

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**İSKEMİ – REPERFÜZYON SONRASI RAT RETİNASINDA
OLUŞTURULAN APOPTOZUN KAPTOPRİL VE İLOPROST
İLE ÖNLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. SÜLEYMAN AKSOY

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. MERAL OR

ANKARA-2007

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	2
• Apoptozis.....	3
• Kaptopril.....	27
• İloprost.....	28
GEREÇ VE YÖNTEM.....	30
BULGULAR.....	33
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
ÖZET.....	44
İNGİLİZCE ÖZET.....	45
KAYNAKLAR.....	47

GİRİŞ

Apoptoz, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür.¹⁰⁰ Apoptozis, hücre ölümünü tetikleyen fizyolojik veya patolojik stimülüs ile indüklenmekte, uyarı hücre ölüm uyarısına dönüşmekte, proteolitik kaskadların aktivasyonu ile başlamakta ve ölen hücre fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır.¹² Apoptozis, insanlarda ve pek çok canlıda normal intrauterin gelişme ve erişkin yaşamı için hayati önem taşımaktadır. İnsanlarda apoptotik mekanizmanın bozulması kanser, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıkların gelişmesine neden olabilir. Bu hastalıklarda apoptozu kontrol eden mekanizmaların anlaşılması yeni tedavi çabalarına kapı açabileceği için önemli görünmektedir.

Hücrelerin maruz kaldığı hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınları gibi dış etkenler apoptoza neden olabilmektedir. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak hücrede apoptoz meydana getirirler. Hücre, ölüm için aldığı uyarı ile protein denatürasyonu, erken DNA degradasyonu ve/veya mitokondriden serbest oksijen radikalleri salınımı sonucu hasara uğramaktadır. Memelilerde apoptozisi regüle eden gen bax genidir. Bu gen p53 tarafından aktive edilerek apoptozisi indüklemektedir. Apoptozisi inhibe eden genler de bcl-2 ve bcl-x genleridir. Bax ve bcl-2 genleri mitokondriyal membran permeabilitesini değiştirerek sitokrom c salıverilmesini artırmak ve azaltmak suretiyle pek çok hücre proteinini yıkıma uğratan kaspaz

enzim sistemini sırası ile aktive veya inhibe etmekte ve bu yolla apoptozisi kontrol altında tutmaktadır.¹²

Apoptotik hücre ölümü gözde, retinal nöral dejenerasyonun son basamağı olarak kabul edilmekte malignensi, retinitis pigmentoza, travmatik retina dekolmanı, proliferatif diyabetik retinopati, iskemi durumlarında görülmektedir.^{57,66,133} İntraoküler basıncı artırmak, fotosensitif boya enjeksiyonu ile beraber lazer ışını vererek arteri tıkamak, intraoküler basıncı arttırmak suretiyle oluşturulan iskemi modellerinde yapılan çalışmalarda 60 dakikalık iskemi periyodunu takiben reperfüze edildikten 4 saat sonra apoptotik değişikliklerin oluştuğu, 24 saat sonra kaspaz-1 ve kaspaz-3'ün upregüle olduğu belirlenmiştir.^{23,103}

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak ratlarda iskemik oküler sendromun modifiye edilmiş bir şekli olan karotid arter oklüzyonu ve reperfüzyonu ile oluşturulan apoptotik değişiklikleri incelemek ve oluşan bu hücre ölümünün doku koruyucu etkinliği belirlenmiş olan iloprost ve kaptopril ile önlenip önlenemediğini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

Göz, insan vücudunda en iyi perfüzyona sahip olan organlardan birisidir. Perfüzyondan sorumlu ana vasküler sistem gözün iç tabakalarının perfüzyonunu sağlayan retinal damarlar ve diğer dokuları besleyen siliyer damarlardır. Gözün vasküler desteği esas olarak internal karotid arterin ilk dalı olan oftalmik arter yolu ile olmaktadır. Major dalları olan santral retinal arter retinanın iç 2/3 kısmını beslerken, posterior siliyer arterler 1/3 dış kısmı besler.

Retina, dışta retina pigment epiteli ve içte 6 tip nöron ve aralarında müller hücrelerinin bulunduğu nöral retinadan oluşur. Histolojik olarak 10 tabakadan oluşmaktadır. Dıştan içe doğru

bu tabakalar: Retina pigment epiteli tabakası, fotoreseptör tabakası, dış limitan membran, dış nükleer tabaka, dış pleksiform tabaka, iç nükleer tabaka, iç pleksiform tabaka, gangliyon hücre tabakası, sinir lifi tabakası ve iç limitan membran tabakası şeklindedir.

Dış nükleer tabaka koni perikaryumları en dışta yerleşecek şekilde fotoreseptör hücre gövdelerinden oluşurken dış pleksiform tabaka fotoreseptör hücrelerin, horizontal ve bipolar hücrelerle sinaps yaptığı tabakadır. Horizontal hücreler, bipolar hücreler, müller hücreleri ve amakrin hücreler iç nükleer tabakada bulunurlar. İç pleksiform tabaka ise bipolar, amakrin ve gangliyon hücrelerinin sinaps yaptığı tabakadır. Sinir lifi tabakası optik siniri oluşturmak üzere toplanan gangliyon hücre aksonları tarafından oluşturulur.

APOPTOZİS

Yaşamakta olan hücreler iki farklı mekanizma ile ölürlür. Bu mekanizmalar nekroz ve apoptozistir. Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişikliği, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptozis ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin organizma için güvenli bir şekilde yok edilmesini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir. Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozda kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve kondanse olur. Nekrotik hücrede plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde küçük cepçikler oluşur. Nekrotik hücre sonra

lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır ve değişen miktarlarda nukleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Bu apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Nekrozda ise plazma membranının bütünlüğü bozulup hücre içeriğinin dış ortama salıverilmesi sonucu inflamasyon uyarılır.

Yunanca'da apo= ayrı, ptosis= düşen anlamı taşıyan apoptosis terimi biyolojik bilimler literatüründe ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Apoptozis, uzun süre araştırmacıların çok ilgilenmedikleri bir alan olarak kalmıştır. Fakat apoptozisin gelişim biyolojisinde, normal doku "turnover"ında ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi de hızla artmıştır. Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadırlar ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Çok hücreli canlıların normal ve doğru gelişimleri seçilmiş bazı hücrelerinin apoptozisle ölmesine bağlıdır. Örneğin insan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin, buradaki hücrelerin apoptozisle ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir. Yapım (mitozis) ile yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. Bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Olmaması gerekirken gerçekleşen apoptozis veya hızlanmış ya da tam tersine yavaşlamış apoptozis organizma için tehlikelidir. Apoptozisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı tip diyabet, hepatit C infeksiyonu, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozisin yavaşladığı hastalıklara örnek olarak ise otoimmün hastalıklar ve kanser verilebilir. Görüldüğü gibi apoptozis organizmada doğru bir şekilde işlemelidir.

Apoptozisin en önemli özgül yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II'de DNA parçalanmasından sorumludur. Hangi parçalayıcı enzimin rol alacağı hücre tipine ya da uyarının özelliğine göre değişebilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır "phosphatidylserine translocation". Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar.

Apoptozisin genetik kontrolü ile ilgili bilgilerin çoğu bir nematod olan *Caenorhabditis Elegans*'dan elde edilmiştir. Bu genler *ced 3*, *ced 4*, *ced 9* ve *egl*'dir. *Ced-3* ve *ced-4* proapoptotik genlerdir. *Ced-3* ve *4*'ün etkileri antiapoptotik etkili *ced-9* ve *egl* genleri ile kontrol edilir. Memelilerde yapılan çalışmalarda bu genlerin analogları tespit edilmiştir. Memeli hücrelerinde apoptoziste rol alan kaspazlar *ced-3* analogudur ve bu güne kadar 14 kaspaz tipi belirlenmiştir. *Ced-4*'ün memeli hücrelerindeki homoloğu apoptozis aktive edici faktör-1 (apoptotic protease activating factor-1=APAF-1)'dir. *Ced 9* ve *egl* analogu ise *bcl-2* genidir.

Apoptozisin modülatörleri:

Apoptozis çok sayıda ve çeşitte mediatör tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler (*c-myc*), proteinler (*p53*) ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır. Bazı mediatörler hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik stimulusun çeşidine göre farklılık gösterebilirler. Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları endonükleaz aktivasyonunda, doku transglutaminaz aktivasyonunda, gen regülasyonunda, proteazların aktivasyonunda ve hücre iskeleti

organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir.

Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (bax, bad, bid, bcl-X_s), bir kısmının ise inhibe ettiği (bcl-2, bcl-X_l) geniş bir ailedir. Fizyolojik şartlarda hücre içinde bcl-2/bcl-x ve bax genleri denge halinde bulunmaktadır. Fakat bu durumu bax gen aktivasyonu yönünde bozan faktörler sonucu hücrede apoptozis başlamaktadır. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikiklerin “pore” oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuda sitokrom c ve apoptozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF’ün (apoptosis-inducing factor) mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Bcl-2’nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği bulunmuştur.

p53 gen ailesi hücre içinde oldukça önemli rollere sahiptir. Bunlardan birisi; hücre siklusunun durdurulması, bir diğeri ise hücre ölümünün aktive edilmesidir.⁷⁴ p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı (“single or double-strand breaks”, nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA’sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indükler. p53’ün apoptozisi indüklemesi bax’ın ekspresyonunu artırması böylece bcl-2/bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Fakat bax gen aktivasyonu için tek geçerli mekanizma, p53 aktivasyonu değildir.¹²⁸

Bazı virüsler (insan papillom virüsü, Epstein-Barr virüsü, adenovirüs tip 12) ya p53'ü inaktive ederek ya da bax'a bağlanarak apoptozisi bloke ederler, böylece bu hücrelerin enfekte ettikleri hücreler doğal hücre ölüm mekanizmasından kurtulduklarından virüsle-indüklenen karsinogenezise bu yolla katkıda bulunurlar. p53 ayrıca bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 (murine double minute 2) tarafından da ya transkripsiyonu "down" regüle edilerek ya da kendisine bağlanılarak hem aktivitesi inhibe edilir hem de yıkımı hızlandırılır. Fakat, DNA'nın hasarlanması halinde p53'ün fosforilasyonu artar ve buna bağlı olarak da Mdm2'den ayrılır, böylece yarılanma ömrü uzadığı için de aktivitesi artar.

Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteinidir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden stoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitokondriden AIF ile birlikte stoplazmaya salınır. Sitokrom c stoplazmik protein olan Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease=ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'ın bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (caspase-activated deoxyribonuclease=CAD) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondansasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmantasyonuna neden olur. Buraya kadarki mekanizma kaspaz-bağımlı apoptozisi gösterir, oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF'in etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat, AIF'in etkilediği nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir.⁴⁷

Kaspazlar (caspases), zimojen (inaktif prekürsör) olarak stoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada neden olurlar. Bazıları (kaspaz-2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (kaspaz-3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim interlökin 1- β dönüştürücü enzim (ICE)'dir ve prokaspaz-1 olarak bilinir. Kaspaz kaskadı, sitokrom c'nin stoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz-9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c'nin salıverilmesine neden olabilirler. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP'lar (inhibitors of apoptosis) kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP'lar ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilirler. Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir.⁶⁰ Hatta, kaspaz-8'in nöroblastomada tümör süpressörü olarak işlev gördüğü bulunmuştur.¹¹⁶

Seramid, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plasma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir.

Granzimler, patojenle enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkin rol alırlar. Perforinler ve granzimler normal olarak sitotoksik lenfositlerin ve Natural Killer hücrelerin stoplazmik granüllerinde bulunurlar. Sitotoksik lenfositlerin hedef hücreye bağlanmasıyla perforinler salgılanır ve hedef hücrenin membranında porlar meydana

getirirler. Perforin porlar sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan ve bir serin proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz-8'in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da enfekte hücreyi (veya kanser hücrelerini) apoptozise götürür.

Apoptozisin indüklenmesi:

Apoptozisi başlatan nedenler çeşitlidir. Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekrozis faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunurlar. İlgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve Natural Killer hücrelerinde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (death domain) adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz-8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır. Örneğin, kaspaz-8 (FLICE) FLIP (FLICE-inhibitory protein)'i inhibe eder.

Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53 bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve

DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stress) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir. Apoptozisi büyüme faktörlerinin ortamdaki eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığına maruz bırakılırlarsa apoptozisle ölürlür. Buradaki mekanizma, apoptozis indükleyici bir nükleer protein olan p53 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Ayrıca, pro-apoptotik bir bcl-2 ailesi üyesi olan bad'ın fosforillenmemesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin stoplazmaya salınması yoluyla da apoptozis gerçekleşir. Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salınan granzimlerin hedef hücrede (örn. virüsle enfekte hücre veya kanser hücresi) kaspaz sistemini aktifleştirmesidir.

Mitokondrinin Apoptozisteki Rolü:

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden stoplazmaya salınması) apoptotik süreçte irreversibl noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin stoplazmaya salınması gerçekleşir (apoptozisin başlaması) veya sitokrom c'nin stoplazmaya salınması baskılanır (apoptozisin inhibisyonu). Mitokondrial membran permabilitesinin artışı sitokrom c salınımı açısından önemlidir. Mitokondrinin iç membranında transmembran potansiyelinde düşme (PT= permeability transition) sonrasında mitokondride önemli değişiklikler meydana gelir. PT ve takiben oluşan sitokrom c salınımı apoptoziste en kritik olaylardır. PT; iç membranda geniş bir

por oluşumu (PT pore) sonrasında meydana gelmektedir. PT por, iç ve dış mitokondriyal membranların temas halinde oldukları noktalarda, bulunan multiprotein komplekslerinden meydana gelmektedir.³⁸ Mitokondrinin dış membranında porin ya da voltaj bağımlı anyon kanalı (VDAC) iç membranda ise adenin nükleotid translokator (ANT) isimli protein bulunmaktadır. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve cyclophilin D, bu proteinlerle etkileşirler. PT por, normalde mitokondride matriks Ca^{+} düzeyi, pH, elektrik potansiyeli ve volüm ayarlaması yapmaktadır. Fakat apoptozis sırasında, porlar açılır ve oksidatif fosforilasyon meydana gelir ve mitokondride şişme meydana gelir. Bir teoriye göre bu şişme, membran rüptürüne ve membran arası boşluğa sitokrom c salınımına neden olmaktadır. Bir diğer alternatif teoriye göre ise, PT por açılımı sitokrom c bağımlı kaspaz aktivasyonundan sonra olmaktadır.⁹⁷ Buna göre sitokrom salınımı mitokondri dış membranında bax proteininin bağlandığı spesifik protein kompleksi tarafından yürütülmektedir. Bax proteininin, ANT proteini ile bağlantı kurup apoptozisi indüklediği ve sitokrom salınımını arttırdığı gösterilmiştir.⁸¹ Alternatif olarak, bcl-2 proteini de por açılmasını engellemektedir ve bunu VDAC proteini ile etkileşerek yaptığı düşünülmektedir.⁸² Sonuç olarak, yukarıda da belirtildiği üzere bcl-2/bcl-x sistemi bir etkisini de, dolaylı yoldan sitokrom c salınımını engelleyerek göstermektedir.

Bcl-2 Ailesi:

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozisi indükleyici, etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı, etkiye sahiptir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden stoplazmaya salıverilmesini indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salıverilmesini baskırlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik a-heliks) bağlıdır.

Yapılarındaki BH1, BH2, ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep'i oluşturur. Amfipatik a-heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt grublardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn., bax, bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (bid, bad, bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğeri hücrel yollarla ilişkisini kurduğu düşünülmektedir. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak intrinsic sitokrom c'nin salıverilmesini baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom c salıverilmesi gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Anti-apoptotik bcl-2 ailesi üyelerinin en iyi bilinenleri: bcl-2, bcl-XL, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanları ise bax, bcl-Xs, bad, bim, bak, bok, bid'dir. Bcl-2/bcl-x ve bax gen modülasyonu, p53 gen modülasyonundan daha komplikedir. p53 geni dışında bcl-2/bcl-x ve bax genlerini başka faktörler de modüle etmektedir. Bu proteinlerden birisi bag-1 proteinidir. Bu molekülün bcl-2 proteinine bağlandığı ve bcl-2'nin, bax'a olan afinitesini arttırdığı bilinmektedir.¹¹³ Bcl-2 gen ailesinin bir diğeri üyesi olan bad, bcl-x proteinine bağlanmaktadır ve bcl-x ve bax'ın ayrılmasını sağlamaktadır.¹²⁹

Bcl-2 ve bax ile ilgili yapılan çalışmalar, bu ailenin farklı antiapoptotik mekanizmalara sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bazı çalışmalarda bcl-2'nin reaktif oksijen radikallerini tutarak etki gösterdiği savunulmaktadır.⁵⁵ Bir çalışmada ise, bcl-x geninin, mitokondri dış zarında şişme ve rüptüre engel olduğu savunulmaktadır.¹²² Bunun mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bcl-x ve bax proteinlerinin her ikisinin de mitokondrinin iç zarında bulunan ve por oluşumuna katkıda bulunan proteinlerle etkileşime girdiği düşünülmektedir. Bu por yapısı ve

mitokokondriyal membran permabilitesi, apoptotik süreçteki bir çok mekanizmayla yakından ilişkilidir.

Bu mekanizmalar dışında bcl ailesinin bir diğer koruyucu etkisi, bcl-x'in proteolitik kaspaz kaskadını inhibe etmesi ile ilişkilidir.¹ Bu durum, bcl-x'in Apaf-1 olarak adlandırılan düzenleyici proteine bağlanması sonucu oluşmaktadır. Bu molekül kaspaz sistemi aktivasyonu için oldukça gereklidir. Retina ganglion hücrelerinde; p53 ve bcl-2 gen ailesinin retinal iskemi sonrasında aktif olarak apoptotik hücre ölümünde rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.¹⁰² Fakat gelişimsel apoptozisde ve optik sinir hasarında ortaya çıkan retina ganglion hücre ölümünde daha çok bax proteini suçlanmaktadır.⁵¹

Bcl-2 ailesinin mitokondri üzerindeki etkileri:

Bid'in kırılması: Bid, bak ve bax gibi pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyeleri normalde hücrelerde sessiz halde bulunurlar. Bu proapoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c'nin stoplazmaya salıverilmesini sağlarlar. Bid'in kırılmasına, dolayısıyla aktifleşmesine, yol açan etken kaspaz-8'in aktivasyonudur. Aktif kaspaz-8, bid'i kırar; böylece, 15 kDa'luk bir karboksi terminal fragmanı oluşur. Bid ayrıca diğer hücre yüzey ölüm reseptörleri olan TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşir. Bid'i "knock out" yapılmış fare hepatositlerinde TNF veya anti-Fas ile apoptozis indüklenmeye çalışılırsa, bu farelerde apoptozis oluşmaz. Bu deney, bid'in hücre yüzey ölüm reseptörlerinden gelen apoptotik sinyalin mitokondriye iletilmesinde rol aldığını, böylece ölüm reseptörleri ile mitokondrinin bağlantısını sağladığını göstermektedir. Oluşan bid fragmanı BH3 bölgesine sahip olduğundan diğer proapoptotik bcl-2 ailesi üyelerle interaksiyona girerek onların normalde buldukları stoplazmadan mitokondriye geç etmelerine (aktivasyonlarına)

neden olur. Bu aktivasyon sonucu, sitokrom c saliverilir. Bid karboksi terminal fragmanı ayrıca, bak-düzenlemeli sitokrom c saliverilmesini de aktifleştirir.¹²⁴

Bad'ın defosforilasyonu: Bad, birçok normal hücrede bulunmaktadır. Bad'ın diğer bcl-2 ailesi üyeleriyle kompleks yapması fosforilasyon-defosforilasyon mekanizması ile düzenlenir. Normal koşullarda, bad yaşam faktörlerinin etkisiyle, serin-treonin kinaz Akt/PKB yolu aracılığıyla fosforile durumda tutulur. Fosforile durumda iken antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturamadığından onları etkisizleştirir. Yani, sitokrom c tutucu etkilerini antagonize edemez. Eğer defosforile olursa (örn., yaşam faktörlerinin eksikliği gibi bir nedenle) antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturarak antiapoptotik (sitokrom c tutucu) etkilerini ortadan kaldırır. Böylece sitokrom c saliverilmesi gerçekleşir.

Bim'in mikrotübüllerden saliverilmesi: Bim, normalde mikrotübüllerle ilişki içinde olan dynein motor kompleksi ile birlikte bulunur. Apoptozis indüksiyonu esnasında mitokondriye göç eder. Pro-apoptotik aktiviteye sahiptir.

Kaspaz Sistemi:

Kaspazlar (Caspase= Cysteine Aspartyl-specific **Protease**), sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar. Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Böylece bir kaskad şeklinde işlerler.¹⁰⁴ Yapısal olarak bütün kaspazlar NH₂ terminal bölgesi ve farklı motiflerde aminoasit zinciri taşıyan 20 ve 10 kDa ağırlığında 2 proteaz sahası taşır. Bu proteaz alanındaki sekans benzerlikleri gözönüne alınarak kaspazlar 3 sınıfa ayrılmıştır:¹¹⁷

1-ICE (IL-1 Converting Enzyme) alt ailesi: Kaspaz-1, 4, 5, 11'i içerir. İnflamatuar sitokin matürasyonunda rol alırlar.

2-Başlatıcı kaspazlar: Kaspaz-2, 8, 9, 10'u içerir. Bu kaspazlar efektör kaspazları aktive edici fonksiyon görürler.

3-Efektör kaspazlar: Kaspaz-3, 6, 7'dir. Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler "effectors" olarak bilinirler.

Kaspazların sınıflandırılması:

Kaspaz-1 (ICE)

Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)

Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)

Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICE_{re11})

Kaspaz-5 (ICE_{rel11}, TY)

Kaspaz-6 (Mch2)

Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)

Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)

Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)

Kaspaz-10 (Mch4)

Kaspaz-11 (ICH-3)

Kaspaz-12

Kaspaz-13 (ERICE)

Kaspaz-14 (MICE)

Kaspazların aktivasyonu:

İnaktif formdaki kaspazlar kınılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da kaspaz-9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in indüksiyonu ise sitokrom c'nin mitokondriden saliverilmesi ile gerçekleşir. Apaf-1'in

oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir. Bcl-x proteininin, Apaf-1 proteinine bağlanarak, Apaf-1'in sitokrom ile kompleks oluşturduğu ve dolayısı ile kaspaz aktivasyonunu engellediği düşünülmektedir. Fakat, PT por oluşumu ve reaktif oksijen radikalleri oluşumu; bax ile kaspaz inhibisyonu sağlansa bile engellenememektedir.

Mitokondriden ayrıca AIF salıverilir. Bunlar henüz bilinmeyen bazı nükleazları aktifleştirerek DNA degradasyonuna yol açarlar ama bunların nükleusta yol açtığı morfoloji değişikliği apoptozisde tipik olarak görülen tipde değildir. Daha ziyade, net olarak seçilebilen sınırlardan ziyade düzensiz sınırlı ve periferik yerleşimli dağınık nükleus parçaları şeklindedir. Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Bu durumda farklı dokular için farklı kaspazların aktivasyonu yoluyla apoptozisin gerçekleştiği düşünülebilir. Örneğin, periferik T hücreleri ultraviole ile indüklenmiş apoptozise gitmek için ne kaspaz-3'e ne de kaspaz-9'a gereksinim duyarlar. Oysa, embriyonik stem hücreler bu durumda her iki kaspaza da gereksinim duyarlar. Hatta hücrelerin değişik farklılaşma derecelerinde değişik kaspazların aktivasyonuna gereksinim duyulabilir. Örneğin, periferik T hücreleri Fas'ın aktivasyonuna yanıt olarak gelişen apoptozisde kaspaz-3'e gereksinim duyarlar ama timositler kaspaz-3 eksikliğinde yine Fas'la indüklenen bir apoptozise gidebilirler.

Apoptotik hücre ölümünün aşamaları:

Apoptozis hücre dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sonuçlanır. Aşamaları:

1-Apoptozisin başlatılması

2-Hücre içi proteazların (kaspazlar) aktivasyonu

3-Hücrede morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması

4-Fagositoz'dur.

1-Apoptozisin başlatılması:

Hücrenin apoptozise gidebilmesi için ilk önce ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içi veya dışından gelebilir.

-Hücre dışından kaynaklanan sinyaller

*Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği: Hücreler çevre hücrelerden ve ekstrasellüler matriksten gelen yaşam sinyallerine, büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Büyüme faktörlerine bağımlı hücrelerin kültürlerinde büyüme faktörleri çekildiği zaman hücre metabolizmalarında ani bozulmalar ve hücre siklusunda duraklamalar izlenir.

* Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (reseptör ligand etkileşimi): Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak apoptozisi harekete geçiren sinyaller üretebilirler.³¹ Apoptozisde rol alan membran reseptörleri arasında en önemli grup TNFR ailesidir. Bu ailenin apoptozisi veya proliferasyonu ya da her ikisini uyaran etkiye sahip en az 19 üyesi vardır. TNFR ailesi içinde apoptoz oluştururan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR 1'dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında hücrenin stoplazmasında bulunan parçaları adaptör proteinlere bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptozis için başlatıcı olan kaspazlara bağlanır.

* Fas-Fas Ligand aracılı apoptozis: Bu tip apoptozis hücre yüzey reseptörü olan Fas (CD-95, APO-1) aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörün hücre içinde bulunan parçası Fas adaptör proteinle (FADD) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini (death induced signal complex = DISC) oluşturur. Bu da prokaspaz-8'in aktifleşmesini sağlar.⁸⁸

Fas ligand membrana bağlı veya solubl olabilir. Solubl Fas ligand (FasL, CD-95L) immün sistem tarafından oluşturulur. Bu ligandın T hücreleri membranında bulunan Fas reseptörüne bağlanması ile immün reaksiyonla aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositlerin yok edilmesi sağlanmış olur.⁵³

* TNF aracılı apoptozis: Bir sitokin olan TNF'nin TNF reseptörleri ile birleşmesi (örn. TNRF-1) sonucunda reseptörün hücre içerisinde bulunan parçası TNRF adaptör protein (TRADD) ile etkileşir.⁴⁹ TRADD daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz-8'i aktifleştirerek apoptozise neden olur.^{48,71}

-Hücre içinden kaynaklanan sinyaller: DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptozise götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir.

2-Hücre içi proteazların (kaspazlar) aktivasyonu:

Ölüm reseptörleri, adaptör proteinler aracılığı ile, iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile başlatıcı kaspazları aktive ederler.³⁷ Aktive olan başlatıcı kaspazlar da zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler. İç sinyaller ile oluşan apoptoziste daha önce de belirtildiği gibi mitokondri önemli rol oynar. Birçok proapoptotik molekül (sitokrom c, kaspaz-2, 3, 9 zimogenleri) mitokondrinin iç ve dış zarı arasında bulunur.^{75,80}

Sinyaller dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına sebep olur. Bu zarın geçirgenliği daha önce de belirtildiği gibi bazı proteinlerce ayarlanmaktadır. Geçirgenlik artışı mikokondri iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole olmasına neden olur. Sitokrom c nin salınımı bcl protein ailesi tarafından regüle edilir.³⁷ Bu ailenin bcl-2 ve bcl-x üyeleri antiapoptotik olup sitokrom salınımını önlerken proapoptotik olanları (bax, bid) tersi etkide bulunur.^{54,76} Sitokrom c sitozolde apaf-1, prokaspaz-9 ve ATP ile birleşir ve apoptozom adı verilen üniteyi oluşturur.¹⁰⁹ Bu birleşme ile aktif hale geçen kaspaz-9, sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive eder.⁷⁵

Memeli hücrelerinde bu güne kadar 60'dan fazla kaspaz substratı olan protein saptanmıştır (Tablo I). Aktif kaspaz-3, 6, 7 bu proteinlerin klivajı sonucu fonksiyonları aktive veya inaktive olur. Bu proteinlerin büyük bir kısmı apoptozisin regülasyonu ve infazında rol alırken, bir kısmı da proinflamatuvar sitokin prekürsörleridir.

Tablo I: Kaspaz substratları

<u>Hücre ölüm proteinleri</u>	<u>Transkripsiyon faktörler</u>
Bcl-2,	Heat shock factor,
Bcl-xl,	NF-Kb,
Prokaspases,	Sp1
Seramid-A,	<u>Hücre siklus regülatörleri</u>
P35	Cyclin A
<u>Hücre iskelet proteinleri</u>	Cdc 27
Aktin,	Mdm 2
fodrin,	Retinoblastom protein
gelsolin,	<u>Diğer</u>
lamin,	Heat shock protein 90,
keratin	Phospholipase A2
<u>DNA metabolizması</u>	Transgluthaminase
DNA dependent protein kinaz,	Calpastatin
PARP,	<u>Sitokin prekürsörleri</u>
Topoizomeraz,	Pro IL1 β , 16, 18

3-Hücrede morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması:

-Biyokimyasal Değişiklikler

DNA kırıkları oluşumu: Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz (Caspase activated DNAase (=CAD) = DNA fragmentation factor (=DFF)) ile bağ yapan bir proteindir (=ICAD=Inhibitor of caspase-activated DNase).²⁸ Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirir. Çekirdek içine giren Ca^{++} Mg^{++} bağımlı endonükleaz DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomlar arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir, 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur.⁷⁸

Hücre iskeletinin yıkılması: Gelsolin aktini depolimerize eden bir enzimdir ve kaspaz-3 tarafından aktive edilir. Aktin flamanlarının yıkılması ile hücre normal şeklini kaybeder. Gelsolin deficient nötrofillerin klasik apoptozis morfolojik değişikliklerini çok geç gösterdikleri belirlenmiştir.⁶² Yıkılan aktinin sonucunda apoptotik hücre komşu hücre ve bazal membrandan ayrılır.¹²⁶

Hücre membran değişikliği: Kaspazların etkisiyle hücre membran asimetrisi bozulur. Plazmalemma iç yüzeyindeki fosfotidilserin yer değiştirerek membranın dış yüzüne yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre membranlarında trombospondin denilen adeziv bir glikoprotein ve ICAM 3 gibi adezyon molekülleri içerirler. Bütün bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositlerce tanınıp fagositozunu sağlar. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerde oluşan çapraz bağlanmalar membranın parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar.⁸³

-Morfolojik değişiklikler:

Hücreler özelleşmiş yüzey yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler ve büzülürler. Stoplazmanın yoğunlaştığı organellerin

birbirine yakınlaştığı izlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Organeller genel olarak sağlamdır. Mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar. Bazen ribozomlarda çökme izlenebilir.

En önemli değişiklik çekirdekte izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak çöker. Elektron mikroskopta bakıldığında kromatinin yoğun granüler yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Çekirdek de hücre gibi büzülür.

Apoptozis hematoksilen eozinle boyanmış kesitlerde ışık mikroskopik seviyede de izlenebilir. Hücreler koyu eozinofilik stoplazmalı, bir veya birkaç parçalı piknotik çekirdekli olarak görülür. Çekirdek, kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarım ay şeklinde izlenebilir. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde stoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara apoptotik cisim adı verilir. İçlerinde stoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur.

4-Fagositoz:

Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınması mümkün olmakta ve fagosite edilerek dokudan temizlenmesi sağlanmaktadır.

Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemler:

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa,

günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır:

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri (ışık mikroskobu, floresan mikroskobu / lazerli konfokal mikroskop, elektron mikroskobu, faz kontrast mikroskobu)
2. İmmunohistokimyasal yöntemler (Anneksin V yöntemi, TUNEL yöntemi, M30 yöntemi, kaspaz-3 yöntemi)
3. Biyokimyasal yöntemler (agaroz jel elektroforezi, western blotting, flow sitometri)
4. İmmunolojik yöntemler (ELISA, fluorimetrik yöntem)
5. Moleküler biyoloji yöntemleri (DNA Microarrays)

KAPTOPRİL

Anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde (hipertansiyon, kalp yetmezliği, koroner arter hastalığı) sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlardan kaptopril hipertansiyon tedavisinde oral olarak kullanılan ilk ACE inhibitörüdür.⁹⁰ Renin anjiotensin sisteminin ana etkisi kan basıncı kontrolü, renal hemodinami ve homeostazis üzerindeki etkileri iyi bilinen anjiotensin II üzerinden olmaktadır. Anjiotensin II ise inflamasyon,

fibrozis, hücre büyümesi üzerinde etkileri olan bir oktapeptiddir. Yapılmış birçok çalışmada kaptoprilin antiinflamatuvar ve immünregülatör fonksiyonu olduğu gösterilmiştir.^{3,50,94} Kaptopril de dahil olmak üzere ACE inhibitörlerinin deneysel olarak oluşturulan otoimmün ensefalomyelit, miyokardit ve kolitte yararlı oldukları bulunmuştur.^{19,35,52} Ayrıca anti tümöral, anti fibrotik ve sitoprotektif etkileri olduğu da gösterilmiştir.^{87,98,127}

Renin anjiotensin ve kallikrein-kinin sistemleri endotel hücrelerinde iyi tanımlanmışlardır.^{114,121} ACE inhibitörleri aynı zamanda bradikinin degradasyonunu sağlayan kininaz aktivitesini de inhibe ederler. Böylece bradikinine bağlı fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucu vazodilatatör etkili prostanooidlerin artışı sağlanmış olur. Ayrıca bradikininin lokal artışı ile endotelial B2 reseptörleri uyarılarak endotel hücrelerinden nitrik oksit salınımı da sağlanmış olur. Bu da vazodilatatör etkiye katkıda bulunmaktadır. Kaptopril kallidin benzeri peptid yapısını arttırarak rat kalbinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarını önlediği gösterilmiştir.^{77,92} Çeşitli çalışmalarda kaptoprilin yapısında bulundurduğu sülfidril grubu ile aynı zamanda serbest radikal tutucu özelliği olduğu ortaya konmuştur.^{6,18,34,86,95} Kaptoprilin bu doku koruyucu etkisi yapısında bulunan sülfidril grubunun iskemi sonrasında oluşan tiol gruplarını bağlamasıyla olmaktadır. Ratlarda iskemi reperfüzyon sonrası oluşturulan aritmilere karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.¹⁰ Kaptoprilin tavşanlarda FeCl3 ile oluşturulan lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve endotel hücrelerinde oksidatif stresle oluşturulan apoptozis modelinde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir.¹³¹

İLOPROST

İloprost uzun süreli vasodilatasyon yapan bir prostasiklin analogudur. Prostatiklin (PGI₂), endojen olarak üretilen ve esas olarak vasküler sistemin endotel hücrelerinde araziidonik asitten

prostasiklin sentetaz aracılığı ile sentezlenen bir maddedir. Doku koruyucu fonksiyonlarının olduğu bildirilmiştir.²² PGI2 vasküler düz kas hücrelerinde adenil siklaz enzimini aktive ederek hücre içi cyclic adenosine monophosphate (cAMP) artışına, bu da vazodilatasyona neden olur. Mikrovasküler sistemde vazokonstriktif etkisi olan tromboksan A2 ve PGI2 arasında bir denge bulunmaktadır. PGI2 aynı zamanda mikrovasküler kan akışının düzenlenmesinde, trombosit agregasyonunun inhibe edilmesinde önemli rol oynar. Ancak prostasiklinin kullanımı, fizyolojik pH'daki solüsyonlarda kimyasal instabilitesi ve in vivo metabolik instabilitesi (yarı ömrü 3 dk.) nedeniyle sınırlı kalmıştır.

İloprost oldukça benzer farmakokinetik özellikleriyle birlikte stabil bir PGI2 analogudur.⁶³ Yapısının değiştirilmesiyle iloprost 30 dakikalık bir plazma yarılanma ömrüne kavuşarak büyük bir metabolik ve kimyasal stabilite kazanmıştır. Böylece iloprost prostasiklinlerde olduğu gibi doku koruyucu ve antiagregan özellikleri kazanmış olmaktadır.^{22,58} İloprostun ADP, epinefrin ve trombin ile oluşturulmuş platelet agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş ve bu etkisinin hücredeki cAMP düzeyini artırarak adenyl cyclase aktivasyonu sağladığı bildirilmiştir.³⁰ İloprost aynı zamanda plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1)'in trombositlerden salınımını inhibe etmektedir.²¹ Ayrıca iloprostun prostasikline göre daha az hipotansif etkisi olduğu ve daha etkili bir antiagregan olduğu da bildirilmiştir.^{30,107} İlacın intravenöz uygulamadaki hemodinamik etkileri (vasküler dirençte azalma, arter basıncında azalma, taşikardi) doz bağımlı olmaktadır.⁵⁸ Çeşitli hayvan deneylerinde topikal uygulanan iloprostun göz içi basıncını düşürdüğü de gösterilmiştir.^{40,45,46}

Klinikte iloprostun pulmoner arteriyel hipertansiyonda inhaler yolla kullanımı FDA tarafından onaylanmıştır. Bu hastalardaki egzersiz intoleransını azaltmaktadır.⁴⁴ Ayrıca anjina pectoris hastalarında egzersiz kapasitesini arttırmak,¹³ kemik iliği ödemi sendromunda ağrıyı azaltmak,⁴ kolesterol emboli sendromu olgularındaki distal ekstremité iskemisini düzeltmek²⁷ ve

heparin tedavisine bağılı platelet agregasyonunu inhibe etmek^{2,56} amacıyla kullanılmıştır. Diğer vazodilatör tedavilere dirençli ergotizmde⁹⁶ ve postoperatif kalp yetmezliğinin tedavisinde⁶⁷ etkili olduğu gösterilmiştir. Yaşa bağlı makula dejenerasyonlu 5 olgunun iloprost ile 6 aylık tedavisi sonucunda uzun süreli görme fonksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir.³² Periferik vasküler hastalıklarda antitrombotik ve muhtemel fibrinolitik aktiviteyi artırıcı etkisinden dolayı 1-3 ng/kg/dk dozunda infüzyon şeklinde kullanımının yararlı olduğu gösterilmiştir.^{8,89} Ayrıca konnektif bağ dokusu hastalığına bağlı olarak gelişen Raynaud's fenomeninde standart doz iloprost (2 ng/kg/min) tedavisi sonrası bile 10 hafta boyunca parmaklara olan kan akımının arttığı gösterilmiştir.¹¹⁸ Tromboanjitit obliterans hastalarında dinlenme sırasındaki ağrıyı ve amputasyon gerekliliğini azaltmaktadır. Skleroderma olgularında günlük infüzyonlarla sklerodermaya bağlı semptomlarda azalma bildirilmiştir.⁹ İloprostun pyoderma gangrenosum gibi diğer tedavilere dirençli deri ülserlerinde yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir. Vazospazma bağlı böbrek yetmezliği olan bir olgunun tedavisinde de etkili bulunmuştur.⁷³ Septik şokta mikrosirkülasyonu olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir.⁷²

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu kurallarına uygun olarak gerçekteşirilmiştir.

Bu çalışmada 5 haftalık ve ağırlıkları 200-250 gr. olan 24 adet erkek Wistar rat kullanıldı. Deney 24 °C'lik sabit oda sıcaklığında yapıldı. Ratlara cerrahi girişim öncesi genel anestezi sağlamak için 1.2-1.4 gr/kg Urethane intraperitoneal olarak uygulandı. Takiben tüm hayvanlara boyun diseksiyonu yapılarak internal karotid artere ulaşıldı. Ratlar rastgele dört gruba ayrıldı.

Grup 1 kontrol grubu, grup 2 iskemi reperfüzyon (İR) grubu, grup 3 İR + kaptopril grubu ve grup 4 İR + iloprost grubu olarak belirlendi. Her grup 6 ratın 12 gözünden oluşmaktaydı. Ratların herbir karotid arterinin altından 5-0 ipek sütür geçirildikten sonra kontrol grubu hariç olmak üzere sağ karotid artere 30-gauge iğne yardımıyla grup 2'ye 0.1 ml serum fizyolojik, grup 3'e 1 mg/kg/0.1cc dozda kaptopril ve grup 4'e 1 µg/kg/0.1ml dozda iloprost enjeksiyonu yapıldı. Bu aşamada damar endotelinin hasar görmemesine özellikle dikkat edildi. Daha sonra yine kontrol grubu hariç olmak üzere sütürün iki ucu önceden hazırlanmış silikon tüpün içinden geçirilerek arterde oklüzyon sağlanacak şekilde silikon tüpün dış ucunda kleplendi. 30 dakikalık iskemiden sonra sütür gevşetilerek 90 dakika boyunca reperfüzyon sağlandı. Takiben intraperitoneal olarak uygulanan yüksek sodyum pentobarbital (0.8 ml; 60 mg/ml) ile ötenazi uygulandı. Kantotomi ve optik sinirin kesilmesini takiben tüm ratların her iki gözü de enükle edildi. Globlar % 10 formaldehit solüsyonunda tespit edilerek çalışma anına kadar +4 °C'de bekletildi.

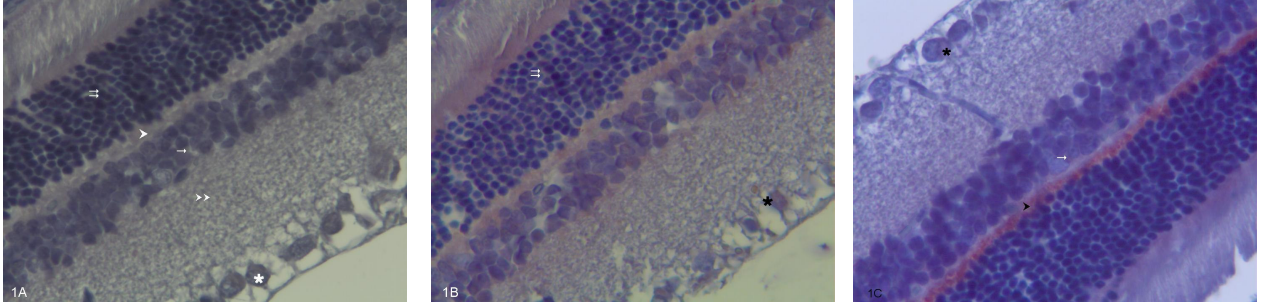
İMMÜNOHİSTOKİMYA

İmmünohistokimya yapılacak ve hematoksilen ile boyanacak olan dokular fiksasyon için % 10'luk nötral formolin solüsyonunda 72 saat tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokular ışık mikroskop takip yönteminden geçirildiler. Dokular önce 24 saat boyunca akarsuda yıkandı. Ardından % 50, 60, 70, 80, 90, 96 ve 100'lük etil alkolde birer saat boyunca dehidrate edildi. Daha sonra absöü alkol ve sedir yağı (1:1) karışımında 1 saat bekletilen dokular gece boyunca sedir yağında şeffaflandırıldı. Ksilon serisinden geçirilen dokular etüv içinde ksilol ve parafin karışımında (1:1) 1 saat, ardından parafinde 6 saat bekletildikten sonra bloklandı. İmmünohistokimyasal çalışma için parafin bloklardan polylizinli camlar üzerine 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Camlar ksilol ve alkol ile deparafinize ve dehidrate edildikten sonra

doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasının sağlamak amacıyla 1 M citrate buffer (Lab Vision, USA) ile mikrodalgada retriver işlemi gerçekleştirildi. Takiben, %3'lük hidrojen peroksit (Lab Vision, USA) ile endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (phosphate buffer saline) (LabVision, USA) (pH7.4) ile camlar yıkandı. Devam eden işlemlerde LabVision anti-rabbit kit kullanıldı. UltraV block ile non-spesifik bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra camlar yıkanmadan üç gruba ayrıldı. 1. gruba kaspaz-3 primer antikoru (poliklonal anti-rabbit Ig Ab-4, Lot: 1197 P 305 D), (NeoMarker, USA) 2. gruba kaspaz-8 primer antikoru (poliklonal anti-rabbit Ig Ab-4, Lot: 1200P304 D), (NeoMarker, USA), 3. gruba kaspaz9 (poliklonal anti-rabbit Ig Ab-4, Lot: 1205P306 D), (NeoMarker, USA) uygulanarak 1 saat oda ısısında bekletildi. Süre sonunda PBS ile yıkanan camlara biyotinli sekonder antikor eklenerek primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar streptavidin-biyotin enzim kompleksine etkin bırakıldı, böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Son olarak ortama AEC (Lot: AHA 51011) (Lab Vision, USA) kromojeni eklenerek gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksileni kullanıldı. Negatif boyama primer antikor aşamasında yapıldı. Bu şekilde boyanan camlar ultramount yardımı ile lamelle kapatılıp, foto ışık mikroskopta değerlendirildi. Preparatlarda retina katlarındaki morfolojik değişiklikler ve büyük büyütme alanlarında (x400) boyanan stoplazma belirlenerek apoptozisin varlığı saptandı. Deney grupları arasındaki kaspaz 8, 9 ve 3 aktivite farkları arbitrary unit ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

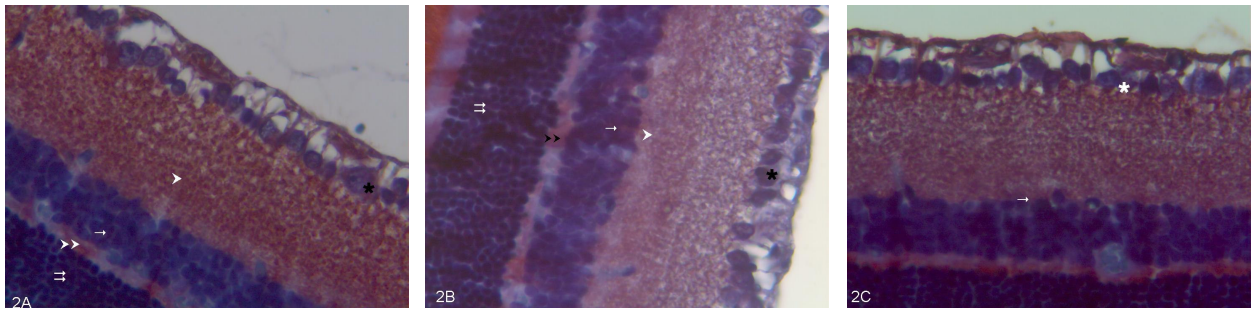
BULGULAR

Kontrol grubunda tüm retina katmanları değerlendirildiğinde yapı normal olarak gözlemlendi. Kaspaz-8 tutulumu (Resim 1A) izlenmezken, dış nükleer tabakayı oluşturan hücrelerde ve yer yer gangliyon hücrelerinde minimal düzeyde kaspaz-9 (Resim 1B) tutulumu izlendi. Kontrol grubuna ait kaspaz-3 (Resim 1C) tutulumu değerlendirildiğinde ise hücresel düzeydeki tutulumun çok daha zayıf olduğu, immünreaktivitenin iç nükleer tabaka hücrelerinin özellikle bazaline yerleşim gösterenlerde minimal düzeyde ve sinaptik bölge olan dış pleksiform tabakasında olduğu dikkati çekti. Yer yer gangliyon hücrelerinde zayıf tutulum izlendi.



Resim 1: Kontrol grubunda retina katmanlarındaki kaspaz-8, 9 ve 3 tutulumu. Kaspaz-8 tutulumu (soldaki resim, 1A) dış pleksiform (➤), iç pleksiform (➤➤), iç nükleer (→), dış nükleer (⇨) ve gangliyon hücre (✱) tabakalarında izlenmezken kaspaz-9 tutulumu (ortadaki resim, 1B) dış nükleer tabakayı oluşturan hücrelerde (⇨) ve yer yer gangliyon hücrelerinde (✱) minimal düzeyde görülüyor. Kaspaz-3 tutulumunun (sağdaki resim, 1C) ise iç nükleer tabaka (→) hücrelerinin özellikle bazaline yerleşim gösterenlerde ve dış pleksiform tabakada (➤) olduğu, gangliyon hücrelerinde (✱) ise bu tutulumun daha zayıf kaldığı görülüyor. (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, x 400).

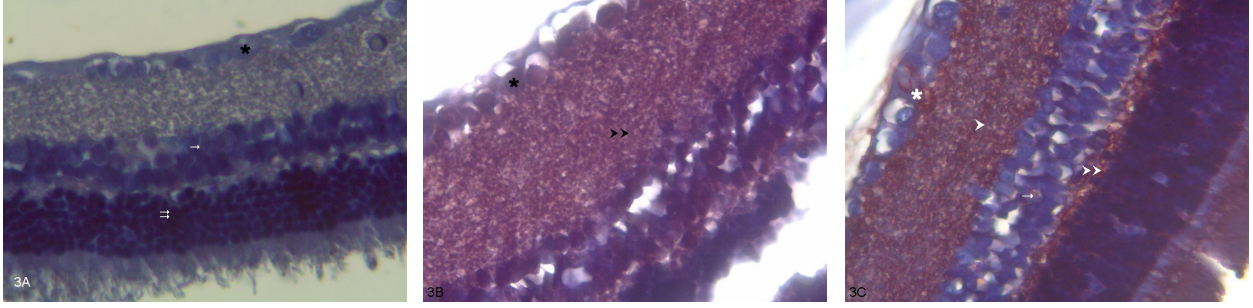
İskemi ve reperfüzyon uygulanan grupta gangliyon hücrelerindeki belirgin intrastoplazmik ödem dikkat çekiciydi. Bu grupta kaspaz-8 tutulumunun çok belirgin şekilde arttığı gözlemlendi. İç ve dış nükleer tabakada çekirdek çevresindeki tutulumun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında değişiklik göstermediği gözlenirken sinaptik alanlar olan iç ve dış pleksiform tabakada kuvvetli kaspaz-8 immünreaktivitesi olduğu görüldü. Yine kontrol grubundan farklı olarak gangliyon hücrelerinde bazal hücre zarı ve çevre stoplazmasında çok daha belirgin olmak üzere kuvvetli boyanma saptandı (Resim 2A). Retina genelinde kaspaz-9 tutulumu aynı grubun kaspaz-8 tutulumuna göre daha orta dereceli olarak bulundu. İç ve dış nükleer tabakalarda zayıftan ortaya değişen kaspaz-9 immünreaktivitesi izlenirken iç ve dış pleksiform tabakadaki tutulum daha zayıftı. Gangliyon hücrelerinde ödem nedeniyle çekirdek çevresindeki stoplazmada açılmalar görüldü ve kaspaz-9 tutulumu son derece zayıftı (Resim 2B). İskemi ve referfüzyon grubunda kaspaz-3 tutulumu ise kaspaz-8 'e tamamen eşdeşti. Sinaptik alanlarda kuvvetli tutulum gözlenirken, iç nükleer tabakanın sinaptik alana bakan yüzünde yer yer ortadan kuvvetliye değişen tutulum dikkati çekti. Gangliyon hücre tabakasının da ise özellikle bazal stoplazmada ve hücre zarında ortadan kuvvetliye değişen tutulum dikkati çekti. (Resim 2C).



Resim 2: İskemi ve reperfüzyon uygulanan grupta kaspaz-8, 9 ve 3 tutulumu. Kaspaz-8 tutulumu (soldaki resim, 2A) iç (→) ve dış nükleer tabakada (⇔) kontrol grubu ile benzer görünüm sergilerken bu tutulumun iç (➤) ve dış pleksiform tabakada (➤➤) ve gangliyon hücrelerinde (★)

çok daha belirgin olduğu dikkati çekiyor. Aynı grupta kaspaz-9 tutulumu değerlendirildiğinde (ortadaki resim, 2B) iç (\rightarrow) ve dış (\Rightarrow) nükleer tabakalarda zayıftan ortaya değişen immünreaktivite izlenirken, iç (\blacktriangleright) ve dış pleksiform tabakalardaki ($\blacktriangleright\blacktriangleright$) ve gangliyon hücrelerindeki tutulumun daha zayıf olduğu görülüyor. Kaspaz-3 tutulumu (sağdaki resim, 2C) sinaptik alanlarda kuvvetli iken, iç nükleer tabakanın (\rightarrow) sinaptik alana bakan yüzünde ortadan kuvvetliye değişen tutulum izlenirken gangliyon hücre (\star) tabakasında özellikle bazal stoplazmada ve hücre zarında ortadan kuvvetliye değişen tutulum dikkati çekiyor. (İmmünperoksidaz & Hematoksilin, x 400).

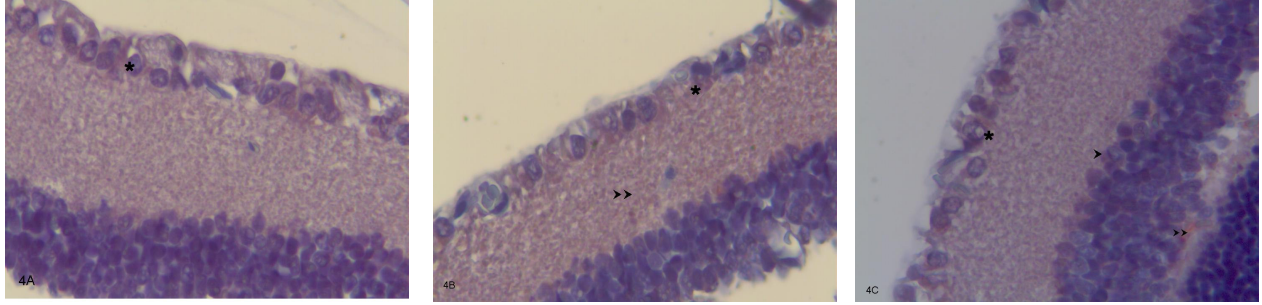
İskemi-reperfüzyon ile birlikte kaptopril uygulanan deney grubunda kaspaz-8 tutulumu değerlendirildiğinde dış nükleer tabakada tutulum gözlenmezken, iç nükleer tabakada minimal tutulum gözlendi. Bazı gangliyon hücrelerinde zayıf tutulum izlendi. Bu bulgular kaspaz-8 tutulumu açısından kaptopril uygulaması kontrol grubuyla benzerlik göstermekteydi (Resim 3A). Bu grupta kaspaz-9 tutulumu iskemi ve referfüzyon grubu ile karşılaştırıldığında doku genelinde tutulum belirgindi (Resim 3B). Bu grupta kaspaz-3 tutulumu değerlendirildiğinde ise iç nükleer tabakadaki hücrelerde ortadan kuvvetliye değişen immünreaktivite değerlendirildi. Aynı düzeydeki tutulum iç ve dış pleksiform tabakada gözlenirken iskemi ve referfüzyon grubundan ayrıcalık olarak gangliyoner hücre tabakasında tutulumun yer yer negatif yer yer zayıftan ortaya değişen düzeyde olduğu gözlendi. (Resim 3C).



Resim 3: İskemi ve reperfüzyon ile birlikte kaptopril uygulanan deney grubunda kaspaz-8, 9 ve 3 tutulumu. Kaspaz-8 tutulumu değerlendirildiğinde (soldaki resim, 3A) iç nükleer tabakada minimal (→) tutulum görülürken, dış nükleer tabakada (⇨) tutulumun olmadığı izlendi. Bazı gangliyon hücrelerinde (*) ise zayıf tutulum izlendi. Aynı grupta kaspaz-9 tutulumu (ortadaki resim, 3B) gangliyon hücrelerinde (*) ve iç pleksiform tabakada (▶▶) belirgin olarak izlenirken kaspaz-3 tutulumu (sağdaki resim, 3C) değerlendirildiğinde iç nükleer tabakadaki hücrelerde (→), iç (▶) ve dış pleksiform tabakalarda (▶▶) ortadan kuvvetliye değişmekteydi. Gangliyoner hücre tabakasında (*) ise tutulumun yer yer negatif, yer yer zayıftan ortaya değişen düzeyde olduğu görülüyor. (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, x 400).

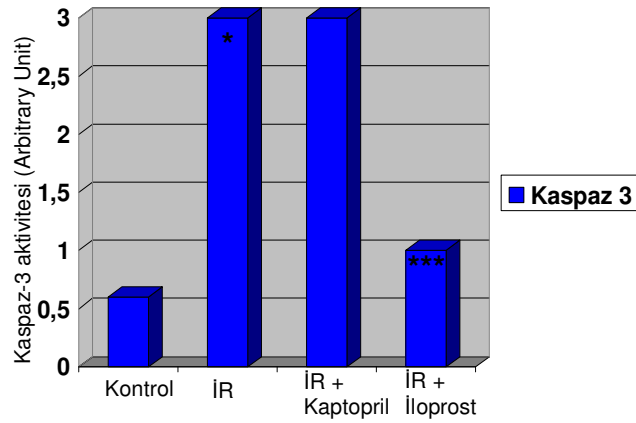
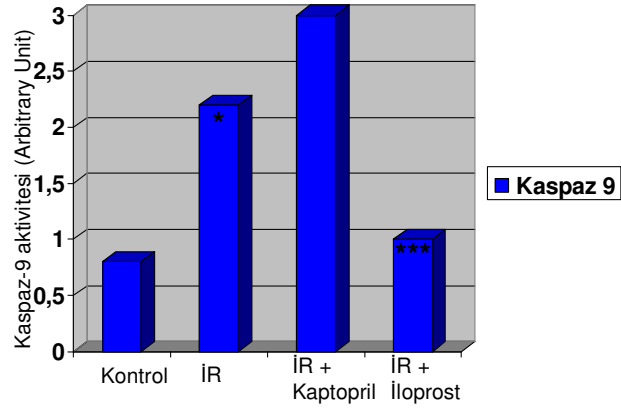
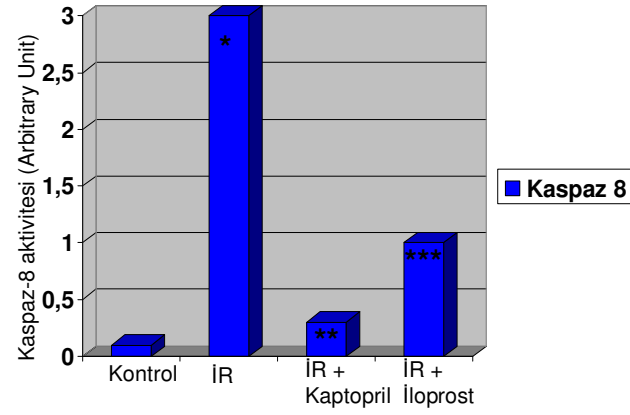
İskemi-reperfüzyon ile birlikte iloprost uygulaması yapılan grupta kaspaz-8 tutulumu değerlendirildiğinde gangliyon hücre tabakasında belirgin olmak üzere diğer gruplara göre tutulum zayıftı. Gangliyon hücrelerinde zayıftan ortaya değişen tutulum izlendi. Genel olarak kaptopril uygulamasına benzer özellik sergileyerek bu grupta tutulumun iskemi ve reperfüzyon grubuna göre çok daha zayıf olduğu izlendi (Resim 4A). Bu grupta kaspaz-9 tutulumunun kaspaz-8 tutulumuna benzer görünüm sergilediği dikkati çekti. Gangliyon hücre tabakasında zayıf immünreaktivite gözlemlendi. Dış pleksiform tabakada da yine zayıftan ortaya değişen kaspaz-9 immünreaktivitesi gözlemlendi (Resim 4B). Bu grupta kaspaz-3 tutulumu değerlendirildiğinde ise immünreaktivite zayıftan ortaya değişen düzeyde olduğu belirlendi. Tutulum en belirgin olarak

gangliyon hücre tabakası, iç ve dış pleksiform tabakaya komşu hücrelerde olduğu izlendi (Resim 4C).



Resim 4: İskemi ve reperfüzyon ile birlikte iloprost uygulanan deney grubunda kaspaz-8, 9 ve 3 tutulumu. Genel olarak bu gruptaki kaspaz-8 tutulumunun (soldaki resim, 4A) iskemi ve reperfüzyon grubuna göre çok daha zayıf ve gangliyon hücre tabakasında (*) zayıftan ortaya değişen düzeyde olduğu izlendi. Kaspaz-9 immünreaktivitesi (ortadaki resim, 4B) gangliyon hücre tabakasında (*) zayıf izlenirken, iç pleksiform tabakada (➤➤) zayıftan ortaya değişen tutulum görülüyor. Kaspaz-3 tutulumu (sağdaki resim, 4C) ise zayıftan ortaya değişen düzeyde gangliyon hücre tabakası (*), iç (➤) ve dış pleksiform tabakaya (➤➤) komşu hücrelerde izleniyor. (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, x 400).

Kaspaz-8 aktivitesinin iskemi reperfüzyon grubunda kontrol grubuna göre oldukça arttığı ancak bu artışın kaptopril ve iloprost uygulanan gruplarda iskemi-reperfüzyon grubuna kıyasla belirgin olmadığı görüldü. Yine kaspaz-8 aktivitesinin iloprost uygulanan grupta kaptopril uygulanan gruba kıyasla daha fazla olduğu izlendi. Sadece iskemi-reperfüzyon uygulanan gruba kıyasla, kaspaz-9 aktivitesi iloprost tarafından engellendi. Ancak kaptopril kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitesi üzerinde önemli bir etki göstermedi. Kaspaz-3 immünreaktivitesi iskemi reperfüzyon grubunda kontrol grubuna göre belirgin artış göstermektedir. Kaspaz-3 immünreaktivitesi kaptopril uygulanan grupta iskemi reperfüzyon grubu ile aynı olmakta ancak iloprost uygulanan grupta azalmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1: Retinada kaspaz 8, 9 ve 3 aktiviteilerinin deney gurupları arasında istatistiksel olarak karşılaştırılması. *Kontrol-İR, $p < 0.01$; **İR ve İR+Kaptopril, $p < 0.01$; ***İR ve İR+İloprost, $p < 0.01$. (İR:İskemi reperfüzyon)

TARTIŞMA VE SONUC

Retinanın geçici iskemisi nedeniyle retinada oluşan apoptozisin ortaya çıkan serbest radikaller sonucu olabileceği gösterilmiştir.^{111,112} Bu çalışmaların çoğunda iskemi süresinin 30 dakikanın üzerinde tutulması üzerinde durulmaktadır. Fakat yapılan bazı deneysel çalışmalarda 5-10 dakika gibi kısa süreli geçici iskeminin de retina tabakalarında apoptozu indüklediği ileri sürülmektedir.^{61,91,119}

Apoptozis hücrelerin kontrollü bir şekilde elimine edildiği bir hücre ölüm şeklidir. Gözde apoptozis normal retina gelişiminde,¹³⁰ retina dekolmanında,²⁰ glokomda,⁵⁹ herediter retina hastalıklarında,³⁹ makula dejenerasyonlarında,⁴³ üveitlerde¹⁴ ve retina iskemisinde^{64,101} gösterilmiştir.

Hipertansiyon ve konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan kaptopril angiotensin I'in kuvvetli vazokonstriktör angiotensin II'ye dönüşümünü sağlayan angiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörüdür. ACE bradikinini metabolize eden kininaz II enzimi ve opioid peptidleri metabolize eden enkefalinaz enzimi ile idantik olması nedeniyle kaptopril aynı zamanda kininaz II enzimini de inhibe ederek bradikininin metabolize olmasını bunun yanı sıra enkefalinazı inhibe ederek de enkefalinlerin metabolize olmasını önler. ACE siklooksijenaz enzimi ile ters yönde etki göstermesi nedeniyle kaptopril prostaglandin sentezini de artırır.¹⁶

Bu etkilerinin yanı sıra kaptoprilin immünmodülatör fonksiyonları olduğu da belirlenmiş bunun sonucu olarak romatoid artirit tedavisinde ve insülin-bağımlı diabetes mellitusun komplikasyonlarını önlemek amacı ile de kullanılmaktadır.^{7,33,65} Şistozomiazis, deneysel lupus hastalıkları ve deneysel otoimmün encephalomyelit ile oluşan inflamasyonun kaptopril ile inhibe

edildiği gösterilmiştir.^{19,115,125} Kaptoprilin bu etkinliğinin monosit/makrofaj-kaynaklı TNF, IL-1, IL-6, IL-12 gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşumunu baskılamasına bağlı olarak ortaya çıkar.^{3,70,93,105} Kaptoprilin immünmodulator etki mekanizmaları, antiproliferatif etkisi,¹⁰⁸ antioksidan aktivitesi,⁹⁹ metalloproteazları inhibe etmesi,¹⁵ prostaglanadin sentezini artırması¹⁷ ile açıklanmaya çalışılmıştır. Kaptoprilin bu tür etkilerinin yapısında bulunan tiol gruplarına bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.¹¹⁰

Kaptoprilin insan aktive edilmiş T hücrelerinde, akciğer epitel hücrelerinde Fas ile indüklenen apoptozisi inhibe ettiği gösterilmiş,^{24,123} bu inhibitör etkinin IL-2 sentezini önlemesine ve indüklenbilir kaspaz-3 aktivitesini azaltmasına bağlı olabileceği ileri sürülmüştür.¹²⁰ Buna karşın damar endotel hücrelerinde yapılan bir çalışmada, kaptoprilin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu önleyen glutatyon peroksidaz ve superoksid dizmutaz enzimlerinin etkinliğini azalttığı, ancak lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA düzeyini değiştirmedeği saptanmıştır.

Antikanserojen bir ilaç olan etopozidin, hem tümör hücrelerde hemde endotel hücrelerde apoptozisi indüklediği bilinmektedir. Etopozid kullanılarak in vitro ortamda endotel hücre kültürlerinde indüklenen apoptozu kaptoprilin önleyemediği gözlenmiştir. Bundan dolayı oksidatif stres veya apoptoz içeren klinik durumlarda endotelde koruyucu etkisinin olamayacağı ifade edilmiştir.⁷⁹

Yapmış olduğumuz bu çalışmada iskemi ve reperfüzyon sonrasında retinada kaspaz-8 aktivitesinin belirgin olarak arttığı saptandı. İskemi sırasında TNF α ve IL-1 β gibi proinflamatuvar sitokinlerde artış olmaktadır.^{41,42,132} Bu tür sitokinler, TNF reseptörleri ve diğer sitokin reseptörleri aracılığı ile, özellikle kaspaz-8 aktivitesini arttırmaktadır. Çalışmamızda gözlenen

kaspaz-8 artışı muhtemelen indüklenen sitokinler aracılığı ile ortaya çıktı. Buna karşın kaptopril verilen hayvanlarda kaspaz-8 aktivitesinin önemli derecede engellendiği tespit edildi. Bu durum kaspaz-8 aktivitesini tetikleyen bir mekanizmanın, kaptopril tarafından inhibe edildiğini göstermektedir. Bu tür bir mekanizmanın varlığının moleküler olarak ortaya çıkartılması için kaspaz-8 yolundaki bütün biyokimyasal reaksiyonların tek tek ele alınarak incelenmesi gerekir. Bu da onlarca deney gurubu hayvanın kullanıldığı ve bir çok test sistemini gerektiren bir çalışmanın gerçekleştirilmesi anlamına gelir.

İskemi reperfüzyon sırasında oluşturulan oksidatif stresin kaspaz-9 ve daha sonra kaspaz-3 aktivitesini de arttırdığı diğer araştırmacıların yaptığı çalışmalarla gösterilmiştir.^{111,112} Kaspaz kaskadındaki 9 ve 3 yolu aracılığı ile başlatılan apoptozun, reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species: ROS) aracılığı ile ortaya çıkartıldığı bilinmektedir.²⁹ Deneylelerimiz sırasında iskemi-reperfüzyon ile oluşturulan stres aynı zamanda kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitelerini de arttırdı. Ancak kaptopril verilen hayvan gurubunda kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitesinin engellenmediği, tam tersi kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitesinde göreceli bir artış olduğu belirlendi. Bu gözlem kaspaz kaskadının 9 ve 3 yolu üzerinde kaptoprilin herhangi bir etki göstermediğini, dolayısıyla iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan ROS üzerinde nötralizan bir etkiye sahip olmadığını ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada kaptoprilin sülfhidril (-SH) gurupları içerdiği ve kimyasal olarak test tüpünde SH gurupları sayesinde hidrojen peroksiti nötralize ederek ortadan kaldıracılabileceği düşünülmüştür.⁵ Ancak kardiyak miyositlerle yapılan bir araştırmada ise kaptoprilin bu etkisini göstermediği saptanmıştır.⁸⁴ Yapılan bir klinik denemede 50 mg kaptopril alan insan serumunda yapılan ölçümlerde, kaptoprilin ROS aracılığı ile antioksidan bir özellik taşıyamayacağı gösterilmiştir.⁶⁸ Bu durumu destekleyen diğer bir çalışmada ise demir (Fe) ve bakır (Cu) varlığı gibi bazı durumlarda kaptoprilin prooksidan özellik

gösterebildiği ve kendisinin oksidatif strese neden olabileceği bildirilmiştir.⁶⁹ Daha önce de bahsedildiği gibi kaptoprilin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu önleyen glutatyon peroksidaz ve süperoksid dizmutaz enzimlerini inhibe ettiği ve artan serbest radikallerin kaspaz-9'u aktive etmesine bağlı olarak kaspaz-9 ve dolayısıyla kaspaz-3 seviyelerinde bir artış oluşturabildiği bilinmektedir. Araştırmamızın bulgularını destekleyen bu durumlar göz önüne alınırsa, kaptoprilin bu tür beklenmeyen özellikleri, kaptopril uygulanan gruptaki hayvanlarda kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitelerinde gözlenen göreceli artışa bir açıklama kazandırmaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma kaptoprilin sadece kaspaz-8 üzerine etkili olduğu, iskemi-reperfüzyon sonrası serbest oksijen radikallerini artırarak kaspaz-9 ve dolayısıyla kaspaz-3 aktivitelerini potansiye ettiğini göstermektedir. Bu bulgular kaptoprilin retinayı iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu bir etkisinin olmadığını, kaptopril kullanan hastaların retinalarında olası iskemi-reperfüzyon hasarının bu yönü ile değerlendirilmesinin uygun olacağını düşündürmektedir.

İloprost stabil prostasiklin analogu olan bir ilaçtır. Antiagregan ve kuvvetli vazodilatör etkisi nedeniyle yurt dışında ateroskleroz ve periferik damar hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Kimyasal yapısında yer alan gruplar nedeniyle antioksidan özelliği olabileceği de ileri sürülen iloprostun kalp, karaciğer, böbrek ve damar endotelinde sitoprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir.^{11,26,36} Prostaglandinlerin immünomodülatör etkileri olduğu dikkate alındığında bir prostanoid olan prostasiklinin de immünomodülatör etkisi olabileceği göz ardı edilemez. Nitekim iloprostun bir sitokin olan TNF α 'yı inhibe ettiği ve TNF α reseptörlerinin sayısını azalttığı gösterilmiştir.²⁵

Bu çalışmada iskemi-reperfüzyon sonrasında retinada artan kaspaz-8 aktivitesinin, iloprost tarafından anlamlı bir şekilde baskılandığı gözlemlendi. İloprostun kaspaz-8 aktivitesini

baskılayıcı etkisi, kaptoprilin kaspaz-8'i baskılama mekanizmasıyla aynı olabileceği gibi, farklı bir mekanizma aracılığı ile de gerçekleşebilir. Ne varki, araştırmalarımızda kullanılan deneysel dizayn bunu anlayabilmek için yeterli değildir. Yukarıda da belirtildiği gibi, bunu anlayabilmek için, kaspaz-8'i indükleyebilen biyokimyasal basamakların oldukça ayrıntılı deneysel planlar ile araştırılması gereklidir.

Araştırma bulguları iloprostun aynı zamanda kaspaz kaskadının 9 ve 3 yolunu da önemli ölçüde inhibe ettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar iloprostun ROS oluşumunu engelleyerek kaspaz-9 ve dolayısıyla kaspaz-3 aktivitesini bloke ettiğini düşündürmektedir. Zira kaspaz-9 aktivitesinin reaktif oksijen radikalleri aracılığı ile indüklendiği bilinmektedir. Deneysel olarak sıçan retinasında yapılan bir çalışmada 60 dakikalık iskemiden bir saat önce 5 dakikalık iskemi uygulaması ile ön koşullama yapıldığında, retinada oluşan iskemik hasarın önemli ölçüde azaldığı saptanmış ve hasarın önlenmesinde adenosin reseptörlerin ön koşullama ile uyarılması sonucu ATP-duyarlı K^+ kanallarının açılmasının ve protein kinaz C'nin aktive olmasının rolü olduğu ifade edilmiştir.⁸⁵ İloprostun da potasyum kanallarını aktive ettiği bilinmektedir.¹⁰⁶ Bu nedenle araştırma sonuçlarına göre iskemi-reperfüzyon sonucu, iloprostun retinada kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3 aktivitelerini anlamlı olarak azaltmasında, potasyum kanallarının aktive edilmesi de etkin bir rol oynamış olabilir.

Bu sonuçlar iloprostun retinayı iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu etkisi olabileceğini ve sitoprotektif etkisinin mekanizmasının serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak antioksidan etki göstermesi veya TNF α sentezini inhibe etmesi ile ilgili olabileceği fikrini vermektedir.

Bilindiği kadarı ile literatürde iloprostun retinada antiapoptotik etkisi olabileceğini telkin eden bu ilk çalışma, farklı iskemi-reperfüzyon sürelerinin incelenmesine ve ileri sürülen mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalara yol açacağı kanaatindeyiz.

ÖZET

Bu çalışmada kaptopril ve iloprostun antioksidan ve antiapoptotik etkinliklerini iskemik rat retinasında immunohistokimyasal olarak çalışmayı amaçladık. Bir anjiyotensin konverting enzim inhibitörü olan kaptopril kardiyovasküler ve renal fonksiyon bozukluklarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. İloprost ise sitoprotektif ve vazodilatör etkilere sahip sentetik bir prostasiklin analogudur. Her iki ilacın doku koruyucu özellikleri özellikle miyokard ve endotel hücrelerinde araştırılmış olsa da iskemi-reperfüzyon sonrası retinadaki antiapoptotik özellikleri tam anlamıyla bilinmemektedir.

Kaptopril ve iloprostun antiapoptotik özelliklerini belirlemek için ratlarda her iki taraflı karotid arter ligasyonu ile 30 dakikalık iskemiye takiben 90 dakikalık reperfüzyon sağlanmıştır. İşlem sırasında kaptopril ve iloprost enjeksiyonları yapılmıştır. Kaspaz 8, 9 ve 3 aktiviteleri ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. .

Kontrol grubuyla kıyaslandığında iskemi reperfüzyon grubundaki ciddi retina hasarı çalışılan tüm kaspaz aktivitelerindeki artış ile belirlendi. Kaptopril belirgin olarak kaspaz-8 aktivitesini azaltmakta ancak kaspaz-9 yolağı üzerinde herhangi bir etkinliği olmamaktadır. İloprost ise her üç kaspaz aktivitesini de belirgin olarak azaltmaktadır.

Sonuçlarımız iloprostun retinayı iskemi reperfüzyon hasarıyla oluşturulan apoptozisten koruduğu ancak kaptoprilin bu etkisinin kısmi olduğunu veya hiç koruyucu etkisinin olmayacağını göstermektedir. Bu yönüyle bakıldığında iloprost retina hastalıklarının tedavisinde tercih edilebilecek bir ilaç olabilir. Fakat bunu kesin olarak belirlemek için çok daha geniş çalışmalara gerek vardır.

İNGİLİZCE ÖZET

In this study, we aimed at studying antioxidant and antiapoptotic properties of captopril and iloprost in ischemic rat retina by using immunohistochemistry. Captopril is an inhibitor of angiotensin converting enzyme which is widely used for regulation of cardiovascular and renal functions. Iloprost is a synthetic prostacyclin which has cytoprotective effects, and leads to vasodilation in blood vessels. Despite the fact that a number of studies have focused on tissue protective effects of both drugs in myocardial and endothelial cells, antiapoptotic properties of both captopril and iloprost during retinal ischemia-reperfusion injury remain unclear.

To determine antiapoptotic properties of captopril and iloprost, a 30-minute ischemia followed by a 90-minute reperfusion was created by bilateral ligation and release of carotid arteries. During this process, captopril and iloprost were injected. Retinal tissue collected from euthanized animals were subjected to immunohistochemistry. Caspase 8, 9, and 3 activities were measured. Evaluation of stained tissues were performed under light microscopy.

In comparison to controls, ischemia-reperfusion resulted in a severe injury in retinal tissues as assessed by increased caspase activities in all caspases tested. Captopril inhibited

dramatically activity of caspase-8 whereas it did not have any effect on caspase-9 dependent pathway of apoptosis. In contrast, ilprost decreased remarkably activities of all three caspases.

In conclusion, our results indicated that while ilprost may protect and rescue retina from apoptosis, protection of captopril was only partial, and may not rescue retinal tissues from apoptosis as a result of ischemia-reperfusion injury. In this respect, ilprost may be preferred as a drug of choice in treatment of retinal diseases. However, extensive studies are also required to make a final conclusion.

KAYNAKLAR

1. Adam JM, Cory S: The bcl protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326, 1998
2. Addonizio VP Jr, Fisher CA, Kappa JR, Ellison N: Prevention of heparin-induced thrombocytopenia during open heart surgery with ilprost (ZK36374). *Surgery* 102: 796-807, 1987
3. Agha AM, Mansour M: Effects of captopril on interleukin-6, leukotriene B(4), and oxidative stress markers in serum and inflammatory exudate of arthritic rats: evidence of antiinflammatory activity. *Toxicol Appl Pharmacol* 168: 123-30, 2000
4. Aigner N, Petje G, Schneider W, Meizer R, Wlk M, Kotsaris S, Knahr K, Landsiedl F: Bone marrow edema syndrome of the femoral head: treatment with the prostacyclin analogue ilprost vs. core decompression: an MRI-controlled study. *Wien Klin Wochenschr* 117: 130-5, 2005

5. Andreoli SP: Captopril scavenges hydrogen peroxide and reduces, but does not eliminate, oxidant-induced cell injury. *Am J Physiol* 264: 120-7, 1993
6. Bagchi D, Parsad R, Das DK: Direct scavenging of free radicals by captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 158: 52–57, 1989
7. Banes AK, Shaw S, Jenkins J, Redd H, Amiri F, Pollock DM, Marrero MB: Angiotensin II blockade prevents hyperglycemia-induced activation of JAK and STAT proteins in diabetic rat kidney glomeruli. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: 653-9, 2004
8. Bertele V, Mussoni L, del Rosso G, Pintucci G, Carriero MR, Merati MG, Libretti A, de Gaetano G: Defective fibrinolytic response in atherosclerotic patients--effect of iloprost and its possible mechanism of action. *Thromb Haemost* 60: 141-4, 1988
9. Biasi D, Caramaschi P, Carletto A, Zeminian S, Schiavon F, Bambara LM: A case of diffuse systemic sclerosis treated with a 28-day infusion of iloprost. *Clin Rheumatol* 16: 111-2, 1997
10. Birincioglu M., Aksoy T., Olmez E. and Acet A: Protective effect of ACE inhibitors on ischemia-reperfusion-induced arrhythmias in rats: is this effect related to the free radical scavenging action of these drugs? *Free Radic Res* 27: 389–396, 1997
11. Boga M, Discigil B, Ozkisacik EA, Gurcun U, Badak MI, Dikicioglu E, Yenisey C, Meteoglu I: The combined effect of iloprost and N-acetylcysteine in preventing spinal cord ischemia in rabbits. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 31: 366-72, 2006
12. Bosman FT, Visser BC, van Oeveren J: Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Review. Pathol Res Pract.* 192: 676-83, 1996
13. Bugiardini R, Galvani M, Ferrini D, Gridelli C, Tollemeto D, Macri N, Puddu P, Lenzi S: Myocardial ischemia during intravenous prostacyclin administration: hemodynamic findings and precautionary measures. *Am Heart J* 113: 234-40, 1987

14. Chan CC, Matteson DM, Li Q, Whitcup SM, Nussenblatt RB: Apoptosis in patients with posterior uveitis. *Arch Ophthalmol* 115: 1559-67, 1997
15. Chen P, Yuan Y, Wang S, Zhan L, Xu J: Captopril, an Angiotensin-converting enzyme inhibitor, attenuates the severity of acute pancreatitis in rats by reducing expression of matrix metalloproteinase. *Tohoku J Exp Med* 209: 99-107, 2006
16. Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, McKanna JA, Harris RC: Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 103: 953-61, 1999
17. Cheng HF, Wang SW, Zhang MZ, McKanna JA, Breyer R, Harris RC: Prostaglandins that increase renin production in response to ACE inhibition are not derived from cyclooxygenase-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: 638-46, 2002
18. Chopra M, Scott N, McMurray J, McFay J, Bridges A, Smith WE, Belch JJJ: Captopril: A free radical scavenger. *Br J Clin Pharmacol* 27: 396-399, 1992
19. Constantinescu CS, Ventura E, Hilliard B, Rostami A: Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol* 17: 471-491, 1995
20. Cook B, Lewis GP, Fisher SK, et al. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 990-996, 1995
21. Cozzolino D, Coppola L, Masi S, Salvatore T, Sasso FC, De Lucia D, Gentile S, Torella R: Short- and long-term treatments with iloprost in diabetic patients with peripheral vascular disease: effects on the cardiovascular risk factor plasminogen activator inhibitor type-1. *Eur J Clin Pharmacol* 55: 491-7, 1999

22. Darius H, Osborne JA, Reibel DK, Lefer AM. Protective actions of a stable prostacyclin analog in ischemia induced membrane damage in rat myocardium: *J Mol Cell Cardiol* 19: 243-50, 1987
23. Daugeliene L, Niwa M, Hara A, Matsuno H, Yamamoto T, Kitazawa Y, Uematsu T: Transient ischemic injury in the rat retina caused by thrombotic occlusion-thrombolytic reperfusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 2743-7, 2000
24. Deas O, Dumont C, Mollereau B, Metivier D, Pasquier C, Bernard-Pomier G, Hirsch F, Charpentier B, Senik A: Thiol-mediated inhibition of FAS and CD2 apoptotic signaling in activated human peripheral T cells. *Int Immunol* 9: 117-25, 1997
25. Di Renzo M, Pieragalli D, Meini S, De Franco V, Pompella G, Auteri A, Pasqui AL: Iloprost treatment reduces TNF-alpha production and TNF-RII expression in critical limb ischemia patients without affecting IL6. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73: 405-10, 2005
26. Dosluoglu HH, Aktan AO, Yegen C, Okboy N, Yalcin AS, Yahn R, Ercan S: The cytoprotective effects of verapamil and iloprost (ZK 36374) on ischemia/reperfusion injury of kidneys. *Transpl Int* 6: 138-42, 1993
27. Elinav E, Chajek-Shaul T, Stern M: Improvement in cholesterol emboli syndrome after iloprost therapy. *BMJ* 324: 268-9, 2002
28. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S: A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50, 1998
29. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J: Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin* 37:719-27, 2005
30. Fisher CA, Kappa JR, Sinha AK, Cottrell ED, Reiser HJ, Addonizio VP: Comparison of equimolar concentrations of iloprost, prostacyclin, and prostaglandin E1 on human platelet function. *J Lab Clin Med* 109: 184-90, 1987

31. Fox CK, Furtwaengler A: Apoptotic pathways in primary biliary cirrosis and autoimmun hepatitis. *Liver* 21: 272-279, 2001
32. Gaetani E, Flex A, Pola P, Pola R: Iloprost for age-related macular degeneration: long-term efficacy evaluation. *J Am Geriatr Soc* 50: 780-1, 2002
33. Gaspar R, Blazso G: Effects pf captopril and D-penicillamine on kinins-mediated and chronic inflammation. *Acta Pharm Hung* 66: 171-6, 1996
34. Goldschmidt JE, Tallarida RJ: Pharmacological evidence that captopril possesses and endothelium-mediated component of vasodilation: Effect of sulfhydryl groups on endothelium derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther* 257: 1136 –1145, 1991
35. Godsel LM, Leon JS, Wang K, Fornek JL, Molteni A, Engman DM: Captopril prevents experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 171: 346-52, 2003
36. Grant SM, Goa KL: Iloprost. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in peripheral vascular disease, myocardial ischaemia and extracorporeal circulation procedures. Review. *Drugs* 43: 889-924. 1992
37. Green DR: Apoptotic pathways: The roads to ruin. *Cell* 94: 695-98, 1998
38. Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. Review. *Science* 281: 1309-12, 1998
39. Gregory CY, Bird AC: Cell loss in retinal dystrophies by apoptosis: death by informed consent. *Br J Ophthalmol* 79: 186-190, 1995
40. Groeneboer MC, Hoyng PF, Kuizenga A: Prostaglandin F2 alpha isopropyl ester versus iloprost phenacyl ester in rabbit and beagle eyes. *Curr Eye Res* 8: 131-8, 1989
41. Hangai M, Yoshimura N, Honda Y: Increased Cytokine Gene expression in rat retina following transient ischemia. *Ophthalmic Res* 28: 248-54, 1996
42. Hangai M, Yoshimura N, Yoshida M, Yabuuchi K, Honda Y: Interleukin-1 gene expression in transient retinal ischemia in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 571-8, 1995

43. Hinton DR, He SK, Lopez PF. Apoptosis in surgically excised choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 116: 203-209, 1998
44. Hoepfer MM: Long-term treatment of pulmonary hypertension with aerosolized iloprost. *Eur Respir J* 17: 1334-5, 2001
45. Hoyng PF, de Jong N: Iloprost, a stable prostacyclin analog, reduces intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 470-6, 1987
46. Hoyng PF, Groeneboer MC: The effects of prostacyclin and its stable analog on intraocular pressure. *Prog Clin Biol Res* 312: 369-78, 1989
47. Hunot S, Flavell RA: Apoptosis. Death of a monopoly? *Science*. 292: 865-6, 2001
48. Hsu H, Shu HB, Pan MG, Goeddel DV: TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84: 299-308, 1996
49. Hsu H, Xiong J, Goeddel DV: The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF kappa B activation. *Cell* 81: 495-504, 1995
50. Ilieva I, Ohgami K, Jin XH, Suzuki Y, Shiratori K, Yoshida K, Kase S, Ohno S: Captopril suppresses inflammation in endotoxin-induced uveitis in rats. *Exp Eye Res* 83: 651-7, 2006
51. Isenmann S, Wahl C, Krajewski S, Reed JC, Bahr M: Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *Eur J Neurosci* 9: 1763-1772, 1997
52. Jahovich N, Ercan F, Gedik N, Yuksel M, Sener G, Alican I: The effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on experimental colitis in rats. *Regul. Pept.* 130: 67-74, 2005
53. Jones BA, Gores GJ: Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver pancreas and intestine. *Am J Physiol* 273: 1174-1188, 1997

54. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC: Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4997-5002, 1998
55. Kane DJ, Sarafian TA, Anton R, Hahn H, Gralla EB, Valentine JS, Ord T, Bredesen DE: Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* 262: 1274-1277, 1993
56. Kappa JR, Fisher CA, Todd B, Stenach N, Bell P, Campbell F, Ellison N, Addonizio VP: Intraoperative management of patients with heparin-induced thrombocytopenia. *Ann Thorac Surg* 49: 714-22, 1990
57. Katai N, Yoshimura N. Apoptotic retinal neuronal death by ischemia-reperfusion is executed by two distinct caspase family proteases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 2697-705, 1999
58. Kaukinen S, Ylitalo P, Pessi T, Vapaatalo H: Hemodynamic effects of iloprost, a prostacyclin analog. *Clin Pharmacol Ther* 36: 464-9, 1984
59. Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME: TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115: 1031-5, 1997
60. Kidd VJ, Lahti JM, Teitz T. Proteolytic regulation of apoptosis: Review. *Semin Cell Dev Biol* 11: 191-201, 2000
61. Kim SY, Nayak MS, Kita M, Marmor MF: Electroretinogram recovery in the rabbit after repetitive short-term ischemia in light and dark. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 664-8, 1994
62. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Koths K, Kwiatkowski DJ, Williams LT: Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-8, 1997
63. Krause W, Kraus T: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the prostacyclin analogue iloprost in man. *Eur J Clin Pharmacol* 30: 61-8, 1986

64. Kuroiwa S, Katai N, Shibuki H, Kurokawa T, Umihira J, Nikaido T, Kametani K, Yoshimura N: Expression of cell cycle-related genes in dying cells in retinal ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 610-7, 1998
65. Lacourciere Y, Nadeau A, Poirier L, Tancrede G: Captopril or conventional therapy in hypertensive type II diabetics. Three-year analysis. *Hypertension* 21: 786-94, 1993
66. Lam TT, Abler AS, Tso MO: Apoptosis and caspases after ischemia-reperfusion injury in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 967-75, 1999
67. Langer F, Wendler O, Wilhelm W, Tscholl D, Schafers HJ: Treatment of a case of acute right heart failure by inhalation of iloprost, a long-acting prostacyclin analogue. *Eur J Anaesthesiol* 18: 770-3, 2001
68. Lapenna D, De Gioia S, Ciofani G, Daniele F, Cuccurullo F: Captopril has no significant scavenging antioxidant activity in human plasma in vitro or in vivo. *Br J Clin Pharmacol* 42:451-6, 1996
69. Lapenna D, De Gioia S, Mezzetti A, Ciofani G, Di Ilio C, Cuccurullo F: The prooxidant properties of captopril. *Biochem Pharmacol* 50: 27-32, 1995
70. Lapteva N, Ide K, Nieda M, Ando Y, Hatta-Ohashi Y, Minami M, Dymshits G, Egawa K, Juji T, Tokunaga K: Activation and suppression of renin-angiotensin system in human dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 296: 194-200, 2002
71. Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y: TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 7: 703-13, 1997
72. Lehmann C, Taymoorian K, Wauer H, Krausch D, Birnbaum J, Kox WJ: Effects of the stable prostacyclin analogue iloprost on the plasma disappearance rate of indocyanine green in human septic shock. *Intensive Care Med* 26: 1557-60, 2000

73. Levin M, Nakhoul F, Keidar Z, Green J: Acute oliguric renal failure associated with unilateral renal embolism: a successful treatment with iloprost. *Am J Nephrol* 18: 444-7, 1998
74. Levine AJ: P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-332, 1997
75. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91: 479-89, 1997
76. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94: 491-501, 1998
77. Liu X, Lukasova M, Zubakova R, Lewicka S, Hilgenfeldt U: Kallidin-like peptide mediates the cardioprotective effect of the ACE inhibitor captopril against ischaemic reperfusion injury of rat heart. *Br J Pharmacol* 148: 825-32, 2006
78. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89:175-84, 1997
79. Mailloux A, Deslandes B, Vaubourdolle M, Baudin B: Captopril and enalaprilat decrease antioxidant defences in human endothelial cells and are unable to protect against apoptosis. *Cell Biol Int* 27: 825-30, 2003
80. Mancini M, Nicholson DW: The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signals. *J. Cell Biol* 140: 1485-1495, 1998:
81. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G: Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 281: 2027-2031, 1998
82. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G: The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 187: 1261-1271, 1998

83. Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR: Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 271: 28753-6, 1996
84. Mehta JL, Nicolini FA, Lawson DL: Sulfhydryl group in angiotensin converting enzyme inhibitors and superoxide radical formation. *J Cardiovasc Pharmacol* 16:847-9, 1990
85. Mino RP, Spoerri PE, Caballero S, Player D, Belardinelli L, Biaggioni I, Grant MB. Adenosine receptor antagonists and retinal neovascularization in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 3320-4, 2001
86. Mira ML, Silva MM, Querioz MJ, Manso CF: Angiotensin converting enzyme inhibitors as oxygen free radical scavengers. *Free Radic Res Commun* 19: 173–181, 1993
87. Murley JS, Kataoka Y, Cao D, Li JJ, Oberley LW, Grdina DJ: Delayed radioprotection by NFkappaB-mediated induction of Sod2 (MnSOD) in SA-NH tumor cells after exposure to clinically used thiol-containing drugs. *Radiat Res* 162: 536-46, 2004
88. Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM: FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem* 272:2952-6, 1997
89. Oberender H, Kraiss T, Schafer M, Belcher G: Clinical benefits of iloprost, a stable prostacyclin (PGI₂) analog, in severe peripheral arterial disease (PAD). *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 19: 311-6, 1989
90. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW: Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. *Science* 196: 441-4, 1977
91. Oz O, Gurelik G, Akyurek N, Cinel L, Hondur A: A short duration transient ischemia induces apoptosis in retinal layers: An experimental study in rabbits. *Eur J Ophthalmol* 15: 233-8, 2005
92. Ozer MK, Sahna E, Birincioglu M, Acet A: Effects of captopril and losartan on myocardial ischemia-reperfusion induced arrhythmias and necrosis in rats. *Pharmacol Res* 45: 257-63, 2002

93. Peeters AC, Netea MG, Kullberg BJ, Thien T, van der Meer JW: The effect of renin-angiotensin system inhibitors on pro- and anti-inflammatory cytokine production. *Immunology* 94: 376-9, 1998
94. Penning TD: Inhibitors of leukotriene A4 (LTA4) hydrolase as potential anti-inflammatory agents. Review. *Curr Pharm Des* 7: 163-79, 2001
95. Pi X-J, Chen X: Captopril and ramiprilat protect against free radical injury in isolated working rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 21: 1261-1271, 1989
96. Piquemal R, Emmerich J, Guilmot JL, Fiessinger JN: Successful treatment of ergotism with Iloprost--a case report. *Angiology* 49: 493-7, 1998
97. Reed JC: Cytochrome c: can't live with it - can't live without it. *Cell* 91: 559-562, 1997
98. Regan CP, Anderson PG, Bishop SP, Berecek KH: Captopril prevents vascular and fibrotic changes but not cardiac hypertrophy in aortic-banded rats. *Am J Physiol* 271: 906-13, 1996
99. Reguli J, Misik V: Superoxide scavenging by thiol/copper complex of captopril--an EPR spectroscopy study. *Free Radic Res* 22: 123-30, 1995
100. Robbins SL : Basic pathology. 5th Edition. 1999, S:13-15
101. Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Gupta A, Michaelson MD, Hall DH, Kessler JA: Retinal ischemia leads to apoptosis which is ameliorated by aurointricarboxylic acid. *Vision Res* 37: 3445-51, 1997
102. Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Gupta H, Singh M, Aggraval A, Hall DH, Roth S, Kessler JA: The role of p53 protein in the selective vulnerability of the inner retina to the transient ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2132-2139, 1998
103. Rosenbaum DM, Rosenbaum PS, Singh M, Gupta G, Gupta H, Li B, Roth S. Functional and morphologic comparison of two methods to produce transient retinal ischemia in the rat. *J Neuroophthalmol* 21: 62-8, 2001

104. Salvensen GS, Dixit VM: Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91: 443-446, 1997
105. Schindler R, Dinarello CA, Koch KM: Angiotensin-converting-enzyme inhibitors suppress synthesis of tumour necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine* 7:526-33, 1995
106. Schubert R, Serebryakov VN, Mewes H, Hopp HH: Iloprost dilates rat small arteries: role of K(ATP)- and K(Ca)-channel activation by cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol* 272: 1147-56, 1997
107. Schror K, Darius H, Matzky R, Ohlendorf R: The antiplatelet and cardiovascular actions of a new carbacyclin derivative (ZK 36 374)--equipotent to PGI₂ in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 316:252-5, 1981
108. Smeets B, Steenbergen ML, Dijkman HB, Verrijp KN, te Loeke NA, Aten J, Steenbergen EJ, Wetzels JF: Angiotensin converting enzyme inhibition prevents development of collapsing focal segmental glomerulosclerosis in Thy-1.1 transgenic mice. *Nephrol Dial Transplant* 21: 3087-97, 2006
109. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES: Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1: 949-57, 1998
110. Suzuki S, Sato H, Shimada H, Takashima N, Arakawa M: Comparative free radical scavenging action of angiotensin-converting enzyme inhibitors with and without the sulfhydryl radical. *Pharmacology* 47: 61-5, 1993
111. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Braquet P: Free radical-mediated effects in reperfusion injury: a histologic study with superoxide dismutase and EGB 761 in rat retina. *Ophthalmic Res* 23: 225-34, 1991

112. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M, Carre C, Braquet P: Ischemia and reperfusion-induced histologic changes in the rat retina. Demonstration of a free radical-mediated mechanism. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1471-8, 1991
113. Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC: Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel bcl-2 binding protein with anti cell-death activity. *Cell* 80: 279-284, 1995
114. Tang SS, Stevenson L, Dzau VJ: Endothelial renin-angiotensin pathway. *Circ Res* 66: 103–108, 1991
115. Tarkowski A, Carlsten H, Herlitz H, Westberg G: Differential effects of captopril and enalapril, two angiotensin converting enzyme inhibitors, on immune reactivity in experimental lupus disease. *Agents Actions* 31: 96-101, 1990
116. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ: Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6: 529-35, 2000
117. Thornberry Na, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-6, 1998
118. Torley HI, Madhok R, Capell HA, Brouwer RM, Maddison PJ, Black CM, Englert H, Dormandy JA, Watson HR: A double blind, randomised, multicentre comparison of two doses of intravenous iloprost in the treatment of Raynaud's phenomenon secondary to connective tissue diseases. *Ann Rheum Dis* 50: 800-4, 1991
119. Turnbull W: Effects of experimental retinal anemia in rats. *Arch Ophthalmol* 43: 9-31, 1950
120. Uhal BD, Gidea C, Bargout R, Bifero A, Ibarra-Sunga O, Papp M, Flynn K, Filippatos G: Captopril inhibits apoptosis in human lung epithelial cells: a potential antifibrotic mechanism. *Am J Physiol* 275: 1013-7, 1998

121. Van Iwaarden F, de Groot PG, Sixma JJ, Berrettini M, Bouma BN: High molecular weight kininogen is present in cultured endothelial cells: Localization, isolation and characterization. *Blood* 71: 1268–1276, 1981
122. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacher PT, Thompson CB: Bcl-x_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 91: 627-637, 1997
123. Wang R, Zagariya A, Ang E, Ibarra-Sunga O, Uhal BD: Fas-induced apoptosis of alveolar epithelial cells requires ANG II generation and receptor interaction. *Am J Physiol* 277: 1245-50, 1999
124. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, Thompson CB, Korsmeyer SJ: tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14: 2060-71, 2000
125. Weinstock JV, Boros DL: Alteration of the granulomatous response in murine schistosomiasis by the chronic administration of captopril, an inhibitor of angiotensin-converting enzyme. *Gastroenterology* 81: 953-8, 1981
126. Wen LP, Fahrni JA, Troie S, Guan JL, Orth K, Rosen GD: Cleavage of focal adhesion kinase by caspases during apoptosis. *J Biol Chem* 272: 26056-61, 1997
127. Williams RN, Parsons SL, Morris TM, Rowlands BJ, Watson SA: Inhibition of matrix metalloproteinase activity and growth of gastric adenocarcinoma cells by an angiotensin converting enzyme inhibitor in in vitro and murine models. *Eur J Surg Oncol* 31: 1042-50, 2005
128. Xiang H, Kinoshita Y, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Schwartzkroin PA, Morrison RS: Bax involvement in p53-mediated cell death. *J Neurosci* 18: 1363-1373, 1998
129. Yang E, Zha J, Jockel J, Broise LH, Thompson LB, Korsmeyer SJ: Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x_L and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-291, 1995

130. Young RW: Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* 229: 362-73, 1984
131. Yu W, Akishita M, Xi H, Nagai K, Sudoh N, Hasegawa H, Kozaki K, Toba K: Angiotensin converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis via p38 MAP kinase inhibition. *Clin Chim Acta* 364: 328-34, 2006
132. Zheng L, Gong B, Hatala DA, Kern TS: Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 361-7, 2007
133. Zhou Y, Lindner LE, Chiou GC, Morgan KP, Li Z: Transient retinal ischemia-reperfusion in rats. *Chin Med J (Engl)* 113: 461-5, 2000