eriksson U., 2004. The PDGF Family: Four Gene Products Form Five Dimeric Isoforms. *Box*. 240:197-204.
84. Dalla-Favera R., Gallo RC., Giallongo A., Croce CM., 1982. Chromosomal Localization of the Human Homolog (c-sis) of the Simian Sarcoma Virus. *Onc. Gen. Sci.*, 218, 686-8.

85. Johnsson A., Heldin CH., Wsteson A., Westermark B., Deuel TF., Huang J. S., Seeburg PH., Gray A., Ullrich A., Scrace G., 1984. The c-sis Gene Encodes a Precursor of the B Chain of Platelet-Derived Growth Factor. *Emb.*, 3, 921-8.
86. Heldin CH., Westermark B., 1999. Mechanism of Action and in Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor. *Phs. Rew.*, 79, 1283-1316.
87. Betsholtz C., Karlsson L., Lindahl P., 2001. Developmental Roles of Platelet-Derived Growth Factors. *Cell. Dev. Bio.*, 23, 494-507.
88. Boström H., Willetts K., Pekny M., Leveen P., Lindahl P., Hedstrand H., Pekna M., Helltröm M., Gebre-Medhin S., Schalling M., Nilsson M., Kurland S., Iornell J., Heath JK., Betsholtz C., 1996. PDGF-A Signalling is a Critical Event in Lung Alveolar Myofibroblast Development and Alveogenesis. *Cell. Pres.*, 85, 863-73.
89. Ornitz, D.M., Itoh, N. Fibroblast growth factors, *Genome Biol.*, 2, 3005.1-3005.12 (2001).
90. Vemuri, S., Beylin, I., Sluzky, V., Stratton, P., Eberlein, G., and Wang, Y.J., The stability of bFGF against thermal denaturation, *J. Pharm. Pharmacol.*, 46, 481-486 (1994).
91. Nugent, M.N., Iozzo, R.V. Fibroblast growth factor-2, *IJBCB*, 32, 115-120 (2000).
92. Wang, Y. J., Shahrokh, Z., Vemuri, S., Eberlein, G., Beylin, I., Busch, M.. "Characterization, stability, and formulations of basic fibroblast growth factor" Pearlman, R., Wang Y. J. (derleyenler), *Formulation and characterization, and stability of protein drugs*, New York, London, Plenum Press, (1996), s.141-180.
93. Mohammadi, M., Froum, S., Hamby, J.M., Schroeder, M.C., Panek, R.L., Lu G.H., Eliseenkova, A.V., Green, D., Schlessinger, J., Hubbard, S.R. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain, *EMBO J.*, 17(10), 5896-5904 (1998).
94. Moroni, E., Dell'Era, P., Rusnati, M., Presta, M. Fibroblast growth factors and their reseptors in hematopoiesis and hematological tumors, *J. Hematother. & Stem Cell Res.*, 11, 19-32 (2002).
95. Okada-Ban, M., Thiery, J.P., Jouanneau, J. Fibroblast growth factor-2, *IJBCB*, 32, 263-267 (2000).
96. Claus, P., Werner, S., Timmer, M., Grothe, C. Expression of the fibroblast growth factor- 2 isoforms and the FGF receptor 1-4 transcripts in the rat model system of Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.* 360(3),117-20 (2004).

97. Baird, A., Walicke, P.A. Fibroblast growth factors, *Br. Med. Bull.*, 45, 438-452 (1989).
98. Fisher, M., Meadows, M.E., Do, T., Weise, J., Trubetskoy, V., Charette, M., Finklestein, S.P. Delayed treatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces infarct size following permanent focal cerebral ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 15, 953-959 (1995).
99. Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., Rifkin, D.B. Biological roles of fibroblast growth factor-2, *Endocrine Rev.*, 18, 26-45 (1997).
100. SCHULTZ, J.J., HSU, A.K., GROSS, G.J.: Ischemic preconditioning and morphine-induced cardioprotection involve the delta (delta)-opioid receptor in the intact rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 29(8): 2187-95. (1997)
101. Robert Z. Florkiewicz, Amrita Ahluwalia, Zsuzsanna Sandor, Sandor Szabo, Andrzej S. Tarnawski. Gastric mucosal injury activates bFGF gene expression and triggers preferential translation of high molecular weight bFGF isoforms through CUG-initiated, non-canonical codons. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409 (2011) 494–499.
102. Ronaldo Lopes Torres, Adriane Beló-Klein, Cristiano Feijó Andrade and Paulo Francisco Guerreiro Cardoso. Effect of systemically administered low potassium dextran solution on oxidative stress in a rat model of lung ischemia. *Interact CardioVasc Thorac Surg* 2009;8:3-6.
103. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischaemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255:HI269-75
104. Chen LE, et al: Effects of S-nitroso-Nacetylcysteine on contractile function of reperfused skeletal muscle. *Am J Physiol* 1998; 274: 8229.
105. Kirk AJB, et al: Lung preservation: a review of current practice and future directions. *Ann Thorac Surg* 1993;56:990.
106. Unruh HW: Lung preservation and lung injury. *Chest Surg Clin North Am* 1995;5:91
107. Novick RJ, et al: Lung preservation: the importance of endothelial and alveolar type II cell integrity *Ann Thorac Surg* 1996;62:302.
108. Ö. Tetik, A. Gürbüz, Spinal Cord Protection, *TGKDCD*, 8:2 2000 587-592.
109. <http://www.sgul.ac.uk/deps/immunology/~dash/apoptosis/apoptosis.pdf>

110. Kyama CM, Overbergh L, Debrock S, et al. Increased peritoneal and endometrial gene expression of biologically relevant cytokines and growth factors during the menstrual phase in women with endometriosis. *Fertil Steril*. 2006;85:1667-1675.
111. L. Berliocchi, D. Bano and P. Nicotera, Ca²⁺ signals and death programmes in neurons, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.*, 360:1 (2005) 2255- 2258.
112. Baltalarlı A., Çolakoğlu N., Önem G., Gökşin İ., Rendeci O., Saçar M. İskemik Preconditioning, Sıçanlarda Bilateral Alt Ekstremité İskemi/Reperfüzyonuna Bağlı Gelişen Akciğer Hasarını Artırır. *TGKDCD* 2000; 8:1, 537-9
113. Nuttall ME, Nadeau DP, Fisher PW et al: Inhibition of caspase-3 like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in-vitro. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 18: 356-363, 2000.
114. Li M, Ona VO, Chen M, Kaul M, Tanneti L, Zhang X, Stieg PE, Lipton SA, Friedlander RM: Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 99: 333-342, 2000.
115. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998;8:1-5.
116. Z. Chen, D. Kontonotas, D. Friedmann, A. Pitts-Kiefer, J.R. Frederick, R. Siman and R.W. Neumar, Developmental status of neurons selectively vulnerable to rapidly triggered post-ischemic caspase activation, *Neuroscience Letters*, 376:3. 2005. 166-170.
117. S.S. Yadav, D. Sindram, D.K. Perry, P.A. Clavien, Ischemic Preconditioning Protects the Mouse Liver by Inhibition of Apoptosis Through a Caspase-Dependent Pathway, *Hepatology*, 30:5 (1999) 1223-1235.
118. G. Kim, Y. Chun, J. Park, M. Kim, Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309:3 (2003) 619-624.
119. N. Dilsiz, A. Sahaboglu, M.Z. Yıldız, A. Reichenbach, Protective effects of various antioxidants during ischemia-reperfusion in the rat retina, *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 244:5 (2006) 627-633.
120. Zhang Z, Shen H, Qin HD, Xu Y, Ma MZ, Bao L, Wang H. Protective effect of N-acetylcysteine against pneumocyte apoptosis during ischemia/reperfusion injury of lung in rats. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*. 2012 Feb;24(2):111-5.

121. Yang YH, Fu XB, Sun TZ, Wang YP, Sheng ZY. bFGF and TGF- β gene expression in rat lung after ischemia reperfusion. *Jiefangjun Yixue Zazhi*, 1998;23:405-409
122. Xiao Bing Fu, Yin Hui Yang, Tong Zhu Sun, Xiao Man Gu, Li Xian Jiang, Xiao Qing Sun and Zhi Yong Sheng. Effect of intestinal ischemia-reperfusion on expressions of endogenous basic fibroblast growth factor and transforming growth factor β in lung and its relation with lung repair. *World J Gastroenterol*, 2000; 6(3):353-355
123. Anders R Knudsen, Anne-Sofie Kannerup, Henning Grønbaek, Kasper J Andersen, Peter Funch-Jensen, Jan Frydtk, Allan Flyvbjerg, Frank V Mortensen. Effects of ischemic pre- and postconditioning on HIF-1 α , VEGF and TGF- β expression after warm ischemia and reperfusion in the rat liver. *Comparative Hepatology* 2011, 10:3
124. Daddi N, Suda T, D'Ovidio, et al. Recipient intramuscular cotransfection of naked plasmid transforming growth factor β_1 and interleukin 10 ameliorates lung graft ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124:259–269
125. Mitsuru Masaki, Masahiro Izumi, Yuichi Oshima, Yoshikazu Nakaoka, Tadashi Kuroda, Ryusuke Kimura, Shoko Sugiyama, Kazuo Terai, Masafumi Kitakaze, Keiko Yamauchi-Takahara, Ichiro Kawase, Hisao Hirota. Smad1 Protects Cardiomyocytes From Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation*. 2005;111:2752-2759
126. Huang J, Nakamura K, Ito Y, Uzuka T, Morikawa M, Hirai S, Tomihara K, Tanaka T, Masuta Y, Ishii K, Kato K, Hamada H. Bcl-xL gene transfer inhibits Bax translocation and prolongs cardiac cold preservation time in rats. *Circulation* 112:76–83, 2005.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Mardin’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Gaziantep’te tamamladıktan sonra 2005 yılında başladığı Gaziantep Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldu. 2010 yılında Gaziantep Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime başladı. Şubat 2010- Kasım 2011 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Onkoloji Hastanesi Moleküler Genetik Tanı Laboratuvarı’nda çalıştı. İngilizce bilmektedir ve evlidir.