

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**CİSPLATİN GONADOTOKSİSİTESİNDE ACETYL L-CARNİTİN'İN TUBA
UTERİNA'DAKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülistan Sanem ARIK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

ANKARA
Aralık 2011

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**CİSPLATİN GONADOTOKSİSİTESİNDE ACETYL L-CARNİTİN'İN TUBA
UTERİNA'DAKİ KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülistan Sanem ARIK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2010-20
proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
Aralık 2011

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 29/12/2011

**İmza
Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**İmza
Prof. Dr. Candan ÖZÖGÜL
Gazi Üniversitesi**



**İmza
Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi**



İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Şekiller, Resimler, Grafikler	V
Tablolar	VIII
Kısaltmalar ve Simgeler	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Tuba Uterina'nın Gelişimi	4
2.2. Tuba Uterina'nın Anatomisi	8
2.2.1. İfundibulum Tuba Uterina	10
2.2.2. Ampulla Tuba Uterina	10
2.2.3. İsthmus Tuba Uterina	10
2.2.4. Pars Uterina (İntramural Parça)	11
2.2.5. Tuba Uterina'nın Damarları	11
2.2.6. Tuba Uterina'nın Sinirleri	12
2.3. Tuba Uterina'nın Histolojisi	12
2.3.1. Tunika Mukoza	12
2.3.1.1. Epitel	13
2.3.1.2. Lamina Propria	16
2.3.2. Tunika Muskularis	16
2.3.3. Tunika Seroza	17
2.4. Tuba Uterina'nın Fizyolojisi	17
2.5. Kemoterapi	21
2.6. Cisplatin (Cis-diaminedikloroplatinum II, CDDP)	27
2.6.1. Sisplatinin Yapısı ve Etki Mekanizması	28
2.6.2. Sisplatin Toksisitesi	31
2.7. Apoptozis	34
2.7.1. Apoptozisin Fizyolojik ve Patolojik Olaylarla İlişkisi	35

2.7.2. Apoptozis Morfolojisi	38
2.7.3. Apoptozis ve Nekrozis Farkı	39
2.7.4. Apoptozis Mekanizmaları	40
2.7.5. Apoptozis Düzenleyicileri	42
2.7.6. Apoptozis Yolakları	51
2.7.6.1. Perforin/Granzim Yolağı	52
2.7.6.2. Ekstresek Yolak	52
2.7.6.3. İntresek Yolak	55
2.7.6.4. İnfaz Yolağı	59
2.8. Antioksidanlar	60
2.8.1. Serbest Radikaller	61
2.8.1.1. Serbest Radikallerin Etki Mekanizmaları	61
2.8.1.2. Serbest Radikal Türleri	63
2.8.1.3. Serbest Radikallerin Organizmaya Etkileri	64
2.8.1.4. Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hastalıklar	66
2.8.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	67
2.8.3. Antioksidanların sınıflandırılması	68
2.8.3.1. Kaynaklarına göre	68
2.8.3.2. Çözünürlüklerine göre	68
2.8.3.3. Yerleşimlerine göre	69
2.8.3.4. Yapılarına göre	69
2.8.3.4.1. Enzimatik Antioksidanlar	69
2.8.3.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	73
2.9. L-Carnitin	74
2.9.1. L-Carnitin ve Antioksidan Etki	79
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	82
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	82
3.2. TUNEL Yöntemi	87
3.3. İmmunohistokimyasal Yöntem	88
3.4. İstatistiksel Yöntem	90

4. BULGULAR	91
4.1. Vücut Ağırlıklarının İstatistiksel olarak Değerlendirilmesi	91
4.2. Tuba Uterina Duvar Kalınlığı ve Epitel Kalınlığının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	94
4.3. Histolojik Bulgular	96
4.4. TUNEL Bulguları ve İstatistiksel Değerlendirilmesi	97
4.5. Caspase 8 Bulguları ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	99
4.6. Caspase 9 Bulguları ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	101
4.7. Caspase 3 Bulguları ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	103
5. TARTIŞMA	129
6. SONUÇ	146
7. ÖZET	148
8. SUMMARY	150
9. KAYNAKLAR	152
10.EKLER	177
10.1. EK-1: Etik Kurul Raporu	177
10.2. EK-2: Sertifika	178
11.TEŞEKKÜR	179
12.ÖZGEÇMİŞ	180

ŞEKİLLER, RESİMLER VE GRAFİKLER

Şekiller

Şekil 1. İnsan tuba uterinası şematik gösterimi

Şekil 2. Cisplatinin kimyasal yapısı

Şekil 3. Cisplatinin DNA ile oluşturduğu bağlar

Şekil 4. Antiapoptotik ve proapoptotik proteinlerde Bcl-2 homoloji bölgeleri

Şekil 5. Kaspazların yapısı

Şekil 6. Apoptoziste yolaklar

Şekil 7. Apoptozomun yapısı

Şekil 8. Apoptozis yolakları

Şekil 9. Hücre içinde gerçekleşen antioksidan mekanizması

Şekil 10. L-Carnitin ve diğer kimyasal formlarının yapısı

Şekil 11. Acetyl L-Carnitin sentezi

Resimler

Resim 1. Kontrol grubunda normal görünümde tuba uterina morfolojisi (H&E)

Resim 2. Kontrol grubunda normal görünümde tuba uterina epitelinde silli hücreler ve salgı hücreleri (H&E)

Resim 3. Acetyl L-Carnitin grubunda normal görünümde tuba uterina morfolojisi (H&E)

Resim 4. Acetyl L-Carnitin grubunda normal görünümde tuba uterina epitelinde silli hücreler ve salgı hücreleri (H&E)

Resim 5. Cisplatin grubuna ait küçük büyültmede tuba uterina morfolojisi (H&E)

Resim 6. Cisplatin grubuna ait büyük büyültmede tuba uterinada intraepitelial lenfositler (H&E)

Resim 7. Cisplatin grubundan büyük büyültmede tuba uterinada intraepitelial lenfositler ve subepitelial hematoma (H&E)

Resim 8. Cisplatin grubundan büyük büyültmede tuba uterinada intraepitelial lenfositler, salgı hücreleri ve silli hücreler (H&E)

Resim 9. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda küçük büyültmede tuba uterina epiteli (H&E)

Resim 10. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda büyük büyültmede intraepitelial lenfositler (H&E)

Resim 11. Kontrol grubunda tuba uterinanın TUNEL boyaması yapılmış küçük büyültmede görünümü (DAB&Hematoksilen)

Resim 12. Kontrol grubunda zayıf reaksiyon gösteren az sayıda TUNEL pozitif epitel hücreleri (DAB&Hematoksilen)

Resim 13. Kontrol grubunda büyük büyültmede zayıf reaksiyon gösteren TUNEL pozitif epitel hücreleri (DAB&Hematoksilen)

Resim 14. TUNEL boyaması yapılan Acetyl L-Carnitin grubunda küçük büyültmede bir görünüm (DAB&Hematoksilen)

Resim 15. TUNEL boyaması yapılan Acetyl L-Carnitin grubunda özellikle epitel kıvrımlarının derin kısımlarında gözlenen az sayıda TUNEL pozitif hücreler (DAB&Hematoksilen)

Resim 16. TUNEL boyaması yapılan Acetyl L-Carnitin grubunda az sayıda TUNEL pozitif hücreler (DAB&Hematoksilen)

Resim 17. TUNEL boyaması yapılan Cisplatin grubunda küçük büyültmede bir görünüm (DAB&Hematoksilen)

Resim 18. TUNEL boyaması yapılan Cisplatin grubunda daha büyük büyültmede epitel kıvrımlarının üst kısımlarında TUNEL pozitif hücreler, derin kısımlardaki pozitif epitel hücreleri, pozitif bağ doku hücreleri (DAB&Hematoksilen)

Resim 19. TUNEL boyaması yapılan Cisplatin grubunda daha büyük büyültmede görüntülenmiş tuba uterina epitelinde pozitif hücreler (DAB&Hematoksilen)

Resim 20. Cisplatin grubunda çok sayıda TUNEL pozitif baş dokusu hücreleri ve düz kas hücreleri (DAB&Hematoksilen)

Resim 21. TUNEL boyaması yapılan Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubundan küçük büyültmede bir görünüm (DAB&Hematoksilen)

Resim 22. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda büyük büyültmede TUNEL pozitif epitel hücreleri, baş doku hücreleri ve düz kas hücreleri (DAB&Hematoksilen)

Resim 23. Caspase 8 immünişaretlemesi yapılan kontrol grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 24. Caspase 8 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 25. Caspase 8 immünişaretlemesi yapılan Cisplatin grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 26. Caspase 8 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 27. Caspase 9 immünişaretlemesi yapılan kontrol grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 28. Caspase 9 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 29. Caspase 9 immünişaretlemesi yapılan Cisplatin grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 30. Caspase 9 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 31. Caspase 3 immünişaretlemesi yapılan kontrol grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 32. Caspase 3 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 33. Caspase 3 immünişaretlemesi yapılan Cisplatin grubu (DAB&Hematoksilen)

Resim 34. Caspase 3 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu (DAB&Hematoksilen)

Grafikler

Grafik 1. Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıkları

Grafik 2. Tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı ortalamaları

Grafik 3. Tuba uterina epitelinde TUNEL pozitif hücre ortalamaları

Grafik 4. Epitelde caspase 8,9 ve 3 tutulumlu hücre sayısı ortalamaları

TABLolar

Tablo 1. Cisplatine bağı yan etkiler

Tablo 2. Hastalıklarda apoptozisin rolü

Tablo 3. Enzimatik olmayan antioksidanlar

Tablo 4. Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıklarının istatistiksel farklılıkları

Tablo 5. Gruplar arası deney öncesi ve sonrası ağırlık farklarının istatistiksel karşılaştırılması

Tablo 6. Gruplar arası tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı ölçümlerinin karşılaştırılması

Tablo 7. Gruplar arası TUNEL pozitif hücrelerin istatistiksel değerleri

Tablo 8. Tuba uterina epitelinde caspase 8,9 ve 3 tutulumlu hücre sayısı ortalamaları

Tablo 9. Tuba uterina epitelinde gruplar arası caspase tutulumlarının karşılaştırılması

KISALTMALAR VE SİMGELER

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

KT: Kemoterapi

ROS: Reaktif oksijen radikalleri

TBF: Testis belirleyici faktör

SF-1: Steroidogenik faktör-1

MIS: Müllerian baskılayıcı madde

a.: Arter

v.: Ven

İV: İntravenöz

İP: İntraperitoneal

DNA-PK: DNA bağımlı protein kinaz

HMG1/2: Histon olmayan yüksek mobilite grubu

SF: Serum fizyolojik

ER: Endoplazmik retikulum

TNFR: Tümör necrosis faktör reseptör

IAF: Apoptosis baskılayıcı faktör

AIF: Apoptosis indükleyici faktör

Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1

CDK: Siklin bağımlı protein kinaz

CDI: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü

PARP: Poly-ADP riboz polimeraz

FADD: Fas-associated death domain

DISC: Ölüm başlatıcı sinyal kompleksi

NK: Doğal öldürücü hücre

SmaC/DIABLO: Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI

Cyt-c: Sitokrom-c

HtrA2/Omi: High-temperature requirement

CAD: Kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz

NO: Nitrik oksit

GPx: Glutasyon peroksidaz

GSH: Glutasyon

MDA: Malondialdehit

CAT: Katalaz

PBS: Fosfat tampon solüsyonu

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

1. GİRİŞ

Fizyolojik düzenlenimini yitirmiş hücrelerin kontrolsüz çoğalması şeklinde tanımlanabilecek olan kanser, yüzyılımızda sosyal ve ekonomik açılardan kişi, aile ve toplum üzerinde ağır sorunlar yükleyen, tanı ve tedavisi güç, masraflı ve genellikle devamlılık gösteren bir hastalık olmakla birlikte, insan ölümlerine yol açan nedenler arasında da önemli bir yere sahiptir.^{1,2,3}

Gelişmiş toplumlarda kanserden kaynaklanan ölümler ilk sırada yer alırken gelişmekte olan ülkelerde ise giderek artmaktadır. Dünyada her yıl 12.7 milyon kişiye kanser tanısı konulduğu ve 7.6 milyon kişinin kanserden öldüğü bildirilmiştir. Önlem alınmadığı takdirde, dünya genelinde kanser oranının artacağı ve 2030 yılında 26 milyon yeni tanı kanser vakasına ve 17 milyon kişinin kanser sebebi ile ölüme ulaşacağı öngörülmektedir.⁴

Ülkemizde ise, Devlet İstatistik Enstitüsünün sağlık istatistikleri raporunda, toplam ölümler arasında % 12,9 (23.775 kişi) ile en sık ikinci ölüm sebebinin kanser olduğu belirtilmiştir. Kanser olguları tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de en önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelmektedir.^{4,5,6}

Son yıllarda kanser oranlarındaki artışa bağlı olarak, kanser ile mücadelede umut verici tedavi yöntemleri gelişmektedir. Kanser insidansındaki artışa bağlı olarak gelişen tedavi modelleri sayesinde, sağkalım oranları da her geçen gün artmaktadır.

Kanser tedavisinde kullanılan tedavi yöntemleri; cerrahi (bölgesel) çıkarım, radyoterapi (RT), kemoterapi (KT) ve yeni tedavi yöntemleri (hormon tedavisi, immünoterapi - biyolojik tedavi, anjiogenez inhibitörleri, sinyal ileti sistemi inhibitörleri, gen tedavisi, kemik iliği transplantasyonu) 'dir. Bu yöntemlerden birisi ya da birkaçı birlikte uygulanarak kanser tedavisi sağlanmaktadır.^{7,8} Kemoterapi, günümüzde kanseri önlemede en umut verici tedavi yöntemlerinden biridir.

Kemoterapi ile tümör hücreleri tamamen yok edilip, büyüme ve çoğalmalarının engellenmesi hedeflense de normal hücre ile tümör hücreleri arasındaki yapısal benzerlikten dolayı KT sonrası sağlıklı hücrelerin de KT ile hasarlanmasına ve ciddi toksisite ile karşılaşılmasına neden olmaktadır.⁹ Eşsiz değerdeki follikülleri depolayan overler ve sperm üreten testisler kemoterapik ajanlara son derecede duyarlıdır.^{10,11,12} Oosit, granüloza ve teka hücre hasarı, prematur ovarian yetmezlikle sonuçlanan primordial folliküllerde apoptoz, kemoterapinin etkileri olarak sayılabilir. Cyclophosphamide, chlorambucil, melphalan, busulfan, nitrogen mustard, procarbazine, fosfamide ve thiotepa gibi bazı kemoterapötik ajanlar çoğunlukla geri dönüşümsüz ovarian hasara neden olurken, Cisplatin ve adriamycin kısmen, bleomycin, actinomycin D, vincristine, methotrexate ve 5-fluorouracil hafif gonadotoksiktir.^{10,13,14} Tedavi sonrası görülen reproduktif yetmezlik oranlarının artışı, üreme sağlığını etkileyen komplikasyonları da beraberinde getirmektedir.

Kemoterapi protokollerinin vazgeçilmez elemanı olan Cisplatin, erişkin çağda görülen bir kaç tümörün ve nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastom, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom gibi pek çok çocukluk çağı tümörlerinin tedavisinde rol alır. Kısmi gonadotoksik olduğu belirtilen Cisplatinin, birçok sistem üzerinde yan etkisi

olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Nefrotoksisite, nöropati, ototoksisite ve gonadotoksisite Cisplatinin kullanımını sınırlayan klinik açıdan önemli doz sınırlayıcı yan etkilerdir.¹⁵ Cisplatin toksisitesinin gelişmesinde reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu ve mitokondrial oksidatif hasarın rol oynadığı belirtilmektedir.¹⁶

Acetyl L-Carnitin, hücrenin enerji üretimi için gerekli beta-oksidasyona gidebilmek üzere uzun zincirli serbest yağ asitlerinin mitokondri matriksine geçişinde gerekli olup, uzun zincirli serbest yağ asitlerinin acylcarnitinlere dönüşümünde kofaktör olarak rol alır. L- carnitin mitokondri fonksiyonlarında önemli rol oynayan protektif bir ajandır.¹⁷

Acetyl L-Carnitin, mitokondri içindeki açılCoA / CoA oranını düzenler ve mitokondrideki toksik ürünleri tutucu rol oynar.¹⁸ Acetyl L-Carnitinin güçlü bir antioksidan ve serbest radikal yakalayıcı olduğu gösterilmiştir.¹⁹ Bu nedenle, Acetyl L-Carnitin uygulamasının, Cisplatinin toksik yan etkilerinden koruyucu, önleyici rolü olabilir.

Bu çalışmanın amacı, gonadotoksik etkisi bilinen Cisplatinin tuba uterinadaki etkileri belirlemek ve bu etkilere karşı uygulanan Acetyl L-Carnitin'in koruyucu etkisini ortaya koymaktır. Bu etkilerin incelenmesinde, morfometrik ve histolojik analizleri için hematoksilin-eosin (H&E) boyama, apoptotik etkiler için immünohistokimyasal olarak Caspase 3, 8 ve 9; DNA fragmentasyonunu belirlemek için de TUNEL yöntemi uygulandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tuba Uterina'nın Gelişimi

Embriyonun cinsiyeti, döllenme sırasında spermiyumun taşıdığı kromozoma bağlı olarak belirlenmiş olmasına karşın, erkek ve dişi yapısal özellikleri embriyonik gelişimin 7. haftasında biçimlenmeye başlar.²⁰

Cinsiyet, spermiyumun taşıdığı X ya da Y kromozomuna bağlıdır. Seksüel farklanma, Y kromozomunun kısa kolundaki SRY gen bölgesine bağlıdır. SRY geninin protein ürünü olan testis belirleyici faktör (TBF), cinsiyet organlarının farklanmasını düzenleyen genleri uyarmaktadır. TBF varlığında fötusun cinsiyeti erkek tipinde, yokluğunda ise kız tipinde gelişir.²¹

Önceden cinsiyetin dişi yönünde farklanabilmesi için sadece Y kromozomunun yokluğunun yeterli olduğu kabul edilirdi. Ancak son yıllarda primitif gonadın, overe dönüşebilmesi için bazı genlerin varlığına ihtiyaç duyduğu anlaşılmıştır. Örneğin, X kromozomunun kısa kolu üzerinde yer alan DAX1, steroidogenik faktör-1 (SF-1) aktivitesini düzenlemekte, böylece Sertoli ve Leydig hücrelerinin oluşmasını engellemektedir. Ayrıca SRY geninin yokluğu SOX9 inaktivasyonunu sağlarken DAX1 aktivasyonu dişi gonadda yüksek protein ekspresyonunun sürdürülmesini sağlar. DAX1, steroid üreten dokuların gelişimi ve işlevinin düzenlenmesini SF-1 ile birlikte yürütmektedir. SF-1, steroidogenik enzimleri ve AMH'yi kodlayan genlerin ekspresyonunu

etkiler. Örneğin, farede SF-1'in eksikliğinde gonadlar gelişmemektedir. Sertoli hücrelerinin salgısı olan Müllerian baskılayıcı madde (MIS) salgılanmayacağından, müllerian kanallardan östrojenlerin etkisi ile tuba uterina'lar, uterus, serviks ve vajinanın üst kısımları meydana gelmektedir. Ayrıca gonadın overe farklanabilmesinde WNT₄ büyüme faktörünün de rolü vardır. WNT₄, gelişimin erken evrelerinde her iki cinse ait gonadlardan salgılanır. WNT₄ sadece gelişmekte olan ovaryumda kalıcıdır. İn vitro çalışmalarda WNT₄ ekspresyonunun DAX1 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.^{21,32,52}

Genital sistemin gelişimi erken embriyonik dönemde her iki cinste de benzer olduğundan embriyonik gelişmenin bu dönemi 'seksüel gelişimin farklanmamış evresi' olarak isimlendirilir.²²

Erkek ve dişi embriyolarda Mezonefrik (Wolffian) ve paramezonefrik (Müllerian) kanallar olmak üzere iki çift genital kanal vardır.²¹ Mezonefrik kanallar erkek genital kanalların gelişiminde önemli bir yer tutarken, paramezonefrik kanal ise dişi genital kanalların gelişiminde rol oynar. 5.-6. haftalarda genital sistem farklanmamış evrede olduğundan, embriyoda hem mezonefrik kanal hem de paramezonefrik kanal birlikte çift halde bulunur.²⁰

Mezonefrik kanallar, mezonefrik böbreklerden idrarın taşınmasını sağlar ve erkekte üreme sisteminin gelişmesinde rol oynar. Dişideki mezonefrik kanallar ise bazı kalıntıları dışında tamamen dejenere olur.²⁰

Paramezonefrik kanallar, mezonefrik kanalların ve gonadların lateralinde gelişirler. Mezonefrosların lateral yüzündeki mezotelin uzunlamasına invaginasyonu ile paramezonefrik kanallar ortaya çıkar. İnvaginasyonların kenarları kaynaşır ve paramazonefrik kanallar meydana gelirler. Paramezonefrik kanalları, kranial uçtan huni şekilli bir yapı ile periton boşluğuna açılırlar. Paramezonefrik kanallar, pelvik bölgeye ulaşıncaya değin, mezonefrik kanallara paralel şekilde kaudale doğru uzanırlar. Pelvik bölgede mezonefrik kanalları ventralden çaprazlarlar ve orta hatta birleşerek kaynaşırlar. Bu kaynaşma ile Y şekilli uterovaginal primordium oluşur ve ürogenital sinüsün dorsal duvarı içine uzanır, burada kabartı şeklinde sinüs (müllerian) tüberkülünü oluşturur.²⁰

Erkek embriyonlarda testislerdeki Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosteron, dişi embriyonlarda olmadığından, mezonefrik kanallar gerilerken, Sertoli hücrelerinin salgısı olan Müllerian baskılayıcı madde (MIS) yokluğuna bağlı olarak da paramezonefrik kanallar gelişir ve ileri farklanır.^{20,21} Dolayısıyla, seksüel gelişimin uyarılmasında erkek cinsiyeti için testosteron gerekli ise de, dişi cinsiyetin gelişimi için ovaryumların ya da hormonların varlığı gerekli değildir.²⁰

Paramezonefrik kanalda başlangıçta 3 kısım ayırt edilebilir:

1. Peritona açılan kranial vertikal kısım
2. Mezonefrik kanalları çaprazlayan horizontal kısım
3. Karşı eş kanal ile birleşen kaudal vertikal kısım

Ovaryumların aşağı inişiyle, paramezonefrik kanalların ilk iki kısımdan tuba uterina'lar gelişir. Kaudal vertikal kısımdaki birleşen kanallar ise uterus kanalını oluşturur. Vajinanın üst kısmı, paramezonefrik kanalların kaudal vertikal kısmından oluşturulurken, alt kısmı ise ürogenital sinus tarafından oluşturulur.^{20,21}

Paramezonefrik kanalların kranial vertikal parçalarının açık olan üst uçları tuba uterina'ların fimbriyalarını yapar. Tuba uterina'ların infundibulum ve ampulla kısımları da yine kranial vertikal kısımdan oluşmaktadır. Horizontal kısım ise isthmus'u biçimlendirir. Uterus'un gelişmesi ile tuba uterina'lar vertikalden karın boşluğunun iç kısmına doğru hareket eder ve horizontal hale gelir. Tuba uterina'ların gelişimlerinin belirginleşmesi 16-20. haftalar arasında olur.²¹

Paramezonefrik kanalların ikinci kısmının medio-kaudal yönde yer değiştirmeleriyle ürogenital sırtlar daha horizontal bir düzleme otururlar. Kanallar orta hatta birleşiş, enlemesine kalın bir kıvrım oluştururlar. Bu şekilde birleşmiş paramezonefrik kanalların lateralinden pelvis duvarına kadar uzanan bu kıvrıma uterusun sınırlayıcı ligamenti denir. Sınırlayıcı ligamet ve uterus, pelvisi uterorektal kısım ve uterovezikal kısım olarak ikiye ayırır. Bu ligament üst yüzden tuba uterinalar, arka yüzden ise ovaryumlar ile sınırlıdır.²¹

Mezonefrik ve paramezonefrik kanalların bazı parçaları dejenere olmayıp, yetişkinde kalıntı yapılar halinde kalırlar. Bu kalıntılar, eğer patolojik değişikliklere uğramazlarsa, çok nadiren gözlenirler.²⁰

Dişilerde mezonefrik kanalın büyük bir kısmı dejenere olur. Ancak, mezonefrik kanalın kranial ucu appendiks veziküloza denilen kalıntı bir yapı şeklinde kalır. Ayrıca, ovaryum ile tuba uterina arasındaki mesovaryum içerisinde bulunan, erkekte duktuli efferentesler ve duktus epididimis karşılığı olan, birkaç kör uçla sonlanan epoophoron adı verilen kalıntılar da bulunmaktadır. Uterus'a yakın yerleşimli bazı kalıntılar da paraophoron olarak adlandırılırlar. Uterus veya vajen duvarında görülen mezonefrik kanalın kaudal kalıntıları ise Gartner kistlerini oluşturur.²¹

Paramezonefrik kanalın kranial ucunun bir kısmı, tuba uterina'nın oluşumuna katılmaz ve veziküller şeklinde Morgagni hidatiği adı verilen bir oluşum kalır.²¹

Tuba uterina'nın gelişim anomalileri çok yaygın değildir. Ancak, birkaç tip tanımlanmıştır. Bunlar; hidatik kistler, aksesuar ostia, tüp duplikasyonu, tamamen veya segmental yokluk, kas katmanı yokluğu ve tüpün kanalize olamamasıdır.²⁰

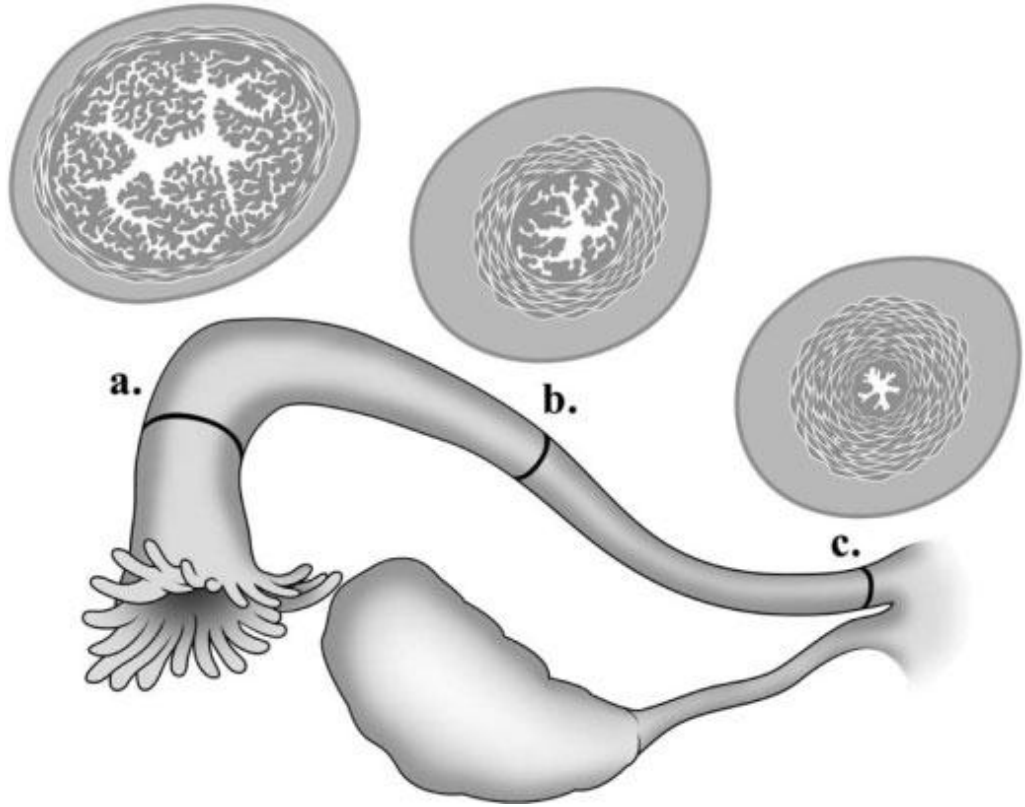
2.2. Tuba Uterina'nın Anatomisi (Salpinks, Fallop Kanalı)

Tuba uterina'lar, uzunluğu yaklaşık 12-16 cm, çapı ise 3-8 mm olan, fundus uteri'nin iki köşesi ile ovaryumun üst ucu arasında kalan bir çift boru biçimli organdır.²³

Uterus'a yakın olan kısmı horizontal olarak laterale doğru ilerler, daha sonra da arkaya ve yukarıya doğru uzanarak ovarium'un üst

ucuna gelir. Burada tekrar ie ve aşağıya doğru dönüş yaparak ovarium'un üst kenarını kuşatır.²³

Tuba uterina'nın anatomik olarak 4 farklı bölümü vardır. Bunlar, infundibulum tuba uterina, ampulla tuba uterina, isthmus tuba uterina ve pars uterina olarak adlandırılır.



şekil 1. İnsan tuba uterinası şematik gösterimi.³⁹ A.İnfundibulum B. Ampulla C. İsthmus

2.2.1. Infundibulum Tuba Uterina

Tuba uterina'nın ovaryum'lara en yakın olan bölümdür.²⁴ Tuba uterina'nın en geniş bölümü olan bu kısım, huni şeklindedir. Ostium abdominale tubae uterinae adı verilen delikle periton boşluğuna açılır. Infundibulum tuba uterina, yaklaşık 1-2 cm uzunluğundadır. Infundibulum, ovaryumun yüzeyine doğru uzanan fimbria tuba uterina denilen yaklaşık 20-25 adet saçak şeklinde uzantılar içerir. Bu saçaklardan en uzununa, fimbria ovarica denir ve ovaryum'a tutunur. Fimbria ovarica'nın uzunluğu yaklaşık 2-3 cm'dir.²³ Infundibulum hareketlidir ve olgunlaşan Graaf folikülünün çevresini sarar.^{23,25}

2.2.2. Ampulla Tuba Uterina

Organ uzunluğunun 2/3' ünü oluşturan, kıvrımlı yapı gösteren bölümdür. Uzunluğu yaklaşık 7 cm., çapı 5-10 mm.dir. Tuba uterina'nın en uzun parçasıdır. İç boşluğu geniş, duvar kalınlığı ise incedir.³³ Lümeni isthmus'a doğru daralır.³⁴ Spermium ovum'u genellikle burada döller.²³

2.2.3. Isthmus Tuba Uterina

Lümeni en dar bölümdür. Ortalama uzunluğu 2-2.5 cm. kadardır. Kalınlığı ise 3-4 mm. kadardır.³³ Uterus'a cornu uteri'den girer ve uterus boşluğuna açılır. Bu deliğe ostium uterinum tubae denir.²³

2.2.4. Pars Uterina (İntramural Parça)

Tuba uterina'nın en dar bölümüdür.³⁴ Yaklaşık 1 cm uzunluğunda olan intramural parça uterus'un üst köşelerinden içeriye girer, uterus'un kalın miyometriyum tabakasından geçerek ostium uterinum tuba yoluyla cavitas uteri'ye açılır.³⁵

Tuba uterina'nın intramural parçası dışında kalan kısımları periton ile örtülüdür.³⁶

2.2.5. Tuba Uterina'nın Damarları

Tuba uterina'nın arterleri a. uterina ve a. ovarica'dan gelen ramus tubarius adındaki dallardır. A. uterina'dan gelen bir dal, diğer dallardan daha kalındır ve Sampson arteri olarak adlandırılır. Bu artere cerrahi işlem sırasında dikkat etmek gerekir. Bu dal, a. ovarica ile anastomoz yaptığı yerin yakınında a. uterina'dan ayrılır ve mesosalpinx'in iki yaprağı arasında tuba uterina boyunca fimbria tuba uterina'ya dallar vererek ilerler.²³

Arteria uterina, tuba uterina'nın 2/3 medial kısmını, a. ovarica ise 1/3 lateral kısmını besler.³⁶

Venler, arterleri ile birlikte dağılırlar. Venlerin bir bölümü plexus ovaricus'a, v. ovarica'ya bir kısmı da v. uterina'ya dökülür.²³

Lenf damarları, uterus'un fundus kısmı ve ovaryum'un lenf damarları ile birlikte uzanırlar. Nodi lymphatici lumbales ve daha sonra da nodi lymphatici aortici laterales'e açılır.

2.2.6. Tuba Uterina'nın Sinirleri

Sinirleri kısmen plexus ovaricus'tan, kısmen de plexus uterinus'tan gelir. Afferent lifler, 11. ve 12. torakal ve 1. lumbal sinirlerle medulla spinalis'e taşınır.²³

2.3. Tuba Uterina'nın Histolojisi

Tuba uterina'nın duvarı 3 katmandan oluşur. Bunlar içten dışa doğru sırasıyla; tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza'dır.²⁶

2.3.1. Tunika Mukoza

Mukoza, çok sayıda longitudinal kıvrım içermektedir. Bu kıvrımlar tuba uterina'nın özellikle üst bölümlerinde yüzey alanını büyük oranda artırır. Kıvrımların yüksekliği ve sayısı uterus'a doğru yavaşça azalma gösterir. Uterus'a en yakın olan intramural parçada, katlanmalar azalarak lümeneye doğru uzanan küçük çıkıntılara dönüşür ve iç yüzü neredeyse düz hale gelir.^{26,27} Tunika mukoza, lümeni döşeyen epitel ve altındaki lamina propriyadan oluşur.

2.3.1.1. Epitel

Epitel, iki çeşit hücre içeren tek katlı prizmatik epiteldir. Bu hücreler, sayıca çok olan silli hücreler ve daha az sayıda olan salgı yapan hücrelerdir.²⁷ Epitelin boyu ampulla bölgesinde yüksek olup, uterus'a yaklaştıkça alçalır.²⁸ Epitelin yüksekliği ve hücre tiplerinin sayıları, bölgesel olarak ve menstruel döngünün evrelerine göre değişiklik gösterir. Menstruel döngünün proliferasyon evresinde, epitel hücreleri uzun ve silindirik, silli hücreler çoğunluktadır. Sekresyon evresinde ise, epitel hücreleri alçak silindirik veya kübiktir, salgı yapan hücreler çok sayıdadır.²⁷

Kinosilyalı Hücreler

Solunum yollarındaki silli hücrelerle benzer yapı sergilerler. Yaklaşık olarak 30 µm yüksekliğinde ve 12 µm genişliğinde olan, açık renk boyanan hücrelerdir. Hücrelerin apikal yüzlerinde yaklaşık 50 adet sil vardır.³¹ Hücrelerin çekirdekleri oval şekillidir ve ökromatik yapı gösterirler. Golgi aygıtları küçüktür. Çok sayıda enine kristal mitokondriyonları kapsarlar. Çekirdek yakınında multiveziküler cisimler ve sentriyoller belirgindir.^{38,46}

Siller, düzenli yerleşim gösteren mikrotübüller içerirler. Bu mikrotübüller silin çıktığı yerde bulunan bazal cisimcikten köken alırlar ve 9 çift+2 mikrotübül yapısındadırlar. Silli hücreler, yuvarlak çekirdeklidirler. Sillerin hareketi uterus'a vurum şeklindedir.^{29,30} Sillerin başlıca işlevi, oositi tuba uterinanın içerisinde uterusu doğru iletmektir.²⁷ Ayrıca sillerin bu

hareketi ile uterustan periton boşluğuna doğru mikroorganizmaların geçişi de engellenir.⁴⁰

Silyaların salgıları ve boyları hormonlar tarafından denetlenir. Follikülogenezis evresinde östrojen hormonu seviyesindeki artışla beraber bu hücreler büyürler ve silyaların sayılarında artış olur (silyogenezis). Östrojen ayrıca sillerin vurumunu da arttırır. Luteoliz sırasında progesteron hormonu etkisiyle silyalı hücrelerin boyları kısalır, silleri yok olur (desiliasyon).^{27,28,30}

Geç proliferasyon evresinde fimbriya bölgesindeki kinosilyalı hücre sayısında artış görülür. Kinosilyalı hücrelerin sayısındaki artış, erken sekresyon evresinde ampulla ve isthmus bölgelerinde en üst düzeydedir. Sekresyon evresinde kinosilyaların boyu kısalır. Gebelik döneminde ise hücre boyu en alçak düzeye iner.⁴¹

Salgı Hücreleri (Peg Hücreleri)

Silyasız olan salgı hücreleri, kinosilyalı hücrelere göre daha küçük ve daha az sayıdadırlar. Yüzeyden yukarı çıkıntılar oluştururlar. Epitele sokulmuş bir çiviye benzerler. Bu nedenle peg hücreleri (çivi hücreleri) olarak da isimlendirirler.²⁹ Hücrelerin sitoplazmaları salgı granülleri içerdiğinden hematoksilen-eozin boyamasıyla silyalı hücrelere göre, koyu renkte boyanırlar.³⁰

Aktif salgılama yapan peg hücreleri oldukça fazla GER, belirgin Golgi kompleksi, çok sayıda salgı vezikülü, birkaç lizozom ve yüzey alanını arttıran mikrovillüslara sahiptir. Ayrıca, çok sayıda serbest ribozom, filamanlar ve mikrotübüller kapsar.^{29,46} Peg hücreleri, tuba uterinadaki oositin zona pellusida'sına bağlanan yüksek moleküler ağırlıklı glikoprotein salgırlar.²⁹ Oluşturulan bu salgı, ovumun korunma ve beslenmesini sağlar. Bu salgı aynı zamanda spermiyumun kapasitasyonu ve spermiyumun zona pellusidaya girmesini de içeren döllenme öncesi üreme olaylarını da düzenler.^{29,41,42}

Sekresyon evresinde, oositin beslenmesini sağlayan glikoproteinleri sentezleyen ve salgılayan peg hücreleri çok sayıdadır.^{27,29}

Ovulasyon sırasında silyasız hücrelerin sayısının, ampulla ve isthmus'ta, pre-ampullar bölgeye göre daha fazla olduğu görülmüştür. Özellikle isthmus'taki epitel hücrelerinin çoğunluğunun silyasız olduğu belirlenmiştir.⁴³

İsthmus'tan fimbriya bölgesine doğru gidildikçe silyalı hücre oranı giderek artarken, salgı hücrelerinin oranı azalır.³⁰ Tuba uterina'nın farklı bölgelerinde silyalı hücrelerin salgı hücrelerine oranı; infundibulumda % 50-80, ampullada % 33, isthmusta %25, intramural parçada %10 olarak saptanmıştır. Fimbriya bölgesinde silyalı hücre sayısının fazla oluşu oositin tuba uterina lümeni içine alınması ve taşınabilmesi için çok önemlidir. Kinosilyalı hücrelerin oranı %40'ın altına inmesi durumunda oositin taşınması gerçekleşemediği belirtilmiştir.⁴⁴

2.3.1.2. Lamina Propriya

Lamina propriya gevşek bağ dokusu yapısındadır. İnce kollagen ve retiküler lifler içerir. Bol miktarda mekik şekilli hücreler vardır. Burada bağ dokusu hücrelerinden olan fibroblastlar, histiyositler, ve mast hücreleri bulunur. Lamina propriya bez içermez. Lenf damarları ve sinirlerden zengindir. Kan damarları özellikle fimbriya bölgesindeki lamina propriyada boldur. Bu kan damarları arasında düz kas demetleri ağısı yapı oluştururlar. Kanın damarlara dolması ve düz kas demetlerinin kasılmasıyla infundibulum bölgesinin ağzı ovaryum yüzeyi ile ilişki kurarak oositin tuba uterina lümenine alınmasını sağlar. Fimbriyaların hareketi de bu düzenek ile sağlanır.⁴⁴

2.3.2. Tunika Muskularis

Tunika muskularis, içte enlemesine (sirküler), dışta uzunlamasına (longitudinal) düzenlenmiş kas katmanıdır. Sirküler ve longitudinal kas katmanları birbirinden kesin sınırlar ile ayrılmamıştır. Sirküler kas katmanı tuba uterina'yı tümüyle sararken, longitudinal kas katmanı ise kesintili bir yerleşim gösterirler. Tunika muskularisin kas demetleri arasında gevşek bağ dokusu ve kan damarları bulunur. Elastik liflerden zengin olan bu doku ligamentum latum ile tunika seroza içine doğru yayılım gösterir.^{44,45}

Tunika muskularis'in kalınlığı uterusu doğru artar ve ritmik kasılmalar yapar. Kasılmalar, spermin oosite ve döllenmiş oositin de

uterus'a doğru ilerlemesine olanak sağlar. Bu ritmik kasılmalar kandaki östrojen düzeyine koşut olarak artış gösterir.⁴⁴

2.3.3. Tunika Seroza

Tunika seroza, peritonun visseral yaprağıdır. Periton, intramural bölge dışında tuba uterina'nın tamamını sarar ve bir periton bağı oluşturur. Tunika seroza'da büyük kan damarları görülür.²⁸

2.4. Tuba Uterina'nın Fizyolojisi

Dişi üreme sistemi düzenli döngüsel değişimler gösterir. Bu değişimler, döllenme ve gebelik için belli sürelerle yapılan hazırlıklardır. Bu döngüsel olaylar sırasında tuba uterina'lar birçok işleve sahiptirler. Spermiyum, oosit ve döllenmiş yumurta için kanal işlevi görmelerinin yanı sıra, döllenme ve döllenmiş yumurtanın erken gelişimi bu organda gerçekleşmektedir. Döllenmenin tuba uterina'da gerçekleşmesi halinde yüksek oranda gebelik görülür.⁴⁷

Ovulasyondan sonra oosit yüz ya da daha çok sayıda granüloza hücresiyle birlikte periton boşluğuna atılır. Tuba uterina'nın fimbriya şeklindeki uçları ovaryumların çevresine uzanmış haldedir. Atılan oositin uterus boşluğuna ulaşabilmesi için tuba uterina lümeninden geçmesi gerekir.⁴⁷ Fimbriya bölgesindeki düz kas demetleri ve bu demetler arasındaki yoğun kan damarı ağı, bu bölgenin erektile doku özelliğini kazanmasını sağlar. Ovulasyonda bu kan damarları kan ile dolar ve

fimbriyalar şişerek kalınlaşır. Buradaki düz kas demetlerinin kasılmasıyla fimbriyalar ovaryum yüzeyine doğru hareket eder. Infundibulum bölgesinin huni şeklini alması ile, ovaryum yüzeyine yaklaşılarak serbest kalmış ovumun tuba uterina lümenine alınması sağlanmış olur.⁴⁸

Tuba uterina epitelinde bulunan siller uterusu doğru vurma hareketi yaparlar. Fimbriyaların da iç yüzeyini örten bu silyalı epitel hücrelerindeki silyalar overden salgılanan östrojenle aktive olur, aynı zamanda aktif salgılama yapan hücrelerin de sayısını artırır. Bu şekilde silyalar, tuba uterinaların ağzını açacak şekilde sürekli vurumlarla hareket ederler. Bu hareket lümene doğru yavaş sıvı akımı sağlar ve ovum tuba uterina lümenine alınır.⁴⁸

Ovumun döllenmesi tuba uterina'nın ampulla bölgesinde olur. Dişi üreme kanallarında biriken 200-300 milyon spermden ancak 300-500 tanesi bu bölgeye ulaşabilir. Diğer spermilerin döllenmeyi gerçekleştirecek olan sperme, dişi gameti koruyan engelleri aşmasında yardımcı oldukları düşünülmektedir.²¹ Oositin döllenebilmesi için kapasitasyonunu tamamlamış olan spermiyumun önce korona radiatayı geçmesi, daha sonra oositi çevreleyen zona pellusida'ya bağlanması ve penetre olması zorunludur. Spermiyumun oosite girmesiyle, baş kısmı şişer ve dişi pronükleusla aynı boyuta gelen erkek pronükleusunu oluşturur. Erkek pronükleusundaki 23 tek kromozom ile, dişi pronükleusun 23 tek kromozomu biraraya gelerek, döllenmiş ovumun (zigot) birbirini bütünleyen 46 kromozomunu yaparlar.^{21,47} Döllenmiş ovum (zigot), 3-5 gün süren yolculukla tuba uterina'lardan uterus'a doğru taşınır. Oluşan zigot bu sırada birçok bölünme geçirir ve yaklaşık yüz hücreden oluşan blastosist uterus'a girer.⁴⁷

Tuba uterina'lar tüm bu işlevlerini, üç temel faktör olarak sayabileceğimiz; tubal motilite, tubal sıvı ve sil hareketleri sayesinde gerçekleştirirler.

Tuba uterina'daki düz kasların peristaltik hareketleri temel olarak üç sistem tarafından düzenlenir; Ovaryum hormonları, Adrenerjik-nonadrenerjik sistem, Prostaglandinler.

Ovaryum hormonları, östrojenler ve progestinler olarak iki tiptir. Östrojenlerin en önemlisi östradiyol iken, progestinlerin ise progesterondur. Östrojen tubal hareketliliği uyarırken, progesteronların B reseptörlerini aktive etmesi ile tubal hareketlilik baskılanır. Ovulasyondan önce, tubal kasılmalar yavaşken, ovulasyon ile birlikte güçlenir ve fimbriya bölgesi ovaryum yüzeyini süpürür. Ovulasyondan 4-6 gün sonra progesteron düzeyi artarak tubal hareketlilik baskılanır ve tubal kasların gevşemesi ile ovumun uterusu geçişi sağlanır.^{31,49}

Östrojenler, uterus endometriyumuna yaptıkları benzer etkiyi, tuba uterinalardaki mukoza katmanına da yaparlar. Epitel hücreleri, menstrual döngünün evreleriyle ilişkili olarak döngüsel değişikliklere uğrar. Bu değişiklikler en belirgin olarak, fimbriya ve ampullanın üst bölgesinde gözlenir. İsthmus epitelinde çok az değişiklik olur, bu da isthmus'un östrojene daha az bağımlı olduğunu gösterir. Östrojen, salgı oluşturan hücrelerin çoğalmasında ve daha da önemlisi, lümene uzanan silyalı epitel hücrelerinin sayısında artış sağlar. Bu değişiklikler döngünün ortalarında en üst seviyede iken, sekresyon evresinde geriler.

Tuba uterina'nın işlevsel özelliği ve epitelinin proliferasyonu , östrojen reseptörleri ve hücrelerdeki tuba uterina'ya özgü transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenir. Siliyer vurumun frekansı da hormon düzeyleriyle ilişkilidir.^{50,51}

Progesteron, tuba uterina mukozasında salgılama ile ilgili değişimleri başlatır. Salgı, döllenmeden sonra tuba uterina'da bölünerek ilerleyen zigot'un beslenmesi için gereklidir.⁵⁰

Adrenerjik innervasyonlar, isthmus bölgesinde belirgin olarak tuba uterina'da hareketliliğin düzenlenmesinde önemlidir. Tuba uterina, menstrual döngünün proliferatif ve menstruasyon evrelerinde, norepinefrin gibi alfa adrenerjik bileşiklere duyarlılığı fazladır. Ovulasyondan sonra ve luteal evre boyunca, norepinefrine olan yanıt azalır ve beta adrenerjik bileşiklerin baskılayıcı etkisi belirginleşir. Luteal evrede, progesteron artışı ile isthmus bölgesinin lümen çapı genişler. Bu şekilde ovumun isthmustan geçişi kolaylaşmış olur.⁴⁵

Tubal hareketliliğin düzenlenmesinde prostaglandinlerden, prostaglandin F2 alfa (PGF2 alfa)'nın tubal kasılmaları uyardığı bilinmektedir. PGE1 ve PGE2 ise tubal kasılmaları baskılamaktadır. Ayrıca bu prostaglandinlerin laboratuvar ortamında sil aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir.³¹

Fertilizasyonun ve erken embriyo gelişiminin gerçekleştiği tuba uterina'lar aktif salgı yaparlar. Viskoz bir yapıda olan tubal sıvı döllenmenin yanı sıra, gametlerin olgunlaşması ve embriyonik gelişim için

uygun bir ortam sağlar.⁴³ Tubal sıvı esas olarak, Peg hücreleri tarafından salgılanırken, bir bölümü de doku sıvısı oluşturur. Mukoproteinler, elektrolitler ve enzimlerden zengin olan tubal sıvının lümendeki birikme yüzeyi 1-3 ml/24 saat'tir ve ovulasyonda en üst seviyeye ulaşır. Sonuç olarak, tubal sıvı fertilizasyon ile erken gelişim döneminde rol oynarken, diğer yandan spermiyumun kapasitasyonunu da sağlamaktadır.⁵²

2.5. KEMOTERAPİ

Kanser, normal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invaziv nitelik kazanarak uzak organlara yayılması ile ilerleyen ve sonuçta ölüme neden olan bir hastalıktır.⁷ Çağımızda kanser, görülme sıklığı, tanı, sağkalım ve sosyoekonomik yönü ile tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de giderek büyüyen sağlık sorunudur. Kanser, ölüme yol açan hastalıklar arasında kalp hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır.

Kanser tedavisi, hastalığın aşamasına, tümörün histolojik yapısına ve metastaz olup olmama durumuna göre belirlenir.⁵³ Sıklıkla uygulanan tedavi yöntemleri ise kemoterapi, radyoterapi, cerrahi tedavi, kemik iliği transplantasyonu ve immünoterapidir. Kanser tanısı konan hastaların bireysel özelliklerine ve hastalık durumlarına göre bu yöntemlerden bir veya bir kaç tane tedavide kullanılmaktadır.⁵⁴

Kemoterapi, kanseri ilaçla tedavi etme yöntemi olup, hastalığın sürecini yavaşlatmak, geriletmek ya da durdurmak amacıyla uygulanmaktadır. Bu terim, 19. yüzyılın sonlarında Paul Ehrlich tarafından kullanılmaya başlanmıştır.^{55,56} Kemoterapi, 1940'lı yıllarda nitrojen

mustard ile başlamış olup, bugün tedavide 40'tan fazla ilaç kullanılmaktadır. 1960'lı yıllara kadar kemoterapi bazı klinik bulguların azaltılması ve hasta yaşamını biraz daha uzatmak için kullanılmıştır. 1960'lı yıllardan itibaren hücre kinetiği bilgileri ve kinetik kavramları kemoterapi protokollerinde uygulanmaya başlanmıştır. Son yıllarda ilaçların kullanılmasında birçok gelişmeler kaydedilmiştir. Kanserde tedavi şansını arttıran bu gelişmelerden en önemlileri; kombine kemoterapi ve ilaçların cerrahi veya radyoterapi ile birlikte kullanılmalarıdır.⁵⁷

Kemoterapi uygulamaları şu şekilde sınıflandırılabilir:

Küratif kemoterapi: Primer tedavi ajanı olarak yapılan uygulamadır.

Neoadjuvan kemoterapi: Cerrahi ve radyasyon tedavisi öncesi tümör boyutlarını küçültmek amacıyla yapılan uygulamadır.

Adjuvan kemoterapi: Cerrahi ve radyasyon tedavisi sonrası, tedaviye yardımcı olarak yapılan uygulamadır.

Palyatif kemoterapi: İnoperabl olgularda semptom kontrolü için yapılan uygulamadır.

Konkomitan kemoterapi: Radyasyon ve biyolojik tedavilerin daha iyi sonuç vermesi için yapılan uygulamadır.

Kombine kemoterapi: Tümör tekrarlandığında veya orjinal tümörden çevre dokulara yayıldığı durumda, birden fazla ilacın birlikte kullanılmasıdır.

Kemoterapik ilaçlar kimyasal yapıları ve hücre aktivitesine göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır:

Alkilleyici Ajanlar: Hücre döngüsüne bağımsız ilaçlardır. Sitotoksik etki ile DNA sentezini bozarak mitoz bölünmeyi önler ve hücre ölümüne neden olur. Bu gruptaki ilaçlar arasında, Siklofosamid, Cisplatin, Busulfan, Carboplatin, Dacarbazine, Nitrojen mustard sayılabilir.

Antibiyotikler: Hücre döngüsüne bağımsız ilaçlardır. DNA ile bağlanıp, RNA sentezini ve DNA'ya bağlı protein sentezini inhibe ederek hücre bölünmesini engeller. Radyasyon ile verildiklerinde toksisiteyi arttıırırlar. Actinomycin-D, Adriamycin, Bleomycin bu gruba örnek olarak gösterilebilir.

Antimetabolitler: S fazı ile hücre döngüsüne bağımlı ilaçlardır. Bu ilaçlar hücre tarafından absorbe edilir ve RNA sentezi için gerekli olan biyokimyasal reaksiyonları ve hücresel büyümeyi engellerler. Bu gruba Cytrabine, Methotexate ve 6-Mercaptopurine örnek verilebilir.

Alkaloidler: M fazı ile hücre döngüsüne bağımlı ilaçlardır. Hücre döngüsünde metafaz aşamasını engellerler ve hücre ölümüne

neden olurlar. Bu grupta, Vincristine, Vinblastine, Etoposide ve Teniposide yer almaktadır.

Kortikosteroidler: Glukokortikoid reseptörleri ile bağlanarak hücre çekirdeğine geçerler. Burada DNA ile bağlanıp transkripsiyonu bozarlar. Prednisone, Dexamethosne bu gruba örnektir.^{8,58}

Enzimler: Belli hücre metabolitlerini inhibe ederler ve protein sentezine engel olurlar. L-asparaginase bu gruptandır.

Diğer ilaçlar: İnorganik platin bileşiklerinden oluşur. Bunlar DNA sentezini inhibe ederler. Allopurinol ve İnterferon gibi ilaçlar bu gruptandır.⁵⁴

Kemoterapi ile tümör hücrelerinin tamamen yok edilmesi, büyümeleriyle çoğalmalarının engellenmesi hedeflenir. Ancak tümör hücresi ile normal hücre arasındaki kemoterapi ajanının etki mekanizması yönünden belirgin bir fark olmaması, tümör hücrelerinin yanında normal hücrelerin de kemoterapi ile hasarlanmasına neden olmaktadır. Bu da ciddi toksisiteyi meydana getirir.^{59,60}

Kemoterapi ilaçlarında doz arttıkça artan etkinliği beraberinde toksisiteyi de arttırmaktadır. Bu durum da sonuçta, yüksek dozlarda toksisite, düşük dozlarda ise yetersiz tedavi sorununu doğurmaktadır. Bu nedenle normal dokularda kemoterapi sonucu oluşan toksisiteyi azaltmak için sitoprotektif farmakolojik ajanların geliştirilmesi

önemlidir. Böylece, kemoterapi ilaçların dozları yüksek tutularak tedaviye sonuç alınabilmekte ve hastaların tedavi toleransları artırılarak yaşam kaliteleri de iyileştirilebilecektir.⁶¹

Kemoterapi ilkelerini ve etki mekanizmalarını anlamak için, öncelikle normal hücre döngüsünün bilinmesi çok önemlidir. Hücre döngüsünün başlıca 5 evresi vardır:

1. G0 evresi: Mitoz sonrası hücrelerin dinlendikleri evredir. Bu evrede kemoterapik ajanların etkisi yok denecek kadar azdır. Normal hücreler zamanlarının çoğunu bu evrede geçirirler. Bir uyarıcının etkisiyle çoğalan hücre haline geçebilirler.

2. G1 evresi: Uyarılma sonucunda G1 evresi başlar. Hücre çoğalmak için gerekli olan RNA, enzimler ve diğer proteinleri sentezler. Hücre bu evrede kemoterapiye hassastır.

3. S evresi: Yeni DNA bu evrede sentezlenerek, hücre bölünmeye hazırlanır. Hücre bu evreyi etkileyen kemoterapik ilaçlara duyarlıdır.

4. G2 evresi: Mitoz için gerekli olan protein ve RNA sentezi bu evrede hızlanır.

5. M evresi: Mitoz evresidir. Dört aşamada iki yeni hücre oluşur. Bu yeni hücreler ya G1 evresinden yaşam döngüsüne girerler ya da kemoterapiye dirençli olarak G0 fazında dinlenmeye çekilirler.^{8,63}

Kanser hücreleri ve normal hücreler benzer hücre döngülerine sahiptirler. Bu hücreler arasındaki en önemli fark, kanser hücrelerinde proliferasyonu durduran mekanizmanın bulunmaması ve organizmayı ölüme götüren duraksız bir proliferasyonun içinde olmasıdır.^{8,62}

Kemoterapik ajanlar en fazla hücreler proliferatif evredeyken etkilidirler. İlaçların geliştirilmesinde bu bilgi önemlidir. Çünkü, yaşam döngüsünün belirli bir evresine etki eden ilaçlar olarak ya da döngünün bütün evrelerine etkili ilaçlar olarak geliştirilebilir. Yaşam döngüsünde evreye özgün olmayan kemoterapik ilaçlar, özellikle alkilleyici ilaçlar ve platin türevi ilaçlar, G0 evresindeki hücrelere karşı da etkilidirler. Ayrıca sadece aktif olarak bölünen hücrelere değil yavaş büyüyen tümörlere de kısmen etkili bulunmuşlardır.⁸

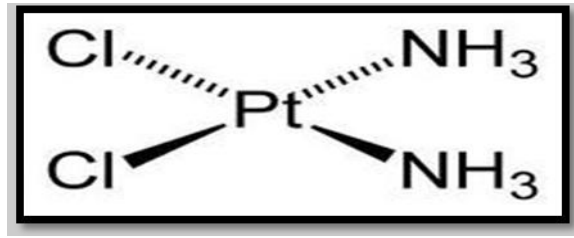
2.6. CİSPLATİN (Cis-diaminedikloroplatinum II, CDDP)

Cisplatin, solid tümörlerin tedavisinde etkin olarak kullanılan en önemli antineoplastik ilaçlardan biridir. Kemoterapi protokollerinin vazgeçilmez elemanı olan Cisplatin, erişkin çağda görülen bir kaç tümörün ve nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastom, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom gibi pek çok çocukluk çağı tümörlerinin tedavisinde rol alır.

Cisplatin, 1960'lı yıllarda Barnett Rosenberg tarafından tesadüfen keşfedilmiştir. Elektromanyetik radyasyon ile *Escherichia coli* hücrelerinin bölünmesi üzerine yaptığı deneyde, büyüme alanında platin elektrodları kullanmaktaydı. Bu büyüme alanında bakterinin filamanlarının normalden çok uzun olduğunu gözledi. Kısa sürede bu etkinin manyetik alandan değil, platin elektrodlarından çıkan elektroliz ürünlerinden kaynaklandığını gösterdi.⁶⁴ Platin türevli ürünlerin antibakteriyel ve antineoplastik etkilerinin de olduğu gözlemlenmiştir.⁶⁶ Araştırmalar sonucunda bu biyolojik etkiye sebep olan bileşenin ilk olarak 1845'te Peyrone tarafından sentezlenip, 1893'te Alfred Wegner tarafından tanımlanan ve 'Peyrone kloridi' olarak da bilinen, sonradan Cisplatin adını alan platinin bir 'sis izomeri' olduğu saptandı. Bu bileşenin bakterinin hücre bölünmesini engellediği ancak diğer büyüyen yapılara engel olmadığı için çok uzun filamanların ortaya çıktığını gösterdi. Cisplatine ait bulgular 1965 yılında yayınlandı ve 1968 yılında sarkomlu bir farede intraperitoneal Cisplatin uygulaması sonucunda tümör boyutunda gerileme olduğu gözlemlendi. İlk kez 1971 yılında kanser hastalarında başarı ile uygulanmaya başlandı.⁶⁴ 1978'de Amerika Gıda ve İlaç Kurumu, Cisplatinin servikal, baş, boyun, yumurtalık, testis, mesane gibi kanserlerin klinik tedavisinde kullanılmasını onaylamıştır.⁶⁵

2.6.1. Cisplatinin Yapısı ve Etki Mekanizması

Cisplatin, alkilleyici ajan olarak değerlendirilse de alkil grubu içermediğinden alkilleyici benzeri ajan olarak değerlendirmek daha doğru olur. DDP, Cisplatinyum, CDDP (cis-diamminedichloroplatinum) Cisplatin için kullanılan diğer isimler arasındadır.^{64,69} Cisplatin, merkezdeki iki değerlikli platin atomunu yatay düzlemde çevreleyen iki klor atomu ve iki amonyum molekülünden oluşur (Şekil 1). Suda çözünebilen, kristal yapıda sarı-turuncu renkte olan Cisplatinin moleküler formülü $PtCl_2H_6N_2$ ve moleküler ağırlığı 300.1 g/mol' dür.^{67,70} Bileşik cis ve trans olmak üzere iki izomere sahiptir. Sadece cis formu sitotoksik özelliğe sahiptir.⁶⁸



Şekil 2. Cisplatinin kimyasal yapısı⁶⁷

Cisplatin, gastrointestinal sistemden emilmediği için sadece intravenöz (İV) veya intraperitoneal (İP) olarak kullanılabilir.⁷¹ Plazma proteinlerine yaklaşık %90 oranında bağlanabilmektedir ve kullanımından 4 ay sonra bile böbrek dokusunda platine rastlandığı bildirilmiştir.⁷² Böbreğin yanı sıra karaciğer, bağırsak ve testis gibi organlara yüksek oranda geçmesine karşın kan beyin bariyerinden geçişi çok azdır. Cisplatinin plazmadan atılımı üriner yolla olmaktadır. İlk 6 saatte ilacın çok az bir kısmı böbrekten atılır. 24 saat sonunda ilacın %25'i elimine olurken, 5 güne kadar alınan ilacın %43 kadarı idrarda

saptanabilir. İlaç, hızlı enjeksiyon yerine infüzyon şeklinde verilirse, plazma yarılanma ömrü daha kısa ve vücuttan atılan ilaç miktarı daha çok olur.⁷¹

Cisplatinin, klinikteki tedavi sonuçları iyi tanımlanmış olsa da, sitotoksik etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.⁷³ Cisplatinin sitotoksik özelliklerini, nükleer DNA'ya bağlanıp replikasyonu ve transkripsiyonu bozarak ve çeşitli sinyal yollarını aktive ederek sağladığı düşünülmektedir. Cisplatin DNA ile etkileşerek, zincirler arası ve özellikle zincir içi komşu guaninler arasında çapraz bağlar oluşturur. Bu bağlar replikasyonu ve transkripsiyonu inhibe eder. Bu şekilde kopma ve yanlış kopya zincirler oluşumu ile ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Cisplatin ayrıca, hücre mitokondrisine zarar verir, hücre döngüsünü duraksatır, ATPaz aktivitesini engeller, hücresel transport sistemlerini inhibe eder ve sonuç olarak apoptozis, nekroz, inflamasyon ve hücre ölümüne sebep olur.^{64,75}

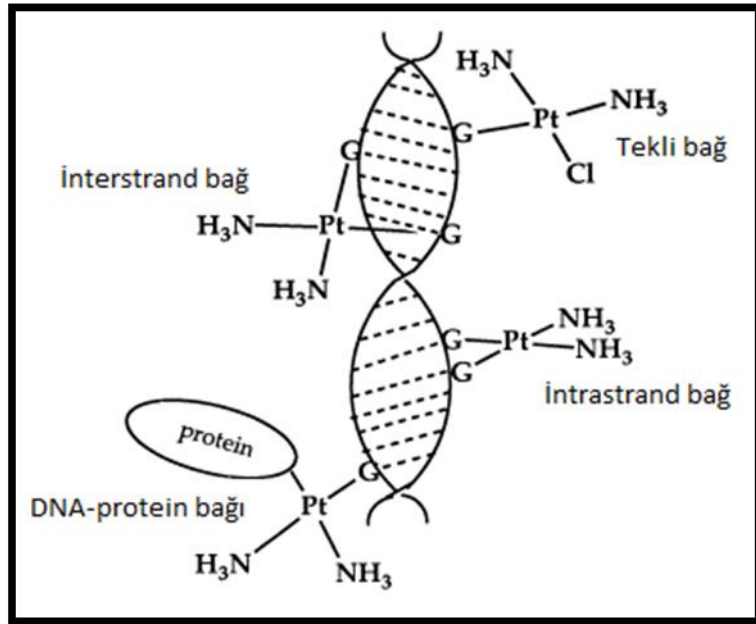
İlk yapılan çalışmalarda, Cisplatinin hücre içine pasif difüzyon ile alındığı öne sürülmüştür. Ancak son çalışmalarda, bakır transport proteini olan CTR1 'in Cisplatinin hücreye aktif olarak alınmasında etkili olduğu gösterilmiştir.⁷⁴ Cisplatin hücre içersine alındıktan sonra su ile reaksiyona girerek sahip olduğu klor iyonunu kaybeder ve kaybettiği klor iyonunun yerine su molekülü kazanarak ilacın nükleik asitlerle ve proteinlerle reaksiyona girebilen pozitif yüklü aktif şeklinin oluşması sağlanır.^{66,71}

İlacın etkinliği, ortamda bulunan klor iyonu derişimine bağlıdır. Klor iyonu derişimi yaklaşık olarak 100 mM olduğu kanda ve ekstraselüler sıvıda Cisplatinin etkinliği daha azdır.⁷³ Hücre içi klor iyonu

derişimindeki ani düşüşler, ilacın etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır.⁶⁶

Cisplatinin etkileşime girdiği nükleofilik moleküllerden olan DNA, genellikle Cisplatine bağlı sitotoksisitenin hedefi olarak kabul edilse de, diğer hücreyel hedefleri de ilacın sitotoksisitesine dahil olabileceği konusunda kanıtlar vardır.⁷⁶

Cisplatin, DNA'da guanin bazının oldukça aktif olan 7. azot atomu (N7) ile kolayca tepkimeye girer. Bu şekilde, tekli bağ, interstrand (iki DNA zinciri arasında), intrastrand (aynı DNA zinciri arasında) ve DNA-protein olmak üzere dört tip kovalent çapraz bağlar oluşturur. Bu bağlardan en sık görüleni ise, aynı DNA zincirindeki bazlar arasında görülen intrastrand bağlardır.^{73,76,77}



Şekil 3. Cisplatinin DNA ile oluşturduğu bađlar⁷³

DNA ile kovalent bağların oluşumu sonucu DNA'nın yapısı bozulur ve bozulan yerlere hücre hasarını fark eden hücre içi bazı proteinler bağlanır. Bu proteinlerden en önemlileri; yanlış eşleme tamir proteini 'mismatch repair' (MMR), nükleotid çıkarma onarım proteini 'nucleotide excision repair' (NER), DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK) ve histon olmayan yüksek mobilite grubu (HMG1 ve HMG2) proteinleridir.⁷⁶ Hasar görmüş DNA molekülü bu protein gruplarını kendisine çeker. Cisplatinin modifiye ettiği DNA yeterince yenilenemediği için, bu proteinlerin aktif hale getirdiği bir çok sinyal ileti yolları ile apoptozis başlatılır. Söz konusu hasar onarılamayacak kadar fazla ise hücre bunu tolere edemeyeceğinden hücre ölümü gerçekleşir.^{66,76}

2.6.2. Cisplatin Toksisitesi

Cisplatin, birçok değişik tümör gruplarında kullanılan kemoterapötik bir ajandır. Ancak klinik uygulamada kullanımını kısıtlayan kemik iliği toksisitesi, gastrointestinal toksisite, periferik nöropati, üzerinde çok fazla araştırma yapılan nefrotoksisite ve ototoksisite gibi bazı ciddi yan etkileri görülebilmektedir (Tablo 1). Ancak belli başlı doz sınırlayıcı yan etkisi nefrotoksisitedir.^{78,79}

Kardiyovasküler	Bradikardi, LBBB (nadir), hipertansiyon, serebral arterit, serebrovasküler olay (nadir)
Nörolojik	İşitme kaybı, tinnitus, vertigo, otonomik nöropati (nadir), nöbet (nadir), hıçkırık, periferik nöropati, optik nörit, bulanık görme, akut ensefalopati (nadir)
Gastrointestinal	Tad duyusunda bozukluk, bulantı ve kusma, diyare, anoreksi
Hematolojik	Miyelosüpresyon, anemi, hemolitik anemi, trombotik mikroanjiyopati (nadir)
Neoplastik	Akut lösemi
Dermatolojik	Saç dökülmesi, döküntü
Hepatik	Karaciğer fonksiyon değerlerinde yükselme, bilirubin yüksekliği (nadir)
Hipersensitivite	Tip I (anafilaktik) Tip II (hemolitik anemi)
Renal/Metabolik	Toksik nefropati, hipomagnezemi, hipokalsemi, hipokalemi, hiponatremi, hipofosfatemi, hiperurisemi
Reprodüktif	İnfertilite
Diğer	Kas krampları, plazma demir yükselmesi, Raynaud sendromu (nadir)

Tablo 1. Cisplatine bağlı yan etkiler ⁸⁴

Cisplatinin atılımı böbrekten olduğu için, böbrekte diğer organlara göre daha fazla ilaç birikimi gözlenmektedir.⁸⁰ Böbrek dokusunda biriken bu aşırı Cisplatin nefrotoksisiteye neden olmaktadır.⁸¹ Cisplatinin böbrekteki başlıca toksisitesi, proksimal tübül hasarlanması ile oluşmaktadır. Oluşan bu tübüler hücresel hasar, uzun yıllar araştırma konusu olmuştur. Hücresel toksisitede inflamasyon, oksidatif hasar, apoptoz, nekroz, fibrojeniz, hipoksi ve mitokondriyal hasarı içerir.⁸³

Cisplatin, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz ve heksokinaz aktivasyonu ile de serbest radikal üretiminin artmasına ve antioksidan üretiminin azalmasına neden olmaktadır. Cisplatin intraselüler kalsiyum düzeyini artırarak NADPH oksidazı aktive eder ve hasar görmüş mitokodri tarafından reaktif oksijen türlerinin üretimini uyarır. Cisplatin sonrası dokuda süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri artmaktadır. Oluşan bu serbest radikaller ise hücre membranı lipidlerini peroksidasyon ile bozarak hücresel hasara neden olmaktadır. Ayrıca proteinleri denatüre ederek enzimatik inaktivasyona neden olurlar. Bu serbest radikal türleri mitokondriyal işlevin de bozukluğuna yol açarlar.^{82,83} Ayrıca Cisplatin, antioksidan sistemdeki SOD, GPx ve katalaz enzimlerinde azalmaya neden olmaktadır.⁸⁷

Cisplatin uygulamasından önce, uygulama sırasında ve uygulamadan sonra salin (%0.9 NaCl) ile etkin hidrasyon yapılması ilacın toksisitesini büyük ölçüde azaltmaktadır.⁸⁵ Salin ya da daha hipertonic sıvılarla hidrasyon yapılması Cisplatinin vücuttan atılımını artırabilir. Salin ayrıca yüksek klorür derişimi sağlayarak klorür iyonlarının platin molekülünden ayrılmasını engeller. Bu sayede de reaktif Cisplatin türleri oluşamaz.⁸³

Cisplatinin kullanımında uzun süreli infüzyon uygulaması ile toksisite en az düzeye indirilmeye çalışılır. Toksisite tam olarak önlenemeyecek ise doz azaltılır ya da ilaç kullanımı kesilir. Bu ilaç ile tedaviye devam etmek amacıyla, toksisiteyi önleyici ajanların kullanılması önemlidir.⁸⁶

Klinikte antitümöral ajan olarak kullanılan platinum bazlı kemoterapik bir ilaç olan Cisplatin'in, nefrotoksisite, ototoksisite ve nörotoksisite gibi çok sayıda toksik etkisi nedeniyle kullanımı sınırlıdır.^{15,78} Nozaki Y ve arkadaşlarının (2009); yaptıkları çalışma incelendiğinde serum fizyolojik (SF) içerisinde hazırlanarak periton içi verilen 2 mg/kg Cisplatin uygulamasının 10 hayvandan 4' ünün ölümüne neden olduğu görülmüştür.¹⁶⁵

2.7. APOPTOZİS

Organizmada bulunan hücrelerin işlevlerinin yanında, sayıları da o organizmanın yaşamı için son derece önemlidir. İnsan vücudu yaklaşık 1×10^{14} hücreden oluşmaktadır ve her gün milyarlarca hücre homeostasinin korunabilmesi için ölmektedir.⁸⁸ Hücre ölümü, gelişmenin düzenlenmesinde ve doku homeostasinin korunmasında hücre çoğalması kadar önemlidir.⁸⁹

Hücre ölümü ile ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskobunun ve yeni boya yöntemlerinin bulunmasıyla ilk olarak 'nekrozis' tanımı yapılmıştır.⁹⁰ 1972 yılında ilk defa Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologlar tarafından tanımlanmış olan apoptozis, Yunancada 'apo'

(=ayrı) ve 'ptosis' (=düşen) kelimelerinden oluşturulmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan kelimedir.⁹¹ Apoptozis, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, RNA'ya, protein sentezine ve enerjiye gereksinim duyan, evrimsel olarak korunmuş programlı hücre ölümüdür.⁹² Önceleri 'büzüşme nekrozu' olarak tanımlanmış olan bu hücre ölümü daha sonra ölüm sürecinin nekrozdaki tamamen farklı olduğu ispatlanmıştır.⁹⁰ Ayrıca 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptozda endonükleazların DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiştir.⁹¹

2.7.1. Apoptozisin Fizyolojik ve Patolojik Olaylarla İlişkisi

Programlı hücre ölümü denilen apoptozis; morfolojik olarak özgün, enerji gereksinimi olmayan birçok fizyolojik ve patolojik dönemde rol alan, genlerle yönetilen bir mekanizmadır.⁹³ Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücreler apoptozis ile genetik olarak kontrol edilerek ortadan kaldırılır.

Apoptozis, embriyonik dönemden başlayarak fötusun implantasyonundan organogenezise kadar tüm yaşam boyunca bir çok gelişim basamağında rol oynar.⁹⁴ Embriyogenezis sırasında bazı canlılarda parmaklar arasındaki perdenin ve damak füzyonu sonrası kalıntı epitel hücrelerinin ortadan kaldırılmasında apoptoz görev alır. Apoptozisin homeostazis mekanizması olarak, menstruasyon döneminde endometriyumun dökülmesi, ovaryan follikül atrezisi, laktasyon kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesi gibi hormona bağımlı değişikliklerde; deri, gastrointestinal sistem hücreleri gibi sürekli çoğalan

hücre gruplarının azaltılmasında; immün hücrelerin seçiminde etkin rol oynamaktadır.^{91,94} İmmün sistemde apoptozisin en bilinen örneği sayılan yenidoğan timusunun involüsyonu sonucunda T lenfositlerinin yaklaşık %98'i seçime uğramaktadır. B hücrelerinde ise apoptozun baskılandığı bilinmektedir. Bu olayın fizyolojik önemi, B lenfositlerinin duyarlı olduğu uyarılarla yeniden karşılaşması durumunda hazır bulunmasını sağlamaktadır.⁹⁵ Bunlara ek olarak, kemoterapi, radyoterapi, hipoksi, hipertermi gibi nekroz oluşturan zararlı ajanların yarattığı hücre hasarı; HIV, HCV gibi bazı viral hastalıklar veya immün reaksiyonlara yanıt olarak oluşan sitotoksik T lenfositleri ile oluşturulan hücre ölümü gibi patolojik olaylarda da apoptozis rol almaktadır.⁹⁴

Apoptozisin düzenlenmesinde oluşan hatalar nedeni ile dokularda çok fazla apoptoz görülmesi veya yetersiz apoptoz meydana gelmesiyle nörodejeneratif hastalık, iskemik hasar, bağışıklık sistemi bozuklukları veya kanser oluşumu gibi birçok hastalık görülebilmektedir.⁹⁶ (Tablo 2).

Apoptozisin artmasıyla ilgili hastalıklar	Apoptozisin azalmasıyla ilgili hastalıklar
1. Nörodejeneratif bozukluklar Alzheimer hastalığı Amiyotrofik lateral skleroz Creutzfeld-Jakob hastalığı Huntington hastalığı Parkinson hastalığı Retinitis pigmentosa Spinal muskular atrofi 2. Hematolojik bozukluklar Aplastik anemi Fanconi anemisi Hodgkin hastalığı Myelodisplastik sendromlar Polycythemia vera 3. Otoimmün bozukluklar Fulminant hepatit Graft-versus-host hastalığı Hashimoto tiroiditis İnsüline bağımlı diyabet Multipli skleroz Romatoid artrit Skleroderma Sjögren sendromu 4. İskemik yaralanma İskemi ve reperfüzyon Böbrek enfarktüsü Miyokardial enfarktüs İnme 5. Toksinlere bağlı hastalıklar Alkole bağlı hepatit Pulmonar fibrozis Sepsis 6. Bakteriyal ve viral enfeksiyon AIDS Ebola virüsü Chlamydia trachomatis Helicobacter pylori Neisseria meningitis Salmonella typhimurium Shigella flexneri 7. Diğer Travmatik spinal kord yaralanması Tümör karşı-atağı (immün ayrıcalık)	1. Kanser Blastom Karsinom Lösemi Lenfoma Malign gliom Sarkom Seminom 2. Premalign hastalıklar Ataxia telangiectasia Proksimal nocturnal hemoglobinüri Myelodisplastik sendromlar Xeroderma pigmentosum 3. Otoimmün bozukluklar Sistemik lupus erythematosus Otoimmün lemfoproliferatif sendrom (Tip I ve II) 4. Ateroskleroz 5. Metabolik bozukluklar Niemann-Pick hastalığı Osteoporozis Wilson hastalığı 6. Viral enfeksiyonlar Adenoviruses Baculoviruses Epstein-Barr Virus Herpesviruses Poxviruses Prematür ve fizyolojik yaşlanmada apoptozis Down sendromu Erken yaşlanma Xeroderma pigmentosum

Tablo 2. Hastalıklarda apoptozisin rolü⁹⁵

2.7.2. Apoptozis Morfolojisi

Apoptotik hücreler tipik morfolojik değişimler ile çevre hücrelerden ve diğer hücre ölüm tiplerinden ayırt edilebilmektedirler. Ölüm uyarısını alarak apoptotik hücre ölümü sürecine giren hücreler ilk önce yüzey adezyon kaybı ile komşu hücrelerden ayrılır ve hücre şekli yuvarlaklaşır. Ayrıca hücre hacminde azalma ve sitoplazma yoğunluğunda artış olur. Çekirdekta ise endonükleaz enzimlerinin aktive olması ile DNA 180-200 baz çifti uzunluğunda kırılmaya başlar ve çekirdek kromatini dağılır. Çekirdek kromatini, çekirdek zarındaki porları kapatacak şekilde çekirdek zarının altında yoğunlaşır.⁹⁷ Bu yoğunlaşmadan dolayı çekirdek zarı bölünerek parçalara ayrılır. Sitoplazmik proteinlerin yoğunlaşması ve hacim azalmasına bağlı olarak hücrede büzülme görülür. Bu büzülmenin de plazma zarında bulunan iyon kanalları ve iyon pompalarının aktivasyonunun bozulmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.⁹⁸ Dolayısıyla apoptotik hücrelerde büzülme gözleendiği için normal hücrelere göre daha küçük gözlenirler. Daha sonra hücre zarında kabarıklıklar ve kıvrımlar oluşur; bu yapı “zeiozis” olarak tanımlanır. ER, genişler ve hücre zarı ile birleşerek yüzeye yakın kraterler oluştururlar. Bu evrelerde mitokondrilerin yapısında önemli bir değişiklik gözlenmez.⁹⁷ Plazma membranında kabarcık şeklinde yapıların oluşması ile hücre, sitoplazma, organel ve çekirdek parçaları içeren membranla çevrili ‘apoptotik cisim’ olarak adlandırılan parçalara ayrılır. Apoptozda, apoptotik cisimciklerin oluşumuna kadar tüm hücreyel yapılar hücre zarı yapısı bozulmadan yıkıma uğramaktadırlar.^{98,99}

İki katlı lipit tabakada fosfolipit asimetrisi hücre zarının önemli bir özelliğidir. Fosfolipitler, yani dış tabakadaki fosfatidilkolin (PC) ve iç tabakadaki fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin (PE) hücre zarında

asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile korunmaktadır. Apoptozis sırasında ya ATP translokaz yetmezliği olur ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu PS'nin dış tabakaya yerleşmesi ile sonuçlanır. Bu durum, apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır.¹⁰⁰ Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmadan makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosit edilirler. Apoptozis 30-60 dakika gibi bir sürede tamamlanır.^{98,101}

2.7.3. Apoptozis ve Nekrozis Farkı

Apoptozis, nekrozdan farklı bir hücre ölüm sürecidir. Apoptozis, kontrollü, enerji bağımlı bir süreçtir ayrıca hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Aksine nekrozis ise kontrolsüz, pasif bir süreçtir.⁹⁶ Nekrozis, sadece patolojik bir olaydır.

Nekrozun klasik nedenleri içinde hipertermi, oksidatif fosforilasyon, otolizis, hipoksi ve çeşitli toksinler yer alır. Apoptozis etkisini tek tek hücreler üzerinde gösterirken, nekrozis ise hücre grubunu etkiler. Nekrozda apoptozdan farklı olarak hücre büzüşmesi yerine şişme olur, bu nekrozun erken belirtisidir.¹⁰² Nekrotik hücre ölümünde, enerji depolarında ani azalma ile birlikte hücre zarının geçirgenliği bozulur ve sodyum ile suyun hücre içine girmesine neden olur. Böylece hücre şişer. Hücreyle birlikte mitokondrionlarda da şişme gözlenir, diğer organeller ise plazma içine dağılır. Bu şişme ile hücre patlar ve proteolitik enzimleri içeren plazma, hücreler arası boşluğa sızar. Bu şekilde doku çevresinde inflamasyon oluşturur. Apoptoziste ise hücre zarı hasar görmediğinden inflamasyon oluşmaz. Apoptoz ile ölen hücrenin artıkları veya cisimcikler

komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından hızlıca fagosite edilir.
103,104,108

Apoptozisin en özgün yönü, DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde ayrılmasıdır. Bu durum ultraviyole ışık altında agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü şeklinin (ladder pattern) ortaya çıkmasına neden olur. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru yerleşmesidir. Bu mekanizma hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar.^{105,106}

2.7.4. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin genel mekanizması ilk kez küçük bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın yaşam süreci ve genetik yapısının incelenmesi ile ortaya konulmuştur. Bu nematodun embriyo gelişim sürecinde 1090 somatik hücreden 131 hücrenin ölüme programlandığı saptanmıştır. Programlanmış hücre ölümünün gerçekleşmesinde bu nematoda özel gen grubu tanımlanmıştır. Bu gen grubundan olan Ced-3 ve Ced-4 apoptozu başlatan en önemli uyaranlardır.¹⁰⁹ *Caenorhabditis elegans* modeliyle yapılan organ gelişimi ve apoptozis çalışmaları 2002 yılında Sydney Brenner, Robert Horwitz ve John Sulston'a Nobel Tıp/Fizyoloji Ödülü'nü kazandırmıştır. Bu nematod, daha sonraki apoptozis ile ilgili bir çok çalışmanın da modeli olmuştur.

Hücrenin apoptozise gidebilmesi için, genetik mekanizmayı harekete geçirecek olan hücre içi veya hücre dışından gelen sinyaller gereklidir.

Hücre dışından kaynaklanan sinyaller:

1. Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği: Hücreler komşu hücrelerden ve ekstraselüler matriksten gelen yaşam sinyallerine ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptozise giderler.

2. Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu: Bazı sitokinler hücre zarındaki reseptörlere bağlanarak ölüm programını aktive eden sinyaller üretebilirler. Apoptoziste rol alan en önemli membran reseptörleri “Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR)” ailesidir. TNFR içinde apoptozis oluşturan en önemlileri Fas ve TNFR1’dir. Bu reseptörlerin uyarılması ile apoptozis başlar.

3. Hücrenin maruz kaldığı dış etkenler: Hipoksi, radyasyon, kemoterapi, ısı ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptozise neden olabilirler.¹¹⁰

Hücre içinden kaynaklanan sinyaller: DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH’da düşme, metabolik bozuklukları hücre içinden kaynaklanan sinyaller olarak sayılabilir.

2.7.5. Apoptozis Düzenleyicileri

Apoptozisi düzenleyen genler p53, bcl-2 ve c-myc olarak bilinmektedir. Bu genlerin ürettikleri proteinler de aynı adı alırlar. p53, bcl-2 ailesi, apoptozis baskılayıcı faktör (IAF), kaspazlar gibi protein aileleri de apoptozis düzenleyicileridir. Bu düzenlenme apoptozisi baskılayıcı (anti-apoptotik) veya indükleyici (pro-apoptotik) yolla olabilir.¹¹¹

p53

p53 protein ürünü, DNA zarar gördüğünde doğrudan DNA'ya bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra DNA tamir proteinlerini harekete geçirir. Hücre döngüsünü G1'de durdurarak S fazına geçmesine engel olur, bu şekilde hücreye tamir için gerekli zamanı kazandırır veya DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyük ise apoptozisi başlatır. p53, bcl-2 ailesinin proteinlerinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.^{100,112}

Bcl-2

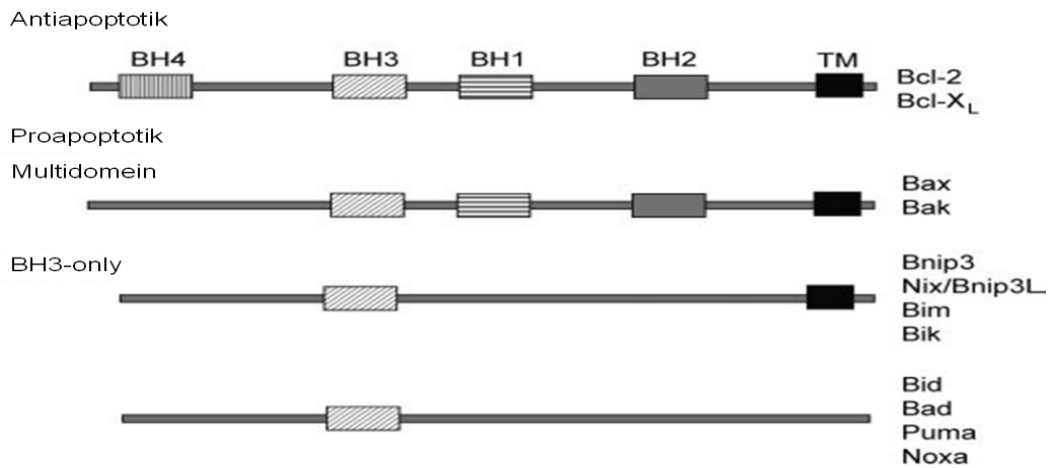
Lymphoma-leukemia 2 geninin kısaltılmış adı olan Bcl-2 geni ilk olarak insan foliküler B lenfomalarda kromozomal kırılma noktalarında keşfedilmiştir. Mitokondri dış zarında, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında bulunur.¹¹³

Bcl-2 ailesi proteinlerinin sınıflandırılması Bcl-2 homoloji bölgesi (BH1, BH2, BH3, BH4) ile yapılmaya başlanmıştır. Bcl-2 gen ailesinin 20'den fazla üyesi tanımlanmıştır. Bu aile yapısal ve işlevsel özelliklerine göre anti-apoptotik ve pro-apoptotik olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG gibi bazıları apoptozis inhibitörleri (anti-apoptotik) iken; Bcl-10, Bax (Bcl-2 associated X protein), Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk ise apoptozis tetikleyicileridir (pro-apoptotik).¹⁰⁷

Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri sitoplazmada bulunurlar ve apoptotik uyarı alınması ile mitokondri membranına bağlanırlar. Burada por oluşumunu tetikleyerek, seçici iyon geçirgenliğini bozar. Bu sebepten sitokrom c ve AIF (apoptozis indükleyici faktör)'nin mitokondriden sitoplazmaya çıkmasını sağlayarak apoptozisi indükler. Anti-apoptotik Bcl-2 ailesi ise, pek çok proteinin sitozolden intrasellüler membrana dağılımını düzenleyen adaptör bir protein olarak etki gösterir. Bu şekilde kaspazların aktivasyonuna yardım eden sitokrom c ve AIF'nin mitokondriden çıkışını engelleyerek apoptozisi inhibe eder. Hücrenin hayatta kalması, pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin oranına bağlıdır. Dolayısıyla oranın değişmesi ile ya apoptozun inhibisyonu ya da apoptozun aktivasyonu olaylanır.¹¹⁵ Bcl-2'nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği bulunmuştur. Yani reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol etmektedir.^{101,106}

Homoloji bölgelerinden olan BH1, BH2 ve BH4 anti-apoptotik proteinlerin ölümü baskılayıcı özellikleri için gerekli iken; BH3 bölgesi, pro-apoptotik moleküllerin apoptozisi indükleyici özelliği için gerekli

olmaktadır.^{88,104} Proapoptotik üyeler, yapısal olarak iki aileye ayrılırlar. Birincisi, BH4 bölgesi içermeyen, 3 BH bölgesini paylaşan multidomein proteinler (Bax ve Bak). İkincisi ise, sadece BH3 bölgesi içeren BH3-only proteinlerdir (Bik, Bad, Bid, Puma). Sadece BH3 bölgesi içeren proteinler, ölüm sinyallerinin sitoplazmadan mitokondriye iletilmesinde anahtar rol oynamaktadırlar. Ekspresyon düzeyleri farklı olan bu proteinleri proapoptotik aktiviteleri ve ölüm sinyallerine verdikleri cevaplar seçicidir. Örneğin; Noxa ve Puma, p53 aracılı kontrol altındadır ve DNA hasarına cevap olarak düzenlenir. Normal durumlarda Bad fosforile haldedir. Bad fosforile halde iken antiapoptotik üyelerle kompleks oluşturamaz ve onları inaktif hale getiremez. Bad, büyüme faktörlerinin azalması ile defosforile olarak aktifleştğinde, antiapoptotik üyelerle etkileşime girer ve antiapoptotik etkilerini ortadan kaldırır. Bu şekilde sitokrom c salınarak apoptoz tetiklenir. Mikrotübül işlevlerinin bozulması Bim salınmasıyla sonuçlanır ve apoptozis tetiklenir. Bid'in, kaspaz-8, granzim B ve kalpain tarafından proteolitik yıkımıyla tBid'e dönüşmesi, mitokondriye taşınması ve proapoptotik faktörlerin salınımı sonucunda apoptozis aktifleşmiş olur.



Şekil 4. Antiapoptotik ve proapoptotik proteinlerde Bcl-2 homoloji bölgeleri¹¹⁴

Apoptozda mitokondriyal yolun aktivasyonu, anti-apoptotik proteinlerle (özellikle bcl-2) baskılanmakta ve pro-apoptotik proteinlerle (özellikle bax) teşvik edilmektedir. Pro-apoptotik bax ve bak mitokondriyal apoptozun uyarılmasından sorumludur. Bu pro-apoptotik proteinlerin nasıl aktive edildiğiyle ilgili iki model ortaya koyulmuştur. İlk modelde, yalnız BH3 bölgelerine sahip proteinler doğrudan bax ve bak'ı etkilemekte ve mitokondriyal süreçleri başlatmaktadır. Diğer modelde ise, yalnız BH3 bölgelerine sahip proteinler anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerine bağlanmakta ve işlevlerini bax/bak ile oligomerizasyonu için bax/bak benzeri moleküllere çevirerek apoptozu teşvik etmektedir. Apoptozisin baskılanması sürecinde ise, Bcl-2 ailesi proteinlerin anti-apoptotik üyeleri pro-apoptotik üyelerin BH3 bölgesine bağlanarak bax/bak oligomerizasyonunu engellemekte ve apoptotik süreci baskılamaktadır.¹⁰⁷

C-myc

Bir protoonkojen olan c-myc geni, hücre proliferasyonunu ve ya apoptozisi uyarabilmektedir. Büyüme faktörlerinin varlığında c-myc protein seviyesindeki artış hücre çoğalmasına neden olmaktadır. Büyüme faktörlerinin yokluğunda ise c-myc ekspresyonu apoptozisi tetiklemektedir.¹¹⁶

AIF (Apoptozis Baskılayıcı Faktör)

Anti-apoptotik protein ailesindendir. IAF ailesi proteinleri hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu ve hücre döngüsünün kontrolünde yer alarak apoptozu

inhibe ettiği bilinmektedir. Bunlar prokaspazlara ve aktif kaspazlara (kaspaz 3,7,9) bağlanarak ölümü inhibe ederler. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı olarak gözlenirler.^{96,100}

Kaspazlar

Apoptotik ölüm programının merkezi bileşeni olan kaspazlar aktif kısımlarında sistein bulundurduklarından dolayı “sistein protezlar” olarak adlandırılırlar. Hedef substratının aspartik asit bölgelerindeki karboksil gruplarındaki peptit bağlarını kesen nükleofilik bir bölgeye sahiptirler. Bu nedenle c-aspartat adını almışlardır. Kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle hücrede lizis olmadan apoptotik cisimcikler meydana gelir ve bu şekilde apoptotik morfolojisinin oluşumu gözlenir.¹⁰⁰

Kaspazlar, hücrede zimogen (inaktif) pro-enzimler olarak sentezlenirler. Tam olarak işlevlerini gösterebilmeleri için proteolitik olarak kesime uğramaları gerekmektedir. İç bölgelerindeki aspartik asit bölgeleri ile kendi kendilerine aktive olmalarının yanı sıra diğer kaspazlar tarafından da aktive edilmektedirler. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar.¹⁰⁴

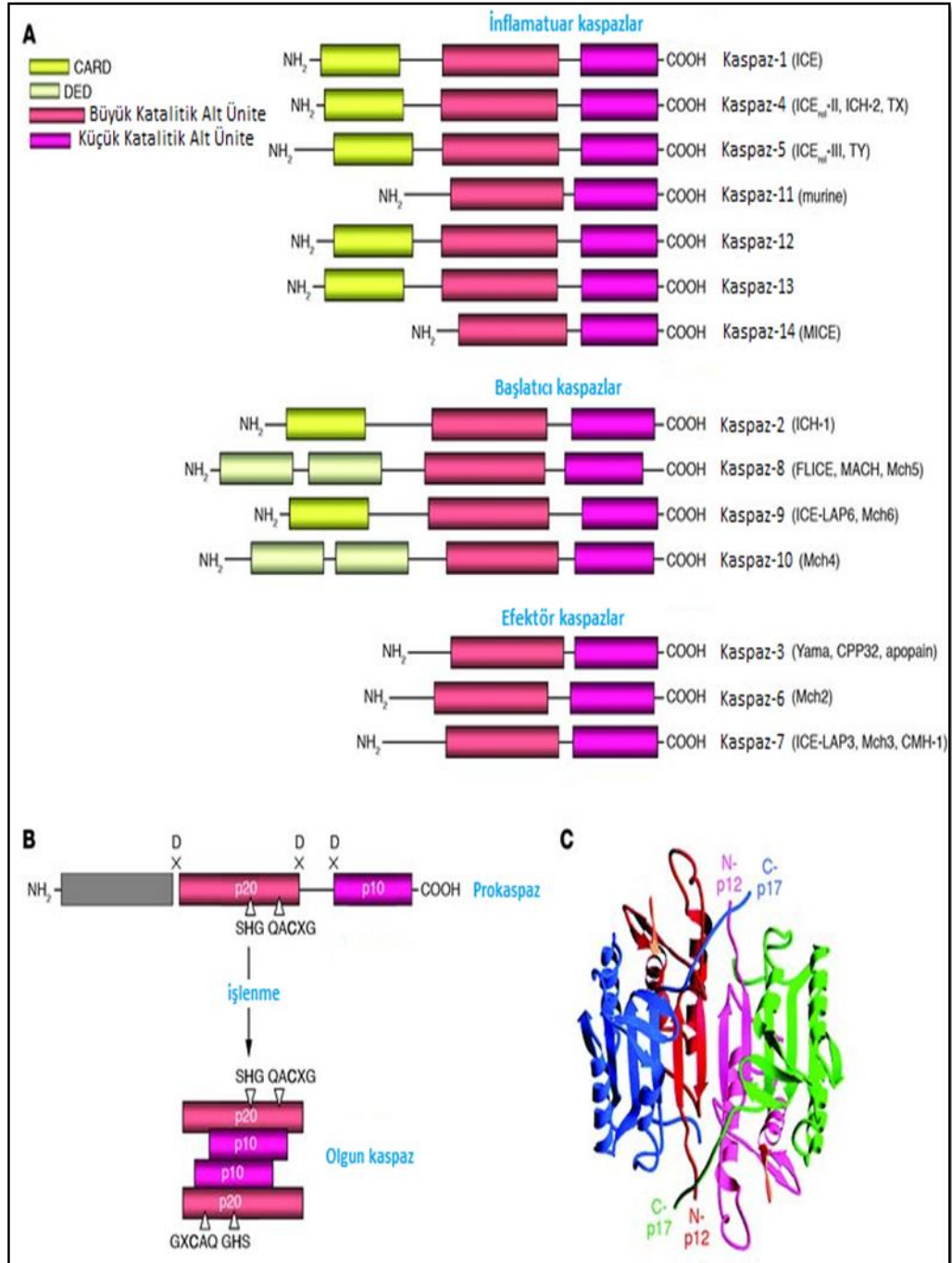
Günümüze kadar 14 kaspaz tanımlanmıştır ve iki temel gruba ayrılmaktadırlar. İlki apoptozisteki merkezi görevi üstlenen uzun öncül bölgeleri içeren başlatıcı kaspazlar (kaspaz 2, 8, 9, 10); diğer ise kısa öncül bölgeleri içeren efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) olarak isimlendirilir. Bu grupların dışında kalan kaspazlar (kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) ise inflamatuvar kaspazlar olarak bilinirler ve sitokinleri

aktifleştirerek savunma sisteminde görev alırlar.¹¹⁷ Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, infazı gerçekleştirecek olan efektör kaspazları aktive ederler.¹⁰¹ Kaspazlarda aspartik kesim yerinin N terminalinde dört aminoasitlik bir motif vardır. Her bir kaspaz için bu motif optimum kesim bölgesidir. Bu motifin görevi, kaspazın hedef proteininin seçimini belirlemektir. Başlatıcı kaspazlar, yeterli miktarda efektör kaspazın aktifleşmesini sağlayarak alınan apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlarlar.¹¹⁸

Tüm prokaspazlar yüksek oranda homolog proteaz bölgesi içerirler. Bu bölge de 20 kDa büyük alt ünite ve 10 kDa olan küçük alt ünite olmak üzere iki alt üniteden oluşmaktadır. Bazı prokaspazlarda bu alt birimler arasında 10 aminoasitlik bir bağlayıcı bölge bulunur. Büyük ve küçük alt üniteler birbirleri ile etkileşime girerek enzimin aktif merkezini oluştururlar. Ayrıca her prokaspaz çeşitli uzunluklarda NH₂-terminal peptid bölgesi içeren öncül bölgeye sahiptirler. Bu öncül bölgeler düzenleyici olarak görev alırlar. Başlatıcı kaspazların bu bölgeleri 100 aminoasitten daha uzundur ve uzun öncül bölge adını alır. Efektör kaspazlarda ise 30 aminoasitten daha kısa olan bu bölgeye kısa öncül bölge denir. CARD ve DED kaspazların öncül bölgelerinin özel motifleridirler ve protein-protein etkileşiminde rol oynarlar. Başlatıcı kaspazların kümelenmesi ve aktive olmaları için ölüm reseptörleriyle bağlantı kuran adaptör moleküller bulunur. Bu adaptörlerden olan DED kaspaz-8 ve kaspaz-10 etkileşiminde görev alırken; CARD ise kaspaz-9 ve Apaf-1 ile etkileşimde görev alır.^{118,119}

İnaktif durumdaki kaspazlar öncül bölgelerinden kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Bu kırılma büyük ve küçük alt ünitenin ayrılmasına neden olur. İki büyük ve iki küçük alt ünitenin bir araya

gelmesiyle heterotetramerik yapıda aktif kaspaz enzimi oluşur. Böylece her enzim iki tane aktif merkeze sahip olmuş olur.



Şekil 5. Kaspazların yapısı A. Kaspaz ailesi B. Prokaspazların aktivasyonu C. Kaspaz-3 heterotetramerinin üç boyutlu yapısı¹¹⁹

Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek bir kaspaz şelalesi oluştururlar. Başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazların bağlayıcı bölgesindeki diziyi hedef alırlar. Böylece başlatıcı kaspazlar, gelen apoptozis sinyalinı büyütmek için kaspaz zincirindeki diğer üyeleri aktive ederler ve sonunda inaktif haldeki efektör kaspazları da işleyip ve aktifleştirirler. Kaspaz şelalesindeki enzimler bir kez aktifleştikten sonra geriye dönüşleri yoktur ve hücreyi ölüme götürürler. Dolayısıyla hücredeki işlevleri sıkı bir biçimde kontrol altında tutulur.

Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu) ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu ya da mitokondriden salınan Sitokrom c'nin Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1)'i indüklemesi ve prokaspaz-9'a bağlanması ile gerçekleşir.^{118,120} Aktive olan kaspazlar efektör kaspazları aktive ederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar.¹⁰⁶

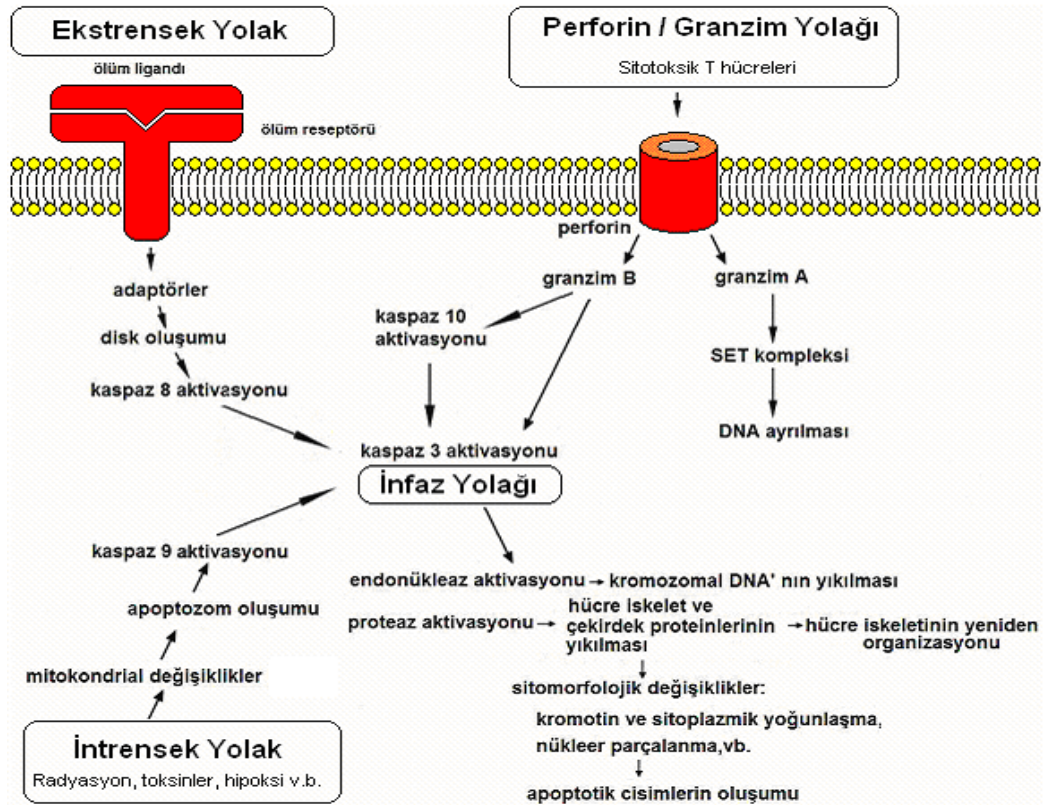
Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Bu durumda farklı dokularda farklı kaspazların aktivasyon yolu izlenebilir. Örneğin, periferik T hücreleri ultraviyole ile indüklenmiş apoptozise gitmek için ne kaspaz-3'e ne de kaspaz-9'a gerek vardır. Oysa embriyonik kök hücreler böyle bir durumda her iki kaspaza da ihtiyaç duyarlar.¹²¹

Apoptozis süresince kaspazlar çok fazla sayıda hücrede yapısal ve işlevsel proteini kesime uğratırlar. Bu proteinlerin yıkımı, hücrede yaşam yollarında bozulma ve hücre morfolojisinde değişiklikle ortaya çıkar. Kaspazlar; transkripsiyon faktörlerini, hücre döngüsü düzenleyici proteinleri, sinyal çevriminde görevli kinazları, sitoplazmik ve

nüklear proteinleri, protein katlanmasında görevli proteinleri, DNA tamir mekanizmasında ve DNA sentezinde rol alan proteinleri keserler.¹¹⁸ Apoptoziste DNA yoğunlaşır ve kaspazlarla kontrol edilen bir Dnaz kompleksi (CAD) ile parçalara ayrılır. CAD inhibitörü olan ICAD, kaspaz-3 ve kaspaz-7 tarafından kırılır. Bunun sonucunda CAD serbest kalarak nüklear DNA'yı yıkıma uğratır. Ayrıca kromatin yoğunlaşmasını uyaran bir faktör olan "acinus", kaspaz-3 ile aktive edilir. Bu şekilde DNA fragmentasyonu ve kromatin kondensasyonu ortaya çıkar. Kaspazlar hücre iskeletinde de önemli değişiklikler yaratmaktadırlar. Hücre iskeletinin proteinleri ve onların düzenleyicileri kaspazların hedefleridirler ve apoptozda morfolojik değişikliklerin gerçekleşmesini sağlarlar. Nükleus membranının yapısında da bulunan ara filamentlerden laminler kaspaz-6 tarafından kesime uğrarlar. Bu kesim sonucunda nükleusun parçalanması gözlenir. Kaspaz-3, sitoplazmik F-aktinin yapısını bozan proteini kırarak aktive eder, bu da membran tomurcuklanmasına neden olur.¹²² Hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinden olan siklinler, siklin bağımlı protein kinazlar (CDK) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) tarafından kontrol edilirler. Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri kaspaz-3 tarafından inaktifleştirilerek apoptoz süresince CDK aktivitesinin devamı sağlanır. Ayrıca hücre yüzey reseptörlerinin de kaspazlar tarafından kırılması, biyolojik aktivitelerinin değişmesine neden olmaktadır.^{106,118} DNA tamir proteinlerinden olan PARP [poly-(ADP-ribose) polymerase] apoptozda kaspaz-3 ile kırılır ve etkisizleştirilir. PARP'ın inaktifleşmesi ile tamir mekanizması da engellenmiş olur. Bu enzimlerin inaktivasyonu da apoptozisin geri dönüşümsüz olmasını sağlar.^{118,122}

2.7.6. Apoptozis Yolakları

Apoptoz mekanizması, enerji bağımlı moleküler olaylar şelalesini içeren karmaşık bir olaydır. Apoptoziste birbirini etkileyebilen, ekstrensek (ölüm reseptör aracılı) ve intrinsek (mitokondriyal) yolak olmak üzere iki ana yolak olduğu bilinmektedir. Sitotoksik T hücre aracılı sitotoksisiteyi ve perforin-granzim bağımlı hücre ölümünü içeren ek bir yolak da mevcuttur. Ekstrensek, intrinsek ve perforin/granzim yolakları aynı noktada yani infaz yolağında birleşirler (Şekil 6). İnfaz yolağı kaspaz-3 ayrımıyla başlatılır ve DNA parçalanması, hücre iskeletinin ve çekirdek proteinlerinin yıkılması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimciklerin oluşumu, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak da hücrenin fagositik hücreler tarafından fagositozu ile sonuçlanır.¹²³



Şekil 6. Apoptoziste yolaklar¹²⁹

2.7.6.1. Perforin/Granzim Yolağı

Perforin/granzim yolağı, patojenle infekte hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkilidir. Sitotoksik T lenfositler (CTL) ve doğal öldürücü hücrelerin (NK) sitoplazmik salgı granülleri içinde serin proteazlar olan granzim A ve granzim B vardır. Ayrıca bu salgı granülleri içinde hedef hücrede transmembran dairesel bir por oluşturan perforin proteini de bulunur.

CTL reseptörü, hedef hücreye bağlandığında hücreler arası boşluğa salınan sitoplazmik granüllerden olan granzim B, perforinlerin oluşturduğu porlardan reseptörleri aracılığı ile bir vezikül içinde hedef hücreye girer. Perforinler, hücre içine giren vezikülden granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Granzim B, hızlı bir şekilde proteinleri aspartat kalıntılarına ayırarak, DNA fragmentasyonunu gerçekleştirir ve prokaspaz-10'u aktive eder. Aktifleşen kaspaz-10 da kaspaz-3'ün aktivasyonuna yol açar. Bu şekilde infaz yolağı başlatılmış olur. Granzim A ise, perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız yolda apoptozda rol alır.⁹⁶

2.7.6.2. Ekstresek Yolak

Özellikle immün sistemin iç dengesini korumada önemli rollere sahip olan ekstresek yolak, apoptozisi transmembran reseptör aracılı etkileşimler ile başlatır. Ölüm reseptörleri tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesi üyeleridir.¹⁰⁴ Ölüm reseptörlerin hücre dışında sistinden zengin bağlanma bölgeleri (domain) bulunmaktadır. Sitoplazmik tarafta ise 80 aminoasitten oluşan "ölüm bağlantı bölgesi (death domain,

DD)” adı verilen bağlanma bölgeleri vardır. Bu ölüm bağlantı bölgesi ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içine iletmesinde önemli role sahiptir. Dolayısıyla bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlanarak apoptozisin başladığı yerlerdir.^{96,124}

En iyi tanımlanmış olan ölüm reseptörleri; DR1 (TNFR1, CD120a, p55, p60), DR2 (Fas, CD95, APO1), DR3 (APO3, LARD, TRAMP, WSL1), DR4 (tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz teşvik edici ligand reseptör 1-TRAILR1, APO2), DR5 (TRAILR2, KILLER, TRICK2), DR6, Ectodysplasin A reseptör (EDAR), sinir büyüme faktör reseptör (NGFR)’dür.^{119,124}

Apoptozisin ekstrensek yolağında meydana gelen olaylar dizisi en iyi FasL/FasR ve TNF-/TNFR1 modelleri ile tanımlanmıştır. Bu modellerde reseptör ve bunlara bağlanan ligandların etkileşimi ve sonrasındaki olaylar bir dizi halinde meydana gelir. TNF ve FasL reseptörlerine bağlanınca, ligand bağlanan reseptörlerde homotrimerik yapılar oluşur. Bu şekildeki değişiklikler reseptörlerin ölüm bölgeleri ile sitoplazmik ölüm bölgesiyle ilişkili proteinlerin etkileşimini hızlandırır. Fas ligandı Fas reseptörüne bağlandığında Fas reseptörünün ölüm bölgesi (DD) ile FADD (Fas-associated death domain) denen sitoplazmik adaptör protein etkileşime girer. Bu adaptör proteinlerin hem ölüm bölgeleri (DD) hem de proteazların ölüm oluşturan kısımlarına bağlanan bölgesi (DED) vardır. FADD, ölüm efektör bağlantı bölgesinin dimerizasyonu sonucunda prokaspaz-8 ile birleşir. Prokaspaz-8’ in otokatalitik aktivasyonu ile sonuçlanan ölüm başlatıcı sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Yani, prokaspaz-8 konsantrasyonunun DISC’teki artışı otokatalitik aktivasyonla aktif kaspaz-8 oluşumunu sağlamaktadır.^{96,125} Kaspaz-8 aktive edilince apoptozisin infaz yolağı tetiklenir. Aktif kaspaz-8 hücre sel substratların

kesiminden sorumlu olan kaspazların aktivasyonuna yol açar. Bu şekilde kaspaz kaskadı başlamış olur.^{88,104}

Ekstresek yolakta, c-FLIP adında bir protein FADD ve kaspaz-8'e bağlanarak onları inaktif hale getirebilir. Ayrıca TOSO adındaki protein de T hücrelerindeki kaspaz-8 sürecini inhibe ederek apoptozisi durdurabilir.

Fas reseptörü bir çok hücre tipinde ifade edilmektedir. Örneğin; lenfoid hücreler, hepatositler, bazı tümör hücreleri, akciğer ve miyokard hücreleride gözlenmektedir. Fas ligandı ise çok kısıtlı oranda ifade edilmektedir. Sitotoksik T hücrelerinde ve NK hücrelerinde de bu ölüm yolu kullanılmaktadır. Bu yol, immün yanıtta sonra aktifleşmiş olan T lenfositlerinin ortadan kaldırılmasında, virüsle enfekte olan hücrelerin öldürülmesinde, tümör hücrelerinin öldürülmesinde ve pek çok patolojik evredeki hücrelerin öldürülmesinde çok önemli rol oynar.¹¹⁸

TNF ligandının TNF reseptörüne (TNFR-1) bağlanması da benzer şekilde gerçekleşir. TNF ligandı reseptörüne bağlandığında TNF reseptörünün ölüm bölgesi ile TRADD (TNFR-1 associated death domain) denen sitoplazmik adaptör protein etkileşime girer. TNF, TNFR-1 ile bağlandıktan sonra apoptotik sinyal iki ayrı yolla olur. Birinci yolla TRADD, ölüm sinyalini kaspaz-8'e FADD üzerinden iletirken; ikinci yolla ise, TRADD, RIP (receptor interacting protein) denen farklı bir protein üzerinden ölüm sinyalini iletir. Her iki yolda da kaspaz-8'in aktive olması ile birlikte diğer proteinazlar kaskad halinde aktive olarak ölüm sinyalini nükleusa kadar iletirler ve sonunda da kromozomal DNA yıkımı ile hücre ölümü meydana gelmektedir. Bu sonuçlar, Fas ve TNFR'nin ölüm sinyalini

iletmede FADD'ı ortak bir yol olarak kullandığını göstermektedir. Ayrıca, TRADD'ın tek başına iletimi sağlayamadığı tespit edilmiştir. TRADD, FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanabilir. Bunun sonucu olarak da nükleer faktör-kB (NFkB) aktiveleşebilir. NF-Kb; transkripsiyon faktördür. Nükleusa proliferasyonu arttıran ve apoptozu baskılayan sinyaller gönderir. NFkB aktivasyonu, antiapoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinin ve IAP'ların ifadesini artırır.^{100,105,126}

Susturucu olarak bilinen SODD adlı protein, ölüm uyarısı almamış reseptörlerin sitoplazmik ölüm bölgelerinin uçlarını maskeleyerek reseptörlerin kendi kendilerine sinyal üretmeleri önler. Reseptörün uyarılmasıyla SODD, ölüm ucundan ayrılarak DED içeren adaptörün bağlanmasına izin verir.

Membrana bağlı TNF ve Fas ligandlarının metalloproteinaz enzimleriyle proteolizi sonucunda membrandan ayrılıp serbest hale geçen formları bulunmaktadır. Bu serbest formlarına solubl TNF ve solubl FasL adı verilmektedir. Solubl formda bulunan TNF ve FasL da apoptozisi aktive etmektedir. Membrana bağlı olan TNF ve FasL'ın, reseptörlerini aktive etmeleri solubl TNF ve FasL'a göre daha etkilidir.¹⁰⁵

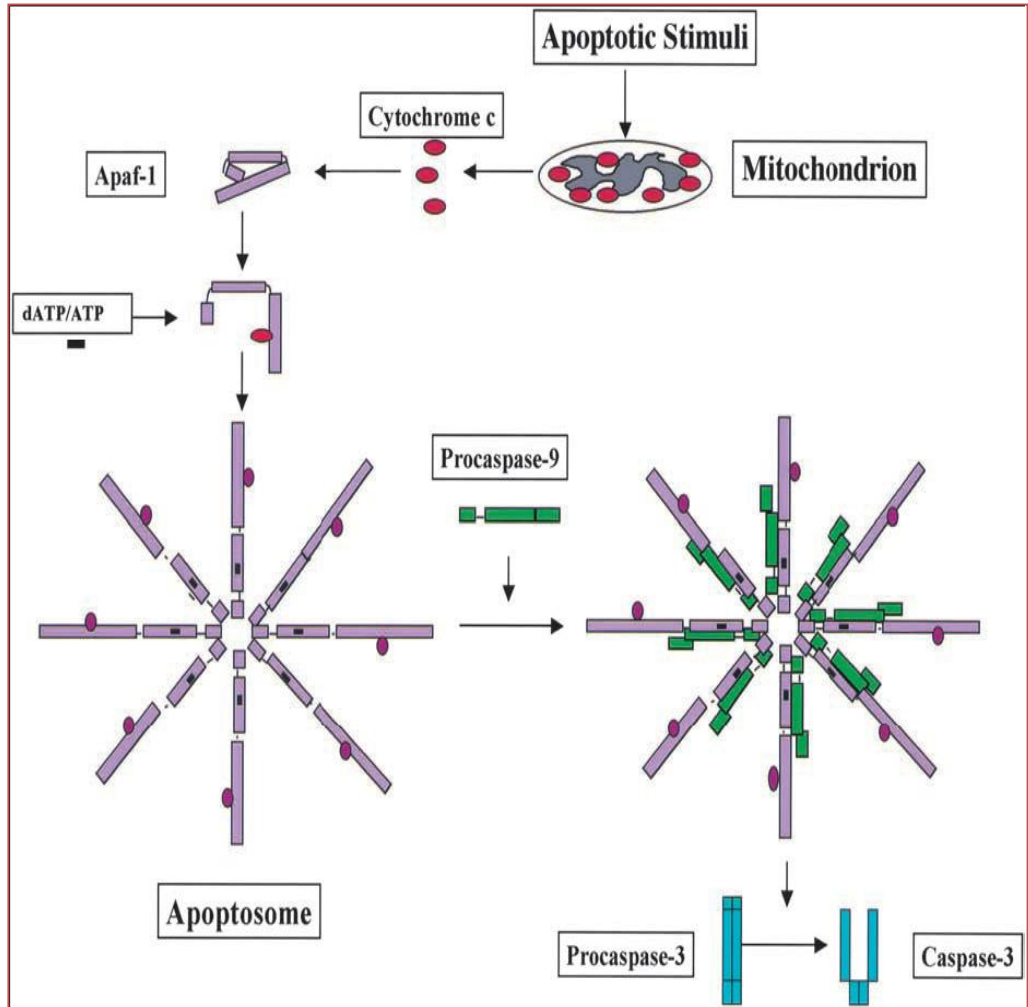
2.7.6.3. İntrensek Yolak

Mitokondriyal başlangıçlı olan intrinsek yolak, reseptörden bağımsız, doğrudan hücre içi hedeflere etkili sinyaller üreterek apoptozisi başlatır. Hücrede büyüme faktörlerinin, sitokinlerin veya hormonların eksikliği gibi negatif sinyaller bu yolağı başlatabilir. Ayrıca radyasyon,

toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar veya serbest radikaller gibi pozitif sinyaller de intrinsek yolağı aktiveleştirebilir.⁹⁶ Tüm bu sinyaller, çift zarlı organel olan mitokondriyon membranında değişikliğe ve işlev bozukluğuna yol açmaktadır. ATP sentezi durdurularak, NADH ve NADPH gibi redoks molekülleri okside olmakta ve reaktif oksijen radikallerinde artış olmaktadır. Artan reaktif oksijen radikalleri lipid, protein ve nükleik asitleri doğrudan etkilemektedir.¹⁰⁷ Bcl-2 ailesi üyeleri (özellikle Bax), apoptotik uyarı alması halinde mitokondriyon membranına tutunur. Burada küçük delikçikler oluşturur.¹⁰⁶ Mitokondriyon geçirgenlik porlarının açılması sonucunda transmembran potansiyeli kaybolur ve apoptozu uyaran birtakım proapoptotik proteinler membranlar arası alandan sitoplazmaya salınır. Salınan proapoptotik proteinlerin ilk grubu; sitokrom-c, Smac/DIABLO (Second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low PI) ve serin proteazı HtrA2/Omi (High-temperature requirement)'dir. Bu proteinler ile kaspaz bağımlı mitokondriyal yolak aktif hale getirilir.⁹⁶

Sitokrom c (Cyt-c), mitokondriyal elektron iletim sisteminin önemli bir parçasıdır. Normalde mitokondrinin iç ve dış membranları arasına yerleşiktir. Sitoplazmaya salınımı Bcl-2 proteinler tarafından düzenlenen ve kaspazların aktivasyonunda gerekli olan bir kofaktördür. Sitokrom c, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive edici faktör-1)'in aktivatörüdür. Apaf-1 uyarı olmadığı zamanlarda sitoplazmada monomerik halde bulunur. Sitokrom c sitoplazmaya girdiğinde, Apaf-1 oligomerize olup tekerleğe benzer bir şekil alır. Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması ile prokaspaz-9 aktive olur ve oluşan bu yapı "apoptozom" olarak isimlendirilir. Bu molekülün asıl oluşma nedeni prokaspaz-9'u aktive etmektir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, kaspaz kaskadını başlatır. Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay da apoptozun neden enerji gereksinimi duyduğunu açıklamaktadır.^{96,127}

Apoptozomda yer alan Apaf-1'in CARD bölgesi, prokaspaz-9'un CARD bölgesi ile etkileşime girer. Bu şekilde çok sayıda prokaspaz-9 molekülünün kümelenmesini sağlayarak otoaktivasyonlarına aracılık eder. İzole aktif kaspaz-9 enzimine kıyasla apoptozoma bağlı olan kaspaz-9'un üç kat daha fazla aktiviteye sahip olması, bu molekülün aktivitesinin apoptozom tarafından artırıldığının göstergesidir. Prokaspaz-9 kırılmadan da katalitik olarak aktiftir ve aktivitesi apoptozom tarafından kırılarak artırılır.¹¹⁸



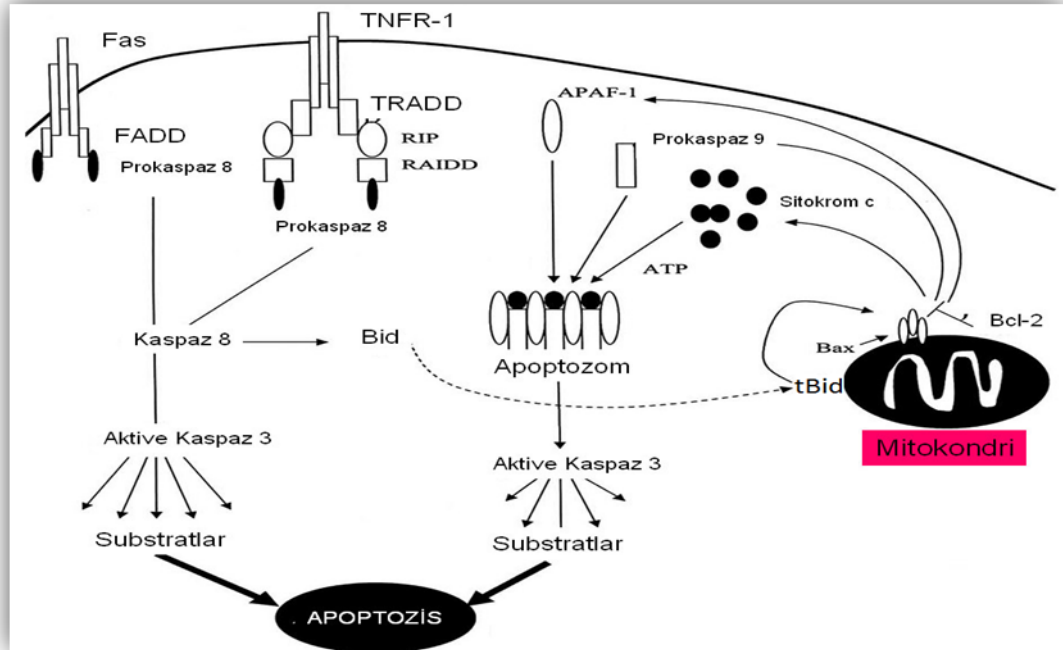
Şekil 7. Apoptozomun yapısı

Kaspaz-9 aktivitesi, IAP'ler tarafından baskılanır. Apoptozun tamamlanması için de IAP'nin inhibe edilmesi gereklidir. Bunun işlev, mitokondriyonun iki membranı arasında yerleşik olan Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi tarafından gerçekleştirilir. Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi sitokrom c ile eşzamanlı olarak sitoplamaya salındığında IAP ile etkileşime girerek aktivitelerini inhibe ettiği ve apoptozisi ilerlettiği gösterilmiştir.^{96,128}

Salınan proapoptotik proteinlerin ikinci grubu olan AIF, endonükleaz G ve CAD (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) apoptoz süresince mitokondriden sitoplazmaya salınır. Fakat bu olay hücre ölümüne teslim olduktan sonra gerçekleşir. AIF, DNA'nın yaklaşık 50-300 kb'lık parçalara ayrılmasına ve nükleus kromatinin yoğunlaşmasına neden olur.⁹⁶ AIF'nin bu işlevleri kaspaz inhibitörleri ile düzenlenmez, bu da AIF'nin apoptozda kaspaz bağımsız bir rolünün olduğunu gösterir. Bununla beraber sitozolik AIF, mitokondriyon membran depolarizasyonuna veya fosfatidilserin translokasyonu gibi hücre membranında değişikliklere neden olur. AIF'nin bu etkileri kaspazlar, Bcl-2 veya Apaf-1'den bağımsızdır.^{106,118} Endonükleaz G, nükleer kromatini ayırarak oligonükleozomal DNA parçaları meydana getirir. CAD ise hücrede inhibitörü (ICAD) ile birlikte kompleks halde bulunurlar. Bu yapı apoptotik hücrelerde aktif kaspaz-3 ile ayrılır. Mitokondriden salınan CAD, çekirdekte oligonükleozomal DNA parçalanmasına ve ilerlemiş kromatin yoğunlaşmasına neden olur.^{96,118}

Ölüm reseptörü bağımlı apoptotik yolak ile mitokondri bağımlı yolağın kesişimi Bcl-2 protein ailesi üyesi bid ile olmaktadır. Aktif kaspaz-8 bid proteininin C ucunu keserek tbid oluşumunu sağlamaktadır. tbid mitokondri dışı membranına bağlanmakta ve Bcl-2 protein ailesinin proapoptotik üyeleri olan Bax ve Bak ile etkileşerek sitokrom c ve diğer

proapoptotik faktörlerin mitokondriden sitoplazmaya salınımına neden olmaktadır.¹⁰⁴



Şekil 8. Apoptozis yolları¹¹⁴

2.7.6.4. İnfaz Yolağı

Ekstresek ve intrensek yolların ikisi de apoptozisin son basamağı olarak düşünülen infaz yolağında sonlanırlar. Bu yolak, efektör kaspazlar olarak bilinen kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu sonucu başlar. Efektör kaspazlar, proteazları aktive ederek nükleer ve sitoplazmik hücre iskelet proteinlerini parçalarlar. Dolayısıyla hücrede apoptozise ait morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere neden olurlar. Kaspaz-3'ün en önemli efektör kaspaz olduğu, özellikle endonükleaz ve CAD'ı aktive ettiği bilinmektedir. Ayrıca kaspaz-3, herhangi bir başlatıcı kaspazla (kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10) aktive olmaktadır. Takiben

CAD, çekirdekdeki kromozomal DNA'yı parçalar ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur.

Apoptozisin son aşaması, apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınması ve fagosite edilmesidir. Apoptotik hücrelerin tanınması plazma membranındaki değişikliklerle olmaktadır. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serinin apoptotik hücrelerde dış yüzeye çıkması inflamatuvar olmayan fagositik tanımayı kolaylaştırır. Hücrelerin erkenden ortadan kalkmasına olanak verir.¹²⁹

2.8. ANTİOKSİDANLAR

HücreSEL yaşamın devamlılığı karmaşık biyokimyasal tepkimelerin denge içinde yürütülmesine bağlıdır.¹³⁰ Vücudumuzda yağ, karbonhidrat ve aminoasitlerin yakıt olarak kullanılmaları için kimyasal bir işlem gerekir ve bunun için de oksijene ihtiyaç vardır. Vücut kullanacağı yakıttan hidrojen ve karbon atomlarını çıkartıp oksijen ekler. Daha sonra vücuttan karbondioksit ve su çıkar. Bu şekilde bir maddenin oksijen ile birleşirken bir elektron kaybetmesi olayına oksidasyon adı verilir.¹³¹

Antioksidanlar, oksidasyon sonucu ortaya çıkabilecek olan serbest radikallerin oluşumunu engelleyici, yavaşlatıcı veya azaltıcı özelliğe sahip moleküllerdir.¹³² Reaktif oksijen türleri, kimyasal zincir tepkimelerle hücrelerin hasarına, apoptozis ile ölümüne ya da DNA'nın yapısını bozarak hücrenin kanser hücresine dönüşmesine neden olurlar.

Bu nedenle tüm hücreler bu hasarlardan korunmak ya da azaltmak için antioksidan içerirler.

Aerobik organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlarına engel olmak için antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Serbest radikaller antioksidan savunma sistemleri ile dengede tutulurlar ve normal şartlar altında organizma kendini antioksidan mekanizmalarla korur. Fakat bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez. Böyle durumda yani, oksidan-antioksidan dengenin oksidan lehine bozulması durumunda “oksidatif stres” olarak tanımlanan bir durum ortaya çıkar.¹³³ Aşırı oluşan serbest radikaller membran lipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerine hasar vererek lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşuna neden olurlar. Hücre membranlarının bütünlüğünün kaybedilmesi hücre akışkanlığının bozulmasına, membran potansiyellerinin değişimine ve hücrenin parçalanarak organellerinin dağılmasına yol açar.^{134,135}

2.8.1. Serbest Radikaller

2.8.1.1 Serbest Radikallerin Etki Mekanizmaları

Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren, kararsız, düşük molekül ağırlığına sahip moleküllerdir. Bu tip moleküller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Serbest radikaller normal metabolik olaylar sırasında oluşabildikleri gibi çok çeşitli dış etkenlere bağlı olarak da oluşabilirler.¹³⁶

Serbest radikallerin katıldıkları tepkimeler enzimatik veya enzimatik olmayan tepkimelerdir. Enzimatik tepkimelere solunum zinciri, fagositoz, prostaglandin sentezi ve sitokrom P₄₅₀ sisteminin çalışması örnek gösterilebilirken; serbest radikallerin organik bileşiklere bakır veya demir katalizörlüğünde girdiği tepkimeler ise enzimatik olmayan serbest radikal tepkimelere örnektir.¹³⁷ Ayrıca serbest radikallerin kaynakları, endojen ve eksojen olmak üzere iki başlık altında toplanabilir. Hava kirliliği, kimyasallara etken kalma, radyasyon, sigara toksinleri ve bazı ilaç oksidanları eksojen kaynakları oluştururlar. Endojen kaynak olarak, mitokondriyal elektron taşıma sistemi, endoplazmik retikulum ve nükleer membranda elektron taşıma sistemi, peroksizomlar, oksidan enzimler, araşidonik asit yolu ve fagositik hücrelerdeki hasarlar örnek verilebilir.¹³⁸

Biyolojik sistemde en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Çünkü oksijen atomu iki eşlenmemiş elektron içerir. Oksijenin bu özelliği diğer serbest radikallerle kolayca tepkimeye girmesini sağlarken, radikal olmayan moleküllerle de daha yavaş tepkime vermesine neden olur. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında, metabolit olarak yüksek derecede reaktif ara ürünler açığa çıkar. Bu ürünlere “reaktif oksijen türleri (ROS)” denir. Oksijenin suya indirgenmesi sırasında oluşan zincir tepkimeleri bazı enzimler tarafından katalizlenir ve zararlı olan radikaller daha az zararlı hale getirilir. Oksijen atomu, orbitallerindeki elektronların farklı dizilimi ile süperoksit, peroksit ve singlet oksijen gibi radikallerin oluşumuna neden olur. Ayrıca serbest oksijen radikali oluşumunun temel maddeleri arasında oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalleri de yer almaktadır.¹³⁹

2.8.1.2. Serbest Radikal Türleri

Süperoksit radikali: Oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşan ilk ürün süperoksit radikalidir. Süperoksit radikalleri süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hızlı bir şekilde hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene çevirilir. Süperoksit radikallerinin en önemli zararları hidrojen peroksit kaynağı ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmalarıdır. Süperoksit'in NO (nitrik oksit) ile birleşmesi sonucu reaktif oksijen türevi olan peroksinitrit oluşur.

Hidrojen peroksit: Moleküler oksijenin ortamdan iki elektron alması veya süperoksitin bir elektron alması sonucu hidrojen peroksit meydana gelir. Asıl üretimi süperoksitin dismutasyonu ile olur. Bu tepkime kendiliğinden gelişebildiği gibi SOD enzimi tarafından da katalizlenebilir. H_2O_2 serbest bir radikal olmadığı halde ROS içine girer ve serbest radikaller içinde önemli bir rol oynar. Çünkü, Fe ve Cu gibi geçiş metalleri varlığında süperoksit ile reaksiyona girerek en reaktif ve en zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikalini oluşturmak üzere kolayca yıkılabilir. H_2O_2 , dokularda bulunan katalaz, peroksidaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisizleştirilir. Hidrojen peroksit mitokondriyal membranlar, peroksizomal membranlar ve plazma membranından difüzyon ile kolayca geçip birçok yapıyı okside edebilir. Uzun ömürlü bir oksidan olarak mutajen ve karsinojen etki gösterir.

Hidroksil radikali: Oksijen radikalleri içinde en reaktif ve en toksik olan radikaldir. Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Suyun yüksek

enerjili iyonize radyasyona etken kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Yarılanma ömrü çok kısa olmasına rağmen, oluştuğu yerde büyük hasarlara neden olur. En iyi tanımlanmış biyolojik hasarı lipid peroksidasyonunu uyarmasıdır.

Singlet oksijen: Ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal tepkimelerin sonucunda meydana geldiği gibi serbest radikal tepkimelerinin başlamasına da neden olur. Membran lipid peroksidasyonunda etkisi olan singlet oksijen mutajeniktir.

Nitrik oksit: Kararlı, serbest bir radikaldir. Nitrik oksitin hücrel düzeyde koruyucu etkileri vardır. Ancak oksidatif stres altında süperoksit radikali ile tepkimeye girerek oluşturduğu peroksinitrit çok güçlü bir oksidandır.¹³⁹

2.8.1.3. Serbest Radikallerin Organizmaya Etkileri

Lipidler üzerine etkileri (Lipid peroksidasyonu)

Biyolojik moleküller içerisinde serbest radikallere en hassas olan ve onlardan en çok etkilenen lipidlerdir. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle tepkimeye girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve yeni radikaller üreterek zincir tepkimelere neden olduğu için oldukça zararlıdır. Çoklu çift bağ içeren yağ

asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA), son ürün olarak meydana gelir. MDA miktarının ölçümü, lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır.^{140,141}

Lipid peroksidasyonunun; hücre zarının lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar geçirgenliğinin ve akışkanlığının bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenleri üzerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri gibi farklı yollarla hücre hasarına neden olduğu bilinmektedir. Aldehit yapıları bileşiklerin uzun ömürlü ve zarları geçebilme özelliğinde olması, lipid peroksidasyonunun hedef organlardaki etkilerinden bu bileşiklerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir.¹³⁸

Proteinler üzerine etkileri

Proteinler de serbest radikallerin hedefidir. Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme dereceleri aminoasit dizilimine bağlıdır. Doymamış bağ ve –SH grubu içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenil alanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden daha çabuk etkilenirler. Serbest radikallerin hasarı sonucu proteinlerde fragmentasyon, çapraz bağlanmalar ve proteinlerin kümeleşmesi meydana gelebilir. Birçok biyokimyasal yapının ve özellikle enzimlerin yapısında bulunan proteinlerin hasar görmesi sonucu hücrenin normal işlevlerinde bozukluklar ve enzim aktivitelerinde aksaklıklar meydana gelir.¹⁴²

Karbonhidratlar üzerine etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucunda peroksitler, hidrojen peroksit, glioksal ve okzoaldehitler meydana gelirler. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanarak antimitotik etki gösterirler. Bu şekilde kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar.¹⁴²

DNA ve Nükleik asitler üzerine etkileri

Serbest radikallerin DNA üzerine yaptıkları hasar önemlidir. DNA'nın nükleotidleri ile tepkimeye giren serbest radikaller DNA dizisi üzerinde çatlaklara, baz çifti değişimlerine ve yeniden düzenlenme gibi yapısal bozukluklar meydana getirebilir. DNA yapısında oksidatif hasara sebep olan pek çok faktör vardır. İyonize radyasyon, artmış oksijen konsantrasyonu ve çeşitli kimyasallar aşırı radikal oluşumuna neden olarak direkt hasara yol açarlar. Bazı serbest radikaller de DNA tamir enzimlerini etkileyerek hasara yol açarlar. Oksidatif stres sonucu hücre içi kalsiyum seviyesinin artışı, endonükleazı aktive ederek DNA fragmentasyonuna sebep olabilir.

2.8.1.4. Serbest Radikallerin Neden Olduğu Hastalıklar

Serbest radikaller birçok patolojik olaylarda rol oynamaktadırlar. Kanser, iltihabi hastalıklar, otoimmün hastalıklar, radyasyon hasarı, göz rahatsızlıkları, yaşlanma, Alzheimer hastalığı, ateroskleroz, iskemi, down sendromu, diyabet, astım ve birçok kimyasal

maddenin toksisite göstermesinde serbest radikallerin etkili olabileceği gösterilmiştir.¹⁴⁴

Çok sayıda genin aktivitesi redoks tepkimeleri ile kontrol edilir. Serbest radikaller de redoks tepkimelerini başlattıklarından dolayı oksidatif stres bazı genlerin aktive olmasına neden olur. Böylece, serbest radikaller onkogenleri aktive ederek hücre çoğalmasını artırırlar. Tümör durdurma genlerinin serbest radikaller tarafından inaktif hale getirilmesi kanserin başlamasına neden olabilmektedir. Ayrıca oksidatif stresi artırarak kansere sebep olan kanserojen maddeler antioksidan savunma sistemindeki SOD, GSH-Px ve CAT gibi enzimlerin aktivitelerinde ani ve sürekli bir azalmaya sebep olurlar.¹⁴²

2.8.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için organizmada birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler.¹⁴³

Antioksidanların başlıca etkileri

Toplayıcı etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni moleküle çevirme işlemidir. Antioksidan enzimler bu tip bir etki gösterirler.

Baskılayıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen iyonu vererek, bu radikalleri kendilerine bağlayarak inaktif hale çevirir ya da onları daha zayıf bir moleküle çevirerek baskılama yoluyla engeller. Vitaminler bu tarz etkiye sahiptir.

Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak reaksiyon zincirini kırıp işlevlerini engellenmesidir. Hemoglobin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

Onarıcı etki: Hedef moleküllerin hasar sonrası onarımını ya da temizlenmesini kapsayan etkidir.

2.8.3. Antioksidanların sınıflandırılması

Doğadaki antioksidanlar çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir:

2.8.3.1. Kaynaklarına göre;

- Endojen: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, bilirubin, ürik asit, sistein, histidin, albümin, safra asitleri
- Eksojen: Ksantin oksidaz inhibitörleri, NADPH oksidaz inhibitörleri, DMSO, lokal anestezikler, rekombinant süperoksit dismutaz

2.8.3.2. Çözünürlüklerine göre;

- Suda çözünenler: Glutatyon, C vitamini, ürik asit
- Yağda çözünenler: A vitamini, E vitamini, ubikinonlar

2.8.3.3. Yerleşimlerine göre;

- Hücre içinde bulunanlar
- Plazma ve diğer ekstrasellüler sıvıda bulunanlar

2.8.3.4. Yapılarına göre;

- Enzimatik: Sitokrom oksidaz, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon S transferaz, hidroperoksidaz
- Enzimatik olmayan: Glutatyon, askorbik asit, E vitamini, A vitamini, keratinoidler, ubikinonlar, flavanoidler, melatonin, ürik asit, albümin

Antioksidanlar, reaktif bileşiklerin indirgenmesini sağlayarak, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve reaktif oksijen türlerini toplayıp, metal iyonlarını inaktive ederek lipid peroksidasyonunu özel enzim aktiviteleriyle inhibe edebilirler. Ayrıca, radikal ve toksinlerle direkt tepkime vererek enzimatik olmayan şekilde de etkili olabilirler.¹⁴⁴

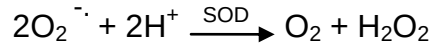
2.8.3.4.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz, methemoglobin redüktaz ve glutatyon S transferaz insanda doğal olarak bulunan önemli antioksidanlardır. Oksijenin hidrojen perokside dismutasyonunu SOD, hidrojen peroksidin dismutasyonunu ise katalaz katalizlemektedir. Glutatyon peroksidaz ise hidrojen peroksit ve lipid peroksidlerini indirgemektedir. Yükseltgenmiş glutatyonun (GSSG), indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü sağlayan glutatyon redüktaz, indirekt yolla antioksidan etki göstermektedir. Enzimatik savunma

sistemleri arasında NADH peroksidaz ile sitokrom c oksidaz da yer almaktadır.

Süperoksit dismutaz (SOD)

İlk kez 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmış olan süperoksit dismutaz enzimi; süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.¹⁴⁵ SOD, hücrede süperoksit düzeylerini kontrol eder. Ayrıca, direkt oksidatif hasara karşı hücreleri korumada anahtar role sahiptir.



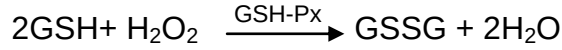
SOD, süperoksit radikaline karşı devreye giren ilk savunma sistemidir. Süperoksitin dismutasyonu ile oluşan H_2O_2 , katalaz veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri tarafından O_2 ve H_2O 'ya indirgenmektedir. SOD aktivitesindeki herhangi bir artış, diğer enzimlerin aktivitesinde de artışı gerektirir. SOD artışı ile GSH-Px arasındaki dengesizlik hücrelerde oksidatif strese işaretler. Yani SOD/GSH-Px oranındaki artış oksidatif hasarı ve patolojik olayları başlatabilir.¹⁴⁶

Süperoksit dismutaz enziminin insanda iki tipi bulunmaktadır. Bunlar sitoplazmada bulunan bakır-çinko (Cu-Zn) içeren SOD ve mitokondride bulunan mangan (Mn) içeren SOD'dir. Mn-SOD, tümör nekrozis faktör ve interleukin-1 tarafından uyarılmaktadır. SOD'nin fizyolojik işlevi, oksijeni metabolize eden hücreleri serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumak ve böylece lipid peroksidasyonunun başlamasını

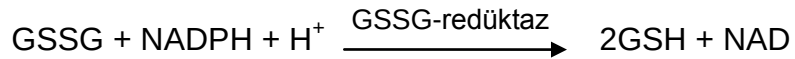
engellemektir. Oksijen kullanımı yüksek dokularda SOD aktivitesi fazladır. Ekstraselüler sıvılarda ise SOD aktivitesi çok düşüktür.¹⁴⁴

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz, hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin uzaklaştırılmasından sorumludur. Yapısında 4 selenyum atomu içeren sitozolik bir enzimdir.¹⁴² Glutasyon peroksidaz enziminin substratı tiyol bileşiği olan glutatyondur (GSH). Hidroperoksitlerin redükte olması ile meydana gelen okside glutasyon (GSSG), glutasyon redüktaz (GR)'ın katalizlediği reaksiyon ile tekrar glutasyon (GSH)'a dönüşür. Bu arada H₂O₂ de suya dönüştürülerek detoksifiye edilmiş olur.



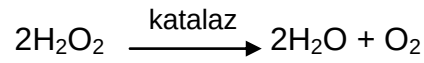
GSH ile GSSG arasındaki dengenin korunabilmesi için glutasyon redüktaz enziminin aktivitesi çok önemlidir. Glutasyon redüktaz enziminin kofaktörü NADPH'dir. NADPH'nin yeterli konsantrasyonu için de pentoz fosfat yolunun ilk aşamasını katalizleyen glukoz 6 fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi gereklidir. GSSH/GSH oranı oksidatif stresin bir başka göstergesi olarak kabul edilmektedir.^{147,148}



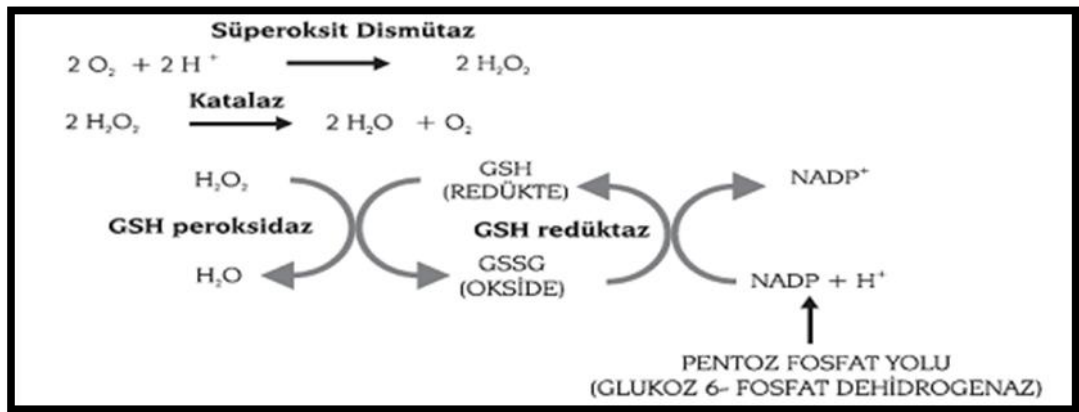
GSH-Px'in fagositik hücrelerdeki önemi büyüktür. GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte solunum patlaması sırasında serbest radikallerin peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarlarına yol açar.¹⁴²

Katalaz (CAT)

Katalaz, tüm canlı hücre tiplerinde değişik oranlarda bulunan, yapısında 4 tane hem grubu içeren, hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalayan bir enzimdir.¹⁴⁴



Peroksidaz aktivitesine sahip olan katalaz enzimi peroksizomlarda yerleşiktir. Bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerlerini de elektron alıcısı olarak kullanabilir. Katalaz, hidrojen peroksit ve etil, metil, hidroperoksitler gibi küçük moleküllere karşı indirgeyici etkiye sahiptir. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine karşı etkisizdir. Katalaz enzimi, insan karaciğer ve böbreklerinde yüksek oranda bulunur. Ayrıca katalaz enziminin yaşla birlikte etkinliği artmaktadır.^{142,144}



Şekil 9. Hücre içinde gerçekleşen antioksidan mekanizması

2.8.3.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar, sentetik antioksidanlar ve diyetle alınan vitamin ve mineralleri içermektedir. Enzimatik işlevi olmayan bu antioksidanlar metal bağlayan proteinler, diyetle alınan antioksidanlar ve diğer antioksidanlar şeklinde sınıflandırılabilirler.¹⁴⁹ (Tablo 3)

Metal bağlayıcı Proteinler	Diyetle alınan antioksidanlar	Diğer Antioksidanlar
• Albumin • Seruloplazmin • Ferritin • Transferrin • Laktoferrin • Haptoglobulin • Hemoglobin • Miyoglobin	• C vitamini • Tokoferoller • Karotenoidler • Flavonoidler • Selenyum • Bakır • Çinko • Taurin ve hipotaurin • Glutatyon	• L-Carnitin • Biluribin • Dihidrolipoat • Fibrinojen • Koenzim Q • Nitrik oksit • Ürik asit • Melatonin

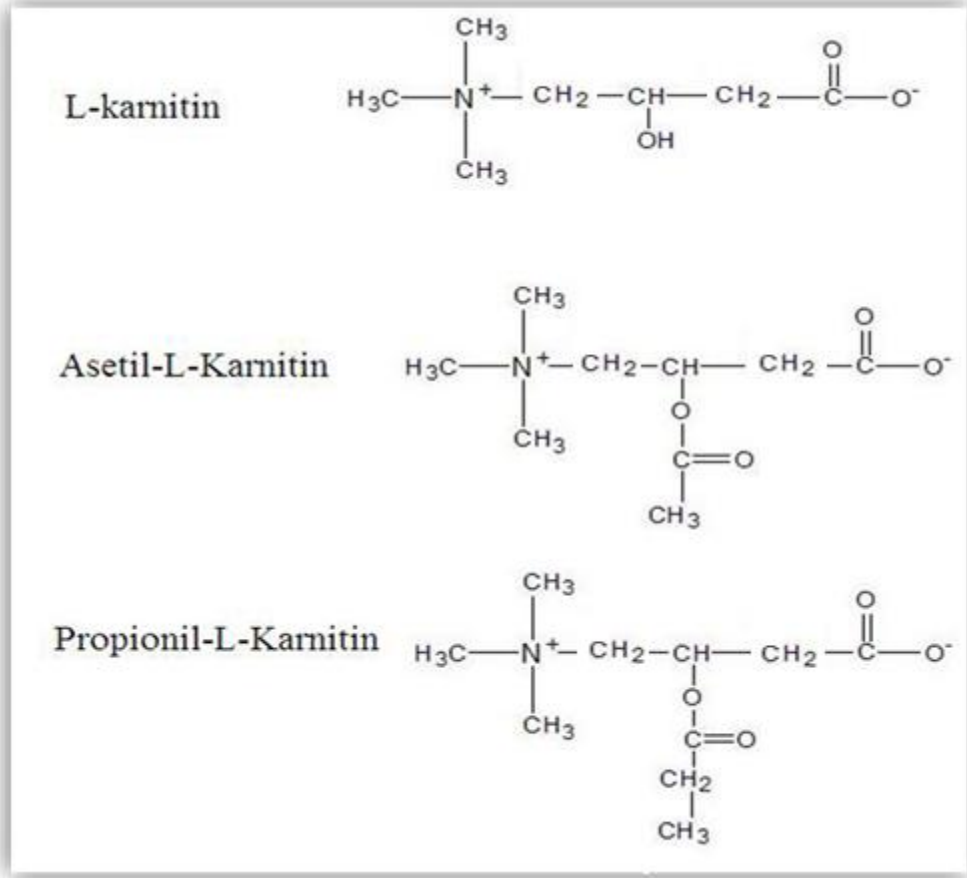
Tablo 3. Enzimatik olmayan antioksidanlar

2.9. L-CARNİTİN

Carnitin ilk kez 1905 yılında hayvan kaslarından izole edilmiştir. 1927’de de ise kimyasal yapısı belirlenmiştir. Bu yapıya göre Carnitin, amino asitlere benzeyen ancak hiçbir protein yapısına girmediği için gerçek bir amino asit olarak kabul edilmeyen vitamin benzeri bir amindir.^{150,151}

Suda çözünebilen Carnitinin kimyasal formülü 3-hidroksi-4-N-trimetilamino-butirat’tır. Carnitin, bir asimetric karbon atomu içerdiği için D ve L izoformlarına sahiptir. Endojen olarak sentezlenen ve metabolik olarak aktif olan sadece L formudur.^{151,152} L-Carnitin’in diğer kimyasal formları ise acetyl-L-Carnitin ve propionil-L-Carnitin’dir. (Şekil 10)

L-Carnitinin %75’i diyet yoluyla vücuda alınmaktadır. Carnitin özellikle et, süt ve süt ürünlerinde bol bulunur. Carnitin içeriğinin bitkisel besinlerde çok düşük olması nedeniyle vejetaryen kişilerde Carnitinin endojen biyosentezi büyük önem taşımaktadır.¹⁵² Total L-Carnitinin %25’i ise endojen olarak lizin ve metioninden karaciğer, böbrek ve beyinde sentezlenir. Çünkü biyosentezinde görevli bir enzim olan γ -butirotetain hidroksilaz enzimi sadece bu dokularda bulunur. Bu enzimin aktivitesi fetus ve yenidoğanlarda çok düşüktür.^{153,154}



Şekil 10. L-Carnitin ve diğer kimyasal formlarının yapısı

Endojen L-Carnitin sentezi bir reaksiyon zinciri ile gerçekleşir. Bu sentez için öncelikle lizin ve metiyonin aminoasitlerine ihtiyaç vardır. L-Carnitinin karbon zincirleri ve nitrojeni lizinden, metil grupları ise metiyoninden sağlanmaktadır. Carnitin sentezi, magnezyum, C vitamini, demir, B3 ve B6 vitaminleri, alfa ketoglutarat ve S-adenozilmetiyonin (SAM) gibi kofaktörlerin varlığında gerçekleşir.¹⁵³

L-Carnitin biyosentezi beş basamakta gerçekleşmektedir. Sentezin ilk basamağı proteine bağlı lizinin metilasyonudur. Metilleiyici ajan SAM, tepkime sonucu oluşan madde ise trimetillizindir. İkinci basamakta

3-hidroksitrimetillizin oluşur. Üçüncü basamakta deoksikarnitinaldehit, dördüncü basamakta ise deoksikarnitin oluşur. Son basamakta ise deoksikarnitin hidroksilaz enziminin katalizörlüğünde Carnitin oluşur.^{155,156} L-Carnitinin insanlardaki günlük sentez seviyesi 0,16 mg/kg ile 0,48 mg/kg arasında değişmektedir. Böylece yaklaşık 70 kg ağırlığındaki bir insan günde 11-34 mg L-Carnitin sentezi yapabilir.¹⁵⁶

Carnitin vücutta yaygın olarak bulunur. Plazmada ve dokularda serbest ya da yağ asitlerine bağlı acylcarnitin türevi olarak bulunabilir.¹⁵⁷ Carnitin ihtiyacı ya diyetten ya da öncelikle karaciğer ve böbrekten sentezi ile karşılanır. Carnitin düzeyi çok yüksek olan ancak Carnitin sentezi yapamayan dokular (örneğin epididimis) Carnitini kandan almak zorundadırlar. L-Carnitinin kandaki düzeyi endojen sentezine, diyetle alınımına ve idrarla atılımına bağlıdır. İdrarla atılımı ise plazma konsantrasyonu eşğine ulaştığı anda gerçekleşmektedir.¹⁵⁸ Serbest Carnitin plazma konsantrasyonu 30-70 µmol/L aralığındadır. Kalp, iskelet kası, karaciğer, böbrekler, yağ dokusu, epididimis ve seminal sıvı Carnitinden zengindir. Testosteronun etkisi ile epididimiste Carnitin düzeyi plazmadan sağlanarak artmaktadır.¹⁵⁹ Kan yolu ile taşınan Carnitin ağırlıklı olarak kalp ve iskelet kasında depolanır.¹⁵³

Carnitin idrardan atılımı günde 200-500 µmol aralığındadır. Erkeklerdeki atılım oranı kadınlardan daha fazladır. Özellikle hemodiyaliz hastalarında Carnitin kaybı çok fazladır. Bu nedenle Carnitin diyetle alınma zorunluluğu vardır.¹⁵⁹

L-Carnitin, aktif taşıma ve pasif difüzyon yolları ile bağırsaklardan geri emilir. Kandaki düzeyinin en üst seviyeye ulaşması

oral alımdan 3,5 saat sonra olur ve 15 saatlik bir yarı ömrü vardır. Carnitin böbrekler yolu ile vücuttan atılmaktadır. Glomerüler filtrasyondan sonra proksimal tübüllerdeki özel bir transport sistemi ile filtre edilen Carnitin %90'ının geri emilimi yapılmaktadır.^{83,153}

L-Carnitin memeli metabolizmasında ATP üretiminde, organik asitlerin detoksifikasyonunda ve uzun zincirli yağ asitlerinin beta oksidasyonu için sitoplazmadan mitokondrinin iç membranına geçişinde görev alan bir bileşiktir. L-Carnitinin işlevi ile ilgili bir bozukluk yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasını kısıtlayarak sitoplazmada yağ asitlerinin birikimini artırır. Mitokondride yağ asitlerinin azalan düzeyi beta oksidasyonunu sınırlar ve daha az ATP oluşumuna yol açar. Carnitin desteği ile yağ asidi taşınmasını sağlayarak enerji üretimini artırılır.¹⁶⁰

Koenzim A (KoA)'lara karşı geçirgen olmayan mitokondri membranından uzun zincirli yağ asitlerinin taşınmasını aktive eder ve sonrasında beta oksidasyon ile ATP sağlanır. Birçok hücrel metabolik yolda kullanılan KoA'ların çoğu mitokondri içinde bulunur. L-Carnitin, beta oksidasyonu hızlandırarak acetyl-KoA miktarını artırır. Toksik etkili acetyl-KoA gruplarını tamponlayarak trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde KoA'ların yeniden kullanılmasını sağlar. Bu şekilde acetyl-KoA/KoA oranını düzenler. İntramitokondriyal acetyl-KoA'ların birikimi başta sitrat döngüsündeki enzimler olmak üzere glukoneogenez, üre döngüsü ve yağ asit oksidasyonu gibi birçok mekanizmanın enzimlerini inhibe edebilir. Bu nedenle hücrede acetyl-KoA/KoA oranı çok önemlidir.¹³⁸

L-Carnitin görev aldığı diğer metabolik olaylar;

- Dallı zincirli aminoasit metabolizması
- Keton cisimlerinin kullanımı
- Peroksizomal beta oksidasyonu
- Eritrosit membranında yağ asiti-fosfolipid dönüşümü
- Yağ asit zincir kısaltma işlemlerinin yan ürünlerinin peroksizomlardan dışarı çıkarılması
- Antioksidan etki, serbest radikallerin temizlenmesi⁸³

Sağlıklı beslenen kişilerde metabolizmanın bozulması sonucu endojen kaynaklı Carnitin eksikliği görülebilir. Özellikle L-Carnitin biyosentezinin bozulması veya aşırı harcanmasından kaynaklanır. Eksiklik belirtileri öncelikle çizgili kas ve kardiyak bozukluklar şeklinde ortaya çıkar. Hemodiyaliz uygulaması sonucu meydana gelen L-Carnitin eksikliği oral ya da intravenöz yolla giderilebilir.¹⁵⁹ Açlık, yaşlılık ve hamilelikte serumdaki serbest L-Carnitin oranı azalmaktadır. L-Carnitin eksikliğinin neden olduğu diğer durumlara siroz, kronik böbrek yetmezliği, ciddi enfeksiyon, bağırsak rezeksiyonu, valproik asit tedavisi, diyabet, kalp yetmezliği, Alzheimer Hastalığı ve kanser örnek olarak verilebilir.^{83,153} Ayrıca anoreksi, kronik yorgunluk, kardiyovasküler hastalıklar, difteri, hipoglisemi, musküler myopati, erkek infertilitesi gibi durumlarda dışarıdan verilen L-Carnitin faydası gösterilmiştir.^{82,83} Yapılan bir çalışmada, sperm hareketliliğinde azalma teşhisi konulan erkek hastalara eksojen L-Carnitin desteği verilmiş ve sperm hareketliliğinde anlamlı bir artış gözlemlenmiştir.¹⁶¹ Son zamanlarda L-Carnitin immünmodulator özelliklerinin de olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. L-Carnitin tedavisinin yaşlı inflamatuvar hücrelerde kemotaktik ve fagositik aktiviteleri arttırdığı bildirilmiştir.^{82,83}

2.9.1. L-Carnitin ve Antioksidan Etki

L-Carnitin ve türevlerinin önemli bir özelliği de antioksidan aktivite göstermeleridir. Yapılan çalışmalarda serbest radikalleri temizleyerek hücreleri reaktif oksijen türlerinden koruduğu bildirilmiştir.¹³⁹

L-Carnitin serbest yağ asitlerini sitoplazmadan mitokondriye taşıyarak yağ asitlerinin beta oksidasyonla acetyl-KoA'ya dönüşmesini sağlar. KoA'nın TKA döngüsüne katılmasıyla bu reaksiyon için gerekli oksijen büyük oranda ortamdan uzaklaştırılır ve ATP üretilir. Bu döngünün sonunda oksijen suya indirgenerek serbest oksijen oranı düşer ve reaktif oksijen türleri oluşumu azaltılmış olur.^{83,139,162}

L-Carnitin, bir antioksidan olarak antioksidan savunma mekanizmasında görevli SOD, GPx ve katalaz gibi enzimlerin aktivitelerini korur. Ayrıca yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan bozuklukları en aza indirdiği saptanmıştır.^{139,163} Yapılan bir çalışmada, L-Carnitinin nitrikoksit miktarını, hücresel solunumu düzenlediği belirtilmiştir.¹⁶⁴ Carnitin ve Carnitin türevlerinin enerji üretimine aracılık eden molekülleri oksidatif hasardan koruduğu ve hasarlı biyomoleküllerin tamirine yardımcı olduğu bilinmektedir. L-Carnitin, lipid peroksidasyonunu indükleyen demir iyonlarının miktarını azaltmaktadır. Carnitinin glutatyon miktarını arttırdığı söylenmektedir.¹⁴⁹

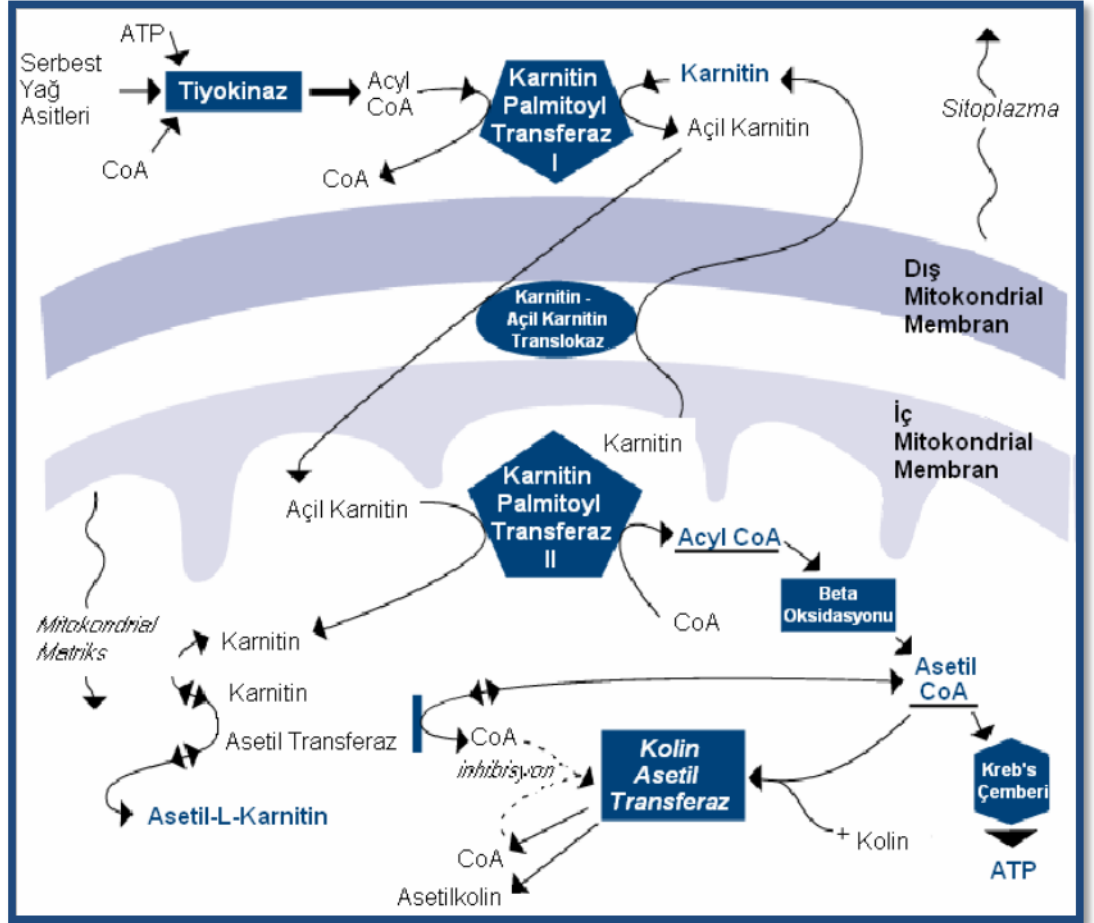
Acetyl L-Carnitin

Acetyl L-Carnitin, L-Carnitinin kısa zincirli ester türevi olup vücutta en çok bulunan acylcarnitin türüdür. Acetyl L-Carnitin, L-Carnitinin fizyolojik özelliklerini taşımasına ek olarak, içerdiği acetyl grubu nedeniyle yüksek enerji metabolizması sırasında önemli bir acetyl grubu vericisi olarak görev alır ve mitokondriyal işlevlerde önemli bir rol üstlenir.¹⁵⁷ Acetyl L-Carnitin, yağ asidi oksidasyonu sırasında acetyl KoA'nın mitokondriye girişini hızlandırır, beyinde acetylkolin sentezine katkıda bulunur. Ayrıca protein ve fosfolipid sentezini uyarır.⁸³ Kısaca Carnitin ve esterleri, yağ asitleri ve açıl KoA'nın sitoplazmada ve mitokondride toksik birikimini engellemekte, mitokondrilere enerji üretimi için acetyl-KoA sağlamaktadır.

Acetyl L-Carnitin oluşumu sitoplazmik bir enzim olan tiokinaz ile başlar. Tiokinaz enzimi yağ asitleri, ATP ve KoA kullanılarak açıl KoA sentezler. Açıl KoA, Carnitin ile Carnitin palmitoil transferaz-I yolunda birleşerek açılCarnitin oluşturulur. Bu bileşik özel sistemlerle mitokondriyal matrikse taşınır. İç mitokondriyal membrandan geçen her açılCarnitin molekülü için bir Carnitin dışarı atılır. İç mitokondriyal membrandaki palmitoil transferaz-II, acylcarnitini Carnitine çevirerek açıl KoA'yı serbest bırakır. Son olarak, mitokondriyal matrikste bulunan Carnitin acetyl transferaz enzimi, Carnitin ve acetyl KoA'dan Acetyl L-Carnitin ve KoA üretir.¹⁵⁹ (şekil 11)

Acetyl L-Carnitin, glutasyonu artırıp, yağ asitlerinin peroksidasyonu ile son ürün olarak meydana gelen MDA'nın oranını düşürerek lipidler üzerinde koruyucu etki yapar.¹⁵⁹ Ayrıca Acetyl L-

Carnitinin ksantin oksidazı kısmen inhibe ettiği, buna bağlı olarak oksidatif hasarı engellediği gösterilmiştir.¹⁴⁹



Şekil 11. Acetyl L-Carnitin sentezi¹⁵⁹

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM)' nden sağlanan Wistar Albino cinsi, 200-250 gram ağırlığında 48 adet, dişi sıçanlar kullanıldı.

Denekler laboratuvar ortamında 3 gün süresince 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünde ve 20 ± 2 °C'lik sıcaklıkta tutuldular. Tüm deneklerin su ve besine serbest erişimi sağlandı.

Çalışmada kullanılan sıçanlar 4 gruba ayrıldı.

Grup I (n=6) (Serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu):

	I. uygulama (24 rat)		II. uygulama (12 rat)		III. uygulama (12 rat)	
	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü
Kontrol	6	0	Tamamlandı		Tamamlandı	

0. dakikada: Hidrasyon sıvısı.

1., 2. ve 3. günlerde, 5mL/kg/doz serum fizyolojik (SF) günde bir defa intraperitoneal (İ.P.) uygulandı.

30. dakikada: Acetyl L- Carnitin yerine plasebo SF uygulaması.

1., 2. ve 3. günlerde, SF içinde 10 mg/mL yoğunlukta çözölen Acetyl L- Carnitin solösyonu ile aynı hacimde 20 mL/kg SF plasebo olarak subcutan uygulandı.

	Acetyl L- Carnitin yerine plasebo SF uygulaması
200 gram sıçan	4 mL serum fizyolojik subcutan uygulandı.
250 gram sıçan	5 mL serum fizyolojik subcutan uygulandı.

60. dakikada: Cisplatin yerine plasebo SF uygulaması

Cisplatin solösyonu 0,5 mg/mL SF içinde hazırlandı. Cisplatin 13 mg/kg/doz bir saatte İ.P. uygulanacağı için plasebo uygulamada SF 1., 2. ve 3. günlerde 26 mL/kg bir saatte İ.P. olarak uygulandı.

	Cisplatin yerine plasebo SF uygulaması
200 gram sıçan	5,2 mL serum fizyolojik 1 saatte İ.P. uygulandı.
250 gram sıçan	6,5 mL serum fizyolojik 1 saatte İ.P. uygulandı.

Cisplatin uygulamasından sonra sıklıkla bulantı, kusma, ishal göröldüğü için bu yolla kaybedilen sıvının mutlaka yerine konması önerilmektedir.^{15,82,83} Bu nedenle, çalışmada Cisplatinin neden olabileceği tubal toksisiteyi önlemek amacıyla deneklerin deney süreci boyunca hidratizasyonları yapıldı. Cisplatin verilen gruplara başlangıç olarak uygulanan 5ml/kg/doz SF intraperitoneal (İ.P.) hidrasyon, aynı stres ortamını oluşturmak amacıyla Cisplatin verilmeyen gruplara da uygulandı.

Grup II (n= 6) (Acetyl L-Carnitin uygulanan grup):

	I. uygulama (24 rat)		II. uygulama (12 rat)	III. uygulama (12 rat)
	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü
Acetyl L-Carnitin	6	0	Tamamlandı	Tamamlandı

0. dakikada: Hidrasyon sıvısı.

1., 2. ve 3. günlerde, 5mL/kg/doz SF günde bir defa intraperitoneal (İ.P.) uygulandı.

30. dakikada: Acetyl L- Carnitin uygulaması.

Acetyl L- Carnitin SF içinde çözülerek 10 mg/mL yoğunlukta solüsyon olarak hazırlandı. Bu gruptaki sıçanlara 1., 2. ve 3. günlerde Acetyl L- Carnitin 200mg/kg/doz subcutan uygulandı.

60. dakikada: Cisplatin yerine plasebo SF uygulaması.

Cisplatin solüsyonu 0,5 mg/mL SF içinde hazırlandı. Cisplatin 13 mg/kg/doz bir saatte İ.P. uygulanacağı için plasebo uygulamada SF 1., 2. ve 3. günlerde 26 mL/kg bir saatte İ.P. olarak uygulandı.

Grup III (n=18) (Cisplatin uygulanan grup):

	I. uygulama (24 rat)		II. uygulama (12 rat)		III. uygulama (12 rat)	
	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü
Cisplatin	1	5	2	4	6	0

0. dakikada: Hidrasyon sıvısı.

1., 2. ve 3. günlerde, 5mL/kg/doz SF günde bir defa intraperitoneal (İ.P.) uygulandı.

30. dakikada: Acetyl L- Carnitin yerine plasebo SF uygulaması.

1., 2. ve 3. günlerde, SF içinde 10 mg/mL yoğunlukta çözölen Acetyl L- Carnitin solösyonu ile aynı hacimde 20 mL/kg SF plasebo olarak subcutan uygulandı.

60. dakikada: Cisplatin uygulaması.

1. günde 0,5 mg/mL salin içinde hazırlanan Cisplatin solösyonu 13 mg/kg/doz bir saatte İ.P uygulandı. 2. ve 3. günlerde plasebo olarak SF 26 mL/kg İ.P uygulandı.

Grup IV (n=18) (Acetyl L-Carnitin ve sonrasında Cisplatin uygulanan grup):

	I. uygulama (24 rat)		II. uygulama (12 rat)		III. uygulama (12 rat)	
	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü
Acetyl L-Carnitin + Cisplatin	1	5	1	5	5	1

0. dakikada: Hidrasyon sıvısı.

1., 2. ve 3. günlerde, 5mL/kg/doz SF günde bir defa intraperitoneal (İ.P.) uygulandı.

30. dakikada: Acetyl L- Carnitin uygulaması.

Acetyl L- Carnitin SF içinde çözülerek 10 mg/mL yoğunlukta solüsyon olarak hazırlandı. Bu gruptaki sıçanlara 1., 2. ve 3. günlerde Acetyl L- Carnitin 200mg/kg/doz subcutan uygulandı.

60. dakikada: Cisplatin uygulaması

1. günde 0,5 mg/mL salin içinde hazırlanan Cisplatin solüsyonu 13 mg/kg/doz bir saatte İ.P uygulandı. 2. ve 3. günlerde plasebo olarak SF 26 mL/kg İ.P uygulandı.

Cisplatin uygulamasından 72 saat sonra (4.gün) sıçanlar ketamin hidroklorid (40 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (5mg/kg) enjeksiyonu ile uyutularak ötenazileri gerçekleştirildi. Ötenazi sonrası sıçanların tuba uterinaları alındı. Işık mikroskopik incelemeleri içinde hayvanlardan alınan

doku örnekleri %10'luk nötral formalinde 72 saat tespit edildi. Daha sonra alışlagelmiş histolojik takip yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı.

3.2. TUNEL Yöntemi

DNA fragmantasyonu ile gelişen apoptozisi saptamak için TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi uygulandı.

Kesitler 37° C'deki etüvde bir gece tutuldu daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57° C'ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat, son olarak da 61 °C' de 20 dakika bekletildi.

Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 3 kez 20'şer dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96, %90, % 80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Kesitler alkolden arındırılmak için iki kez 5'er dakika distile sudan geçirildi.

Sudan çıktıktan sonra etrafı PAP-pen ile çevrelenen dokular, 25 dakika boyunca 37 °C'de 20 µg/ml proteinaz K(REF: 03115836001, Lot: 11403400, Roche Diagnostics, GmbH) ile inkübe edildi. Daha sonra dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. PBS ile yıkama aşamasından sonra 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Cat: AP- 9003- 500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 60

dakika 37 °C nemli ve karanlık ortamda TUNEL kiti (450 µL Label solüsyon, 50 µL Enzim solüsyon) (Roche, In Suti Cell Death Detection Kit, AP Cat: 116489910) ile inkübe edildi. Kalan 100 µL Label solüsyonu negatif kontroller için kullanıldı. Daha sonra dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Ardından dokular converter-POD (Cat: 11684817910, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA, 001) solüsyonu ile nemli ortamda, 37 derecede 30 dakika inkübe edildi. Tekrar dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri belirleyebilmek için DAB ile boyama yapıldı. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoxilen'i kullanıldı.

Boyanan camlar azalan alkol serilerinden geçirildi. Son olarak da 20 dakika ksilolde bekletildikten sonra entellan ile lamelle kapatıldılar. Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

3.3. İmmunohistokimyasal Yöntem

İmmunohistokimyasal boyamalar için 4 µm kalınlığında polilizinli lamlara alınan kesitler 37°C' deki etüvde bir gece tutuldu, daha sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57°C' ye çıkarılarak bu ısıda 1 saat, sonrasında 61 °C' de 20 dakika bekletildi.

Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 20'şer dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96,%90, %80 ve % 70'lik alkol serilerinden geçirildi.

Dehidrate edilen dokuları alkolden arındırmak için kesitler 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Daha sonra doku içerisinde formaldehit'in kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla, dokulara 1µ sitrat tamponu (pH 6.0) (Cat: AP- 9003- 500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile mikrodalga fırında retriiver işlemi uygulandı. Mikrodalgadan çıkan sitrat tamponundaki dokular 20 dakika dışarıda soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Dokuların etrafı PAP-pen ile çevrilerek nemli ortam olan immünohistokimya barına dizildi. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (Ph:7.4) ile yıkandı. Daha sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Cat: AP- 9003- 500, Lot: 9003LT13610, Lab Vision, Fremont, USA) ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS ile camlar yıkandı.

Yıkanan camlara 5 dakika UltraV block (Cat: TA-125-UB, Lot: AUB100129, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikör aşamasına geçildi.

Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, 1/100 oranında hazırlanan anti Caspase-9 antibody (Caspase 9 Ab-4, Cat: RB-1205-P, Lot: 1205 P 1002B), anti-cleaved Caspase-3 antibody (Caspase 3 (CPP32) Ab-4, Cat: RB-1197-P, Lot: 1197 P 909N) primer antikörlerine etkin bırakılarak 45 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamada dokulara uygulanan anti Caspase-8 antibody (Caspase 8, Cat: ab4052, Lot: GR1367-2) primer antikörü +4 derecede 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün işlemlere devam edildi. Primer antikörden sonra camlar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra 10 dakika biotinli sekonder antikör

(Cat:TP-125-BN, Lot: PBN100121, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular enzimin biotine bağlanması amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim (Cat: TS-125- HR, Lot: SHR100406, Lab Vision, Thermo Scientific) kompleksine etkin bırakıldı. İşlem sonunda dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.

Son olarak ortama diaminobenzedin içeren (DAB) substratı (Cat: DABS-125, Lot: 90824B, Spring Bioscience) içeren kromojen DAB (Cat: DABC-004, Lot: 90428, Spring Bioscience) eklenerek yaklaşık 5-10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilen'i kullanıldı.

DAB ile boyanan camlar azalan alkol serilerinden geçirildi. Sonrasında 20 dakika ksilolde bekletilerek lamel entallan ile kapatıldı. Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında fotoğrafları çekilerek değerlendirildi.

3.4. İstatistiksel Yöntem

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde tartılan ratların ağırlıkları arasındaki farklar Wilcoxon sıralı işaretler testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Tuba uterina duvar kalınlığı ile epitel boyu ölçümlerinin, histokimyasal yöntemler sonucu hücre sayımlarının ikili karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ 'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Deneyimizde ratlara yapılan I. uygulamada 24 sıçan kullanıldı. Cisplatin ve Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubuna ait 5'er sıçan deney sonlandırılmadan önce telef oldu. II. uygulamada 12 sıçan kullanıldı. Cisplatin grubunda 4, Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda 5 sıçan deney sonlandırılmadan önce öldü. III. uygulamada da 12 sıçan kullanıldı. Cisplatin grubunda ölü denek görülmedi ancak Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda 1 denek deney sonlandırılmadan önce öldü. Bu nedenle bulgular 28 denek üzerinden yorumlandı. Bulgularda sadece tuba uterinanın ampulla bölümü değerlendirildi.

4.1. Vücut Ağırlıklarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan değerlendirmelerde ratların deney öncesi ve deney sonrası ağırlık ortalamaları alındı. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede kontrol grubu ve Acetyl L-Carnitin grubu deneklerin deney süreci sonunda kilo aldığı, Cisplatin ve L-Carnitin+Cisplatin gruplarındaki ratların ağırlık ortalamasının ise deney başlangıcına göre azaldığı belirlendi. Ancak Cisplatin grubundaki kilo kaybı Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubuna göre daha fazlaydı.

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde tartılan ratların ağırlıkları arasındaki farklar Wilcoxon sıralı işaretler testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0.05$ 'ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Başlangıç ağırlıklarına bakıldığında grupların ağırlık düzeyleri ortalamaları; kontrol grubunda 198.50 ± 6.97 gr, Acetyl L-Carnitin grubunda 200.50 ± 4.72 gr, Cisplatin grubunda 228.88 ± 14.39 gr, Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda 207.85 ± 13.84 gr olarak saptandı.

Deney sonu ağırlıklarına baktıldığında grupların ağırlık düzeyleri ortalamaları; kontrol grubunda 200.00 ± 6.35 gr, Acetyl L-Carnitin grubunda 203.50 ± 6.09 gr, Cisplatin grubunda 192.77 ± 23.60 gr, Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda 175.71 ± 19.43 gr olarak saptandı.(Grafik 1)

Kontrol grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. ($p= 0.357$)

Acetyl L-Carnitin grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. ($p=0.080$)

Cisplatin grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. ($p=0.008$)

Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunun başlangıç ve deney sonu ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi. ($p=0.018$) (Tablo 4)

Mann Whitney U Testi ile gruplar arası deney öncesi ve sonrası ağırlık farkları karşılaştırıldı. (Tablo 5)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.(P=0.570)

Kontrol grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi.(P=0.001)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi.(P=0.003)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi.(P=0.001)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı azalış gözlemlendi.(P=0.003)

Cisplatin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında ortalama ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi.(P=0.958)

4.2. Tuba Uterina Duvar Kalınlığı ve Epitel Kalınlığının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Tüm gruplarda tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı, epitel girintilerinin en düşük seviyede olduğu bölgeler dikkate alınarak her preparattan 6 alan belirlendi, her alandan da 6'şar ölçüm yapılarak ortalamaları saptandı.

Tuba uterina duvar kalınlığı ortalamaları; kontrol grubunda $442,09 \pm 117,20 \mu\text{m}$, Acetyl L-Carnitin grubunda $436,77 \pm 148,40 \mu\text{m}$, Cisplatin grubunda $310,93 \pm 101,46 \mu\text{m}$, Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda $430,91 \pm 143,99 \mu\text{m}$ olarak saptandı. (Grafik 2)

Tuba uterina epitel kalınlığı ortalamaları; kontrol grubunda $152,25 \pm 40,25 \mu\text{m}$, Acetyl L-Carnitin grubunda $133,74 \pm 30,93 \mu\text{m}$, Cisplatin grubunda $96,52 \pm 29,87 \mu\text{m}$, Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda $116,09 \pm 27,47 \mu\text{m}$ olarak saptandı. (Grafik 2)

Kruskal Wallis testine göre 4 grup arasında fark anlamlı olarak bulundu ($p=0.000$). Grupların ikili karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. (Tablo 6)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin grubu kıyaslandığında tuba uterina duvar kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken($p=0,311$); kontrol grubu epitel kalınlığı Acetyl L-Carnitin grubuna göre anlamlı olarak artma gösteriyordu . ($p=0.000$)

Kontrol grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında, tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi. Cisplatin grubunun duvar kalınlığı ve epitel boyu kontrol grubuna göre azalma gösteriyordu. ($p=0.000$, $p=0.0000$)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında, tuba uterina duvar kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken ($p=0,148$); Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu epitel kalınlığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma gösteriyordu. ($p=0.000$)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında, tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi. Cisplatin grubunun duvar kalınlığı ve epitel boyu Acetyl L-Carnitin grubuna göre anlamlı olarak azalma gösteriyordu. ($p=0.000$, $p=0.0000$)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında, tuba uterina duvar kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken ($p=0,679$); Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu epitel kalınlığı Acetyl L-Carnitin grubuna göre anlamlı olarak azalma gösteriyordu. ($p=0.000$)

Cisplatin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi. Cisplatin grubunun duvar kalınlığı

ve epitel boyu Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubuna göre anlamlı olarak azalma gösteriyordu. ($p=0.000$, $p=0000$)

Yapılan istatistiksel değerlendirmede Cisplatin grubunda tuba uterina duvar kalınlığı diğer gruplarla istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi. Cisplatin grubu tuba uterina duvar kalınlığı incelmışti.

Tuba uterina epitel kalınlığı dikkate alındığında ise, tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenirken epitel kalınlığı en ince olan Cisplatin grubuydu. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu ise Cisplatin grubuna göre daha kalındı. Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak az anlamlı farklılık göstermiş ve bu iki gruba göre daha ince olduğu belirlenmiştir.

4.3. Histolojik Bulgular

Hematoksilen-eozin ile boyanan preparatlarda kontrol grubu (Resim 1,2) ve Acetyl L-Carnitin grubu (Resim 3,4) tuba uterina yapısı histolojik olarak normal görünümdeydi. Epitelde silli hücreler ve salgı hücreleri belirgin olarak gözleniyordu. Subepitelial doku ve tuba uterinanın diğer katmanları normal yapıdaydı.

Cisplatin grubunda (Resim 5-8) ise tuba uterinada intraepitelial lenfositlerin varlığı belirgin olarak ayırt edilirken, bazı kesitlerde subepitelial hemoraji belirgin olarak gözleniyordu.

Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavili grup (Resim 9,10), Cisplatin grubu ile karşılaştırıldığında ise intraepitelial lenfositlerin varlığı açısından benzerlik gösterirken, subepitelial hemorajiye bu grupta rastlanmadı.

4.4. TUNEL Bulguları ve İstatistiksel Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda tuba uterina epitelinde, az sayıda hücre TUNEL pozitiflik göstermekteydi. (Resim 11-13). Acetyl L-Carnitin grubu bulguları, kontrol grubu bulgularına benzer özellik göstermekteydi. Bu grupta da tuba uterina epitelinde, az sayıda TUNEL pozitif hücreler gözlendi (Resim 14-16). Cisplatin grubu bulguları kontrol grubu ve Acetyl L-Carnitin grubundan farklı olarak epitel, çok sayıda TUNEL pozitif hücre içermekteydi (Resim 17-20). Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavi grubu bulguları ise kontrol grubu, Acetyl L-Carnitin grubu ve Cisplatin grubu bulgularından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi. Kontrol ve yalın Acetyl L-Carnitin grubuna göre bu grupta daha çok sayıda, Cisplatin grubuna göre ise daha az sayıda DNA fragmentasyonu gösteren hücreler izlendi (Resim 21,22).

Tuba uterina epitelinde her denekten 100 hücreden pozitif olan hücreler sayıldı ve ortalamaları belirlendi.

Tuba uterina epitelinde TUNEL pozitif hücre ortalamaları; kontrol grubunda $6,10 \pm 1,28$; Acetyl L-Carnitin grubunda $6,00 \pm 0,66$; Cisplatin grubunda $22,70 \pm 4,64$; Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda $12,30 \pm 1,70$ olarak saptandı. (Grafik 3)

Kruskal Wallis testine göre 4 grup arasında fark anlamlı olarak bulundu ($p=0,000$). Grupların ikili karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. (Tablo 7)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin grubu kıyaslandığında tuba uterina epiteli TUNEL pozitif hücre sayıları arasındaki fark anlamsızdı. ($p=0,853$)

Kontrol grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epiteli TUNEL pozitif hücre sayıları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Cisplatin grubu TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. ($p=0,000$)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epiteli TUNEL pozitif hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu TUNEL pozitif hücre sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksekti. ($p=0,000$)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epiteli TUNEL pozitif hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Cisplatin grubu TUNEL pozitif hücre sayısı Acetyl L-Carnitin grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. ($p=0,000$)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epiteli TUNEL pozitif hücre sayıları

arasındaki fark anlamlı bulundu. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu TUNEL pozitif hücre sayısı L-Cartinin grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. (p=0,000)

Cisplatin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epiteli TUNEL pozitif hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Cisplatin grubu TUNEL pozitif hücre sayısı Acetyl L-Cartinin+Cisplatin pretedavi grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. (p=0,000)

4.5. Caspase 8 Bulguları ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Tuba uterina epitelinde sitoplazmik tutulum gösteren Caspase 8 işaretli hücreler değerlendirildiğinde kontrol grubu ile yalın Acetyl L-Carnitin grubu ve Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken; Cisplatin grubu ile anlamlı fark olduğu belirlendi. (Tablo 8,9) Bu bulgu cisplatinin apoptozu tetiklediği ve Acetyl L-Carnitin pretedavisinin caspase 8 üzerinden tetiklenen ekstresek apoptozu önlediği şeklinde değerlendirildi.

Tuba uterina epitelinde Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayısı ortamları; kontrol grubunda $119,25 \pm 5,12$; Acetyl L-Carnitin grubunda $109,50 \pm 6,24$; Cisplatin grubunda $178,50 \pm 3,87$; Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda $124,50 \pm 3,87$ olarak saptandı. (Grafik 4)

Kruskal Wallis testine göre 4 grup arasında fark anlamlı olarak bulundu ($p=0,005$). Grupların ikili karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. (Tablo 9)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamsız bulundu. ($p=0,059$)

Kontrol grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Cisplatin grubunda Caspase 8 tutulumlu hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. ($p=0,021$)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamsız bulundu. ($p=0,144$)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Cisplatin grubunda Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayısı Acetyl L-Carnitin grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. ($p=0,021$)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Acetyl L-

Carnitin+Cisplatin grubunda Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayısı Acetyl L-Carnitin grubuna göre az anlamlı olarak yüksekti. (p=0,021)

Cisplatin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Cisplatin grubunda Caspase 8 immünreaktivite gösteren hücre sayısı Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubuna göre anlamlı olarak yüksekti. (p=0,021)

4.6. Caspase 9 Bulguları ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Tuba uterina epitelinde sitoplazmik tutulum gösteren Caspase 9 işaretli hücreler değerlendirildiğinde Cisplatin ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavili grupları dışındaki tüm gruplar birbirleri ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermekteydi. (Tablo 8,9) Bu sonuç Caspase 9 üzerinden tetiklenen intrinsek apoptozun Acetyl L-Carnitin pretedavisi ile önlenmediği bulgusunu ortaya koydu.

Tuba uterina epitelinde Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayısı ortamları; kontrol grubunda $124,50 \pm 3,87$; Acetyl L-Carnitin grubunda $108,75 \pm 5,12$; Cisplatin grubunda $198,00 \pm 5,16$; Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda $196,50 \pm 3,87$ olarak saptandı. (Grafik 4)

Kruskal Wallis testine göre 4 grup arasında fark anlamlı olarak bulundu ($p=0,005$). Grupların ikili karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. (Tablo 9)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı olarak bulundu. Kontrol grubunda Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayısı Acetyl L-Carnitin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksekti. ($p=0,021$)

Kontrol grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı olarak bulundu. Cisplatin grubunda Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteriyordu. ($p=0,021$)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı olarak bulundu. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteriyordu. ($p=0,021$)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı olarak bulundu. Cisplatin grubunda Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayısı Acetyl L-Carnitin grubuna göre anlamlı artış gösteriyordu. ($p=0,021$)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayısı Acetyl L-Carnitin grubuna göre anlamlı artış gösteriyordu. ($p=0,021$)

Cisplatin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 9 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamsız bulundu. ($p=0,663$)

4.7. Caspase 3 Bulguları ve İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Tuba uterina epitelinde sitoplazmik ve nükleer tutulum gösteren Caspase 3 işaretli hücreler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol ve Acetyl L-Carnitin grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunurken kontrol grubu ile Cisplatin grubu ve Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark anlamlı bulundu. Acetyl L-Carnitin grubu ile Cisplatin grubu ve Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grupları arasındaki fark ise istatistiksel olarak daha az anlamlı bulundu. Aynı şekilde Cisplatin grubu ve Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grupları arasındaki fark da az anlamlı bulundu.(Tablo 8,9) Bu sonuçlar Cisplatin uygulamasının procaspase 3' ü aktive ederek apoptotik süreci başlattığını ve Acetyl L-Carnitin+Cisplatin uygulamasının apoptozu engellemediğini düşündürdü.

Tuba uterina epitelinde Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayısı ortamları; kontrol grubunda $143,75 \pm 2,87$; Acetyl L-Carnitin grubunda $136,00 \pm 2,64$; Cisplatin grubunda $245,00 \pm 6,83$; Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda $184,50 \pm 3,87$ olarak saptandı. (Grafik 4)

Kruskal Wallis testine göre 4 grup arasında fark anlamlı olarak bulundu ($p=0,004$). Grupların ikili karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. (Tablo 9)

Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamsız bulundu. ($p=0,076$)

Kontrol grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Cisplatin grubunda Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteriyordu. ($p=0,020$)

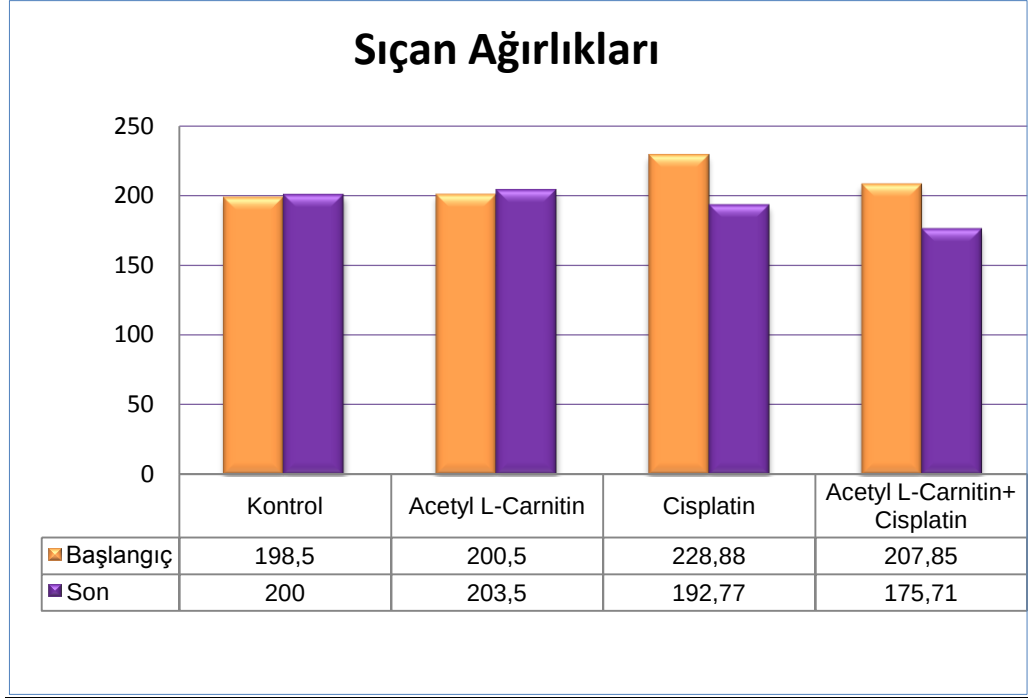
Kontrol grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı artış gösteriyordu. ($p=0,020$)

Acetyl L-Carnitin grubu ile Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Cisplatin grubunda Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayısı Acetyl L-Carnitin grubuna göre anlamlı artış gösteriyordu. (p=0,021)

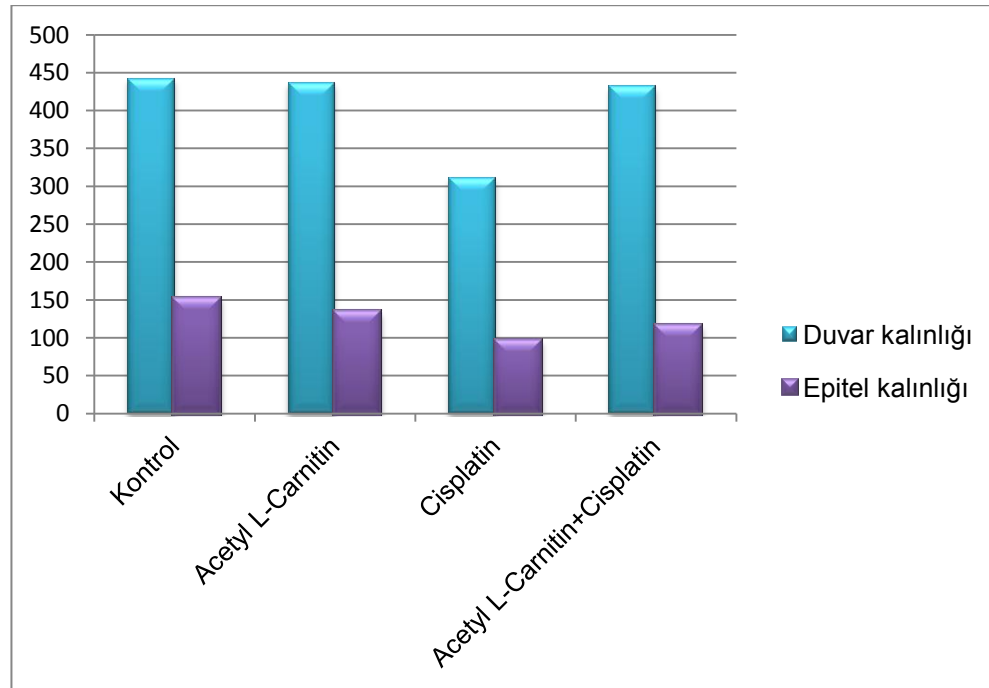
Acetyl L-Carnitin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayısı Acetyl L-Carnitin grubuna göre anlamlı artış gösteriyordu. (p=0,021)

Cisplatin grubu ile Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu kıyaslandığında tuba uterina epitelinde Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayıları arasındaki fark anlamlı bulundu. Cisplatin grubunda Caspase 3 immünreaktivite gösteren hücre sayısı Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubuna göre anlamlı artış gösteriyordu. (p=0,021)

Grafik 1: Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıkları

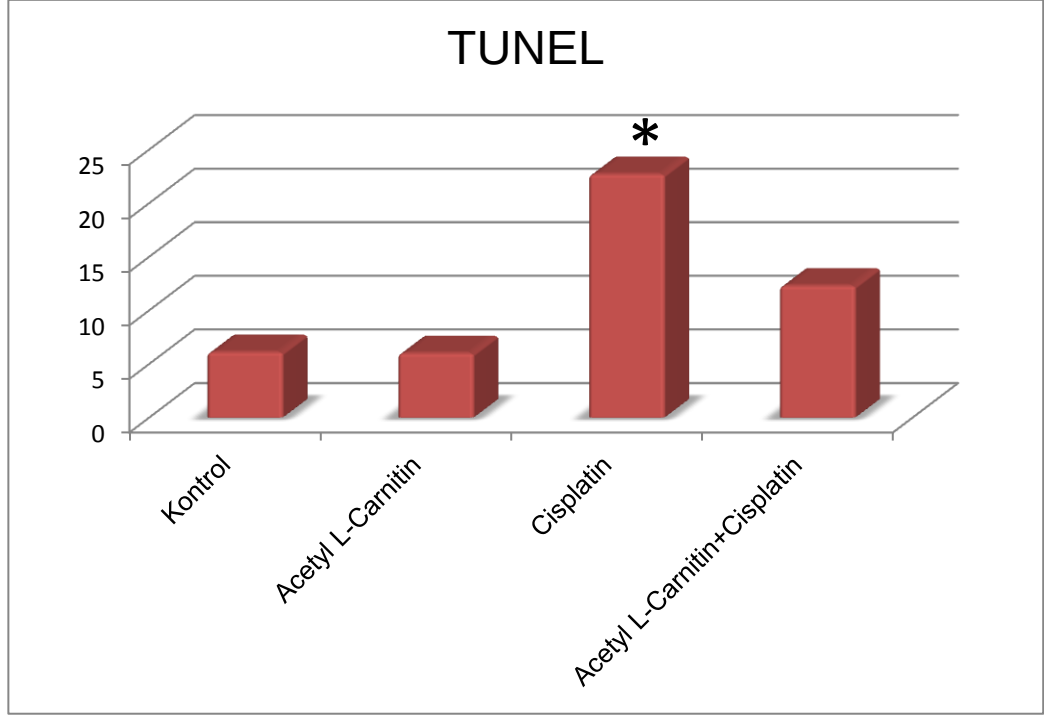


Grafik 2. Tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı ortalamaları

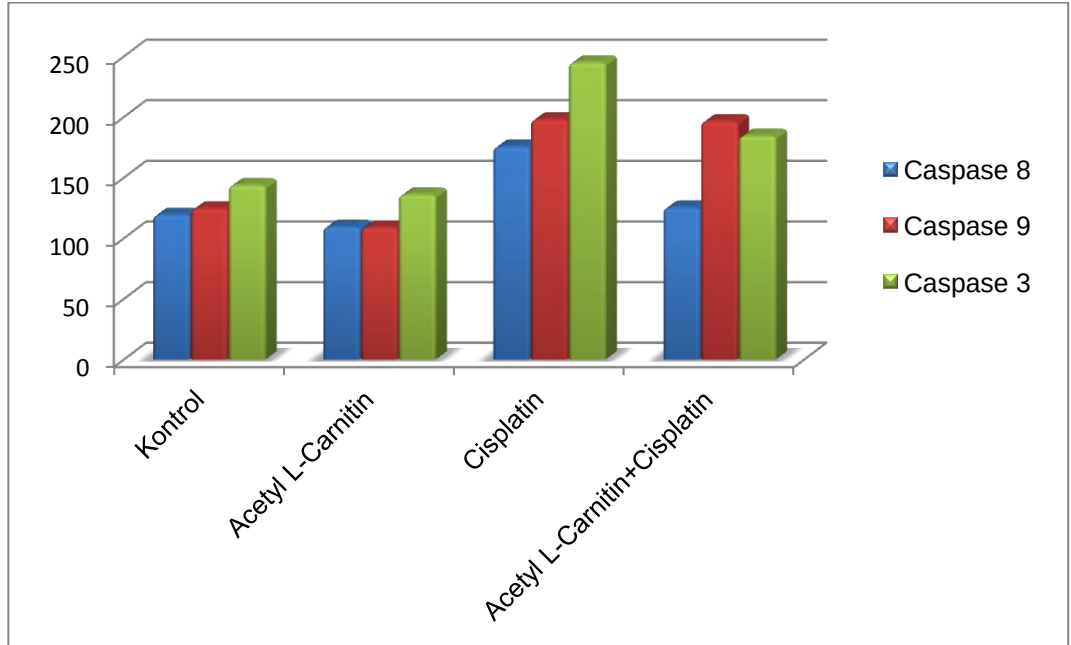


Grafik 3. Tuba uterina epitelinde TUNEL pozitif hücre ortalamaları

*: Tüm gruplar ile anlamlı olarak yüksek



Grafik 4. Epitelde caspase 8,9 ve 3 tutulumlu hücre sayısı ortalamaları



Tablo 4. Deneklerin deney başlangıcı ve deney sonu ağırlıklarının istatistiksel farklılıkları (P< 0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterler ile vurgulanmıştır.) * Wilcoxon sıralı işaretler testi

		N	Ortalama	Standart Sapma	Varyans	Minimum Değer	Medyan	Maksimum Değer	P*
Kontrol	İlk gün	6	198,50	6,97	48,70	194	196	212	0,357
	Son gün		200	6,35	40,40	194	198,5	212	
Acetyl L-Carnitin	İlk gün	6	200,50	4,72	22,30	194	200	208	0,080
	Son gün		203,50	6,09	37,10	193	205	210	
Cisplatin	İlk gün	9	228,88	14,39	207,11	207	230	249	0,008
	Son gün		192,77	23,60	557,19	157	194	234	
Acetyl L-Carnitin +Cisplatin	İlk gün	7	207,85	13,84	191,81	193	203	228	0,018
	Son gün		174,71	19,43	377,57	156	172	211	

Tablo 5. Gruplar arası deney öncesi ve sonrası ağırlık farklarının istatistiksel karşılaştırılması. ($P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterler ile vurgulanmıştır.) * Mann Whitney U Testi

+ Artış

- Azalış

	Ağırlık Değişimleri	P*
Kontrol Acetyl L-Carnitin	1,5 gr +	0,570
	3 gr +	
Kontrol Cisplatin	1,5 gr +	0,001
	36,11 gr -	
Kontrol Acetyl L-Carnitin +Cisplatin	1,5 gr +	0,003
	32,14 gr -	
Acetyl L-Carnitin Cisplatin	3 gr +	0,001
	36,11 gr -	
Acetyl L-Carnitin Acetyl L-Carnitin +Cisplatin	3 gr +	0,003
	32,14 gr -	
Cisplatin Acetyl L-Carnitin +Cisplatin	36,11 gr -	0,958
	32,14 gr -	

Tablo 6. Gruplar arası tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı ölçümlerinin karşılaştırılması. ($P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterler ile vurgulanmıştır.) *: Mann-Whitney U testi

	Duvar kalınlığı P değeri*	Epitel kalınlığı P değeri*
Kontrol/Acetyl L-Carnitin	0,311	0,000
Kontrol/Cisplatin	0,000	0,000
Kontrol/Acetyl L-Carnitin+Cisplatin	0,148	0,000
Acetyl L-Carnitin/Cisplatin	0,000	0,000
Acetyl L-Carnitin/Acetyl L-Carnitin+Cisplatin	0,679	0,000
Cisplatin/ Acetyl L-Carnitin+Cisplatin	0,000	0,000

Tablo 7. Gruplar arası TUNEL pozitif hücrelerin istatistiksel değerleri ($P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterler ile vurgulanmıştır.) *: Mann-Whitney U testi

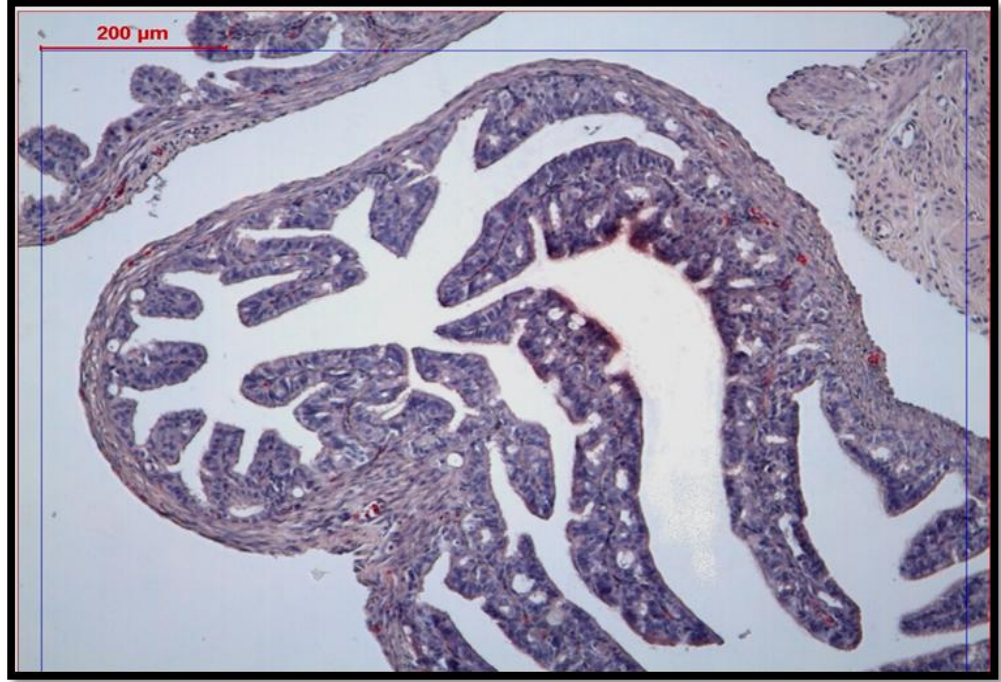
	Epitel P değeri*
Kontrol/Acetyl L-Carnitin	0,853
Kontrol/Cisplatin	0,000
Kontrol/Acetyl L-Carnitin+Cisplatin	0,000
Acetyl L-Carnitin/Cisplatin	0,000
Cisplatin/ Acetyl L-Carnitin+Cisplatin	0,000

Tablo 8. Tuba uterina epitelinde Caspase 8,9 ve 3 tutulumlu hücre sayısı ortalamaları

		Caspase 8	Caspase 9	Caspase 3
Kontrol	Ortalama	119,25	124,50	143,75
	Standart Sapma	5,12	3,87	2,87
Acetyl L-Carnitin	Ortalama	109,50	108,75	136,00
	Standart Sapma	6,24	5,12	2,64
Cisplatin	Ortalama	178,50	198	245
	Standart Sapma	3,87	5,16	6,83
Acetyl L-Carnitin +Cisplatin	Ortalama	124,50	196,50	184,50
	Standart Sapma	3,87	3,87	3,87

Tablo 9. Tuba uterina epitelinde gruplar arası caspase tutulumlarının karşılaştırılması. (P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve koyu karakterler ile vurgulanmıştır.) *: Mann-Whitney U testi

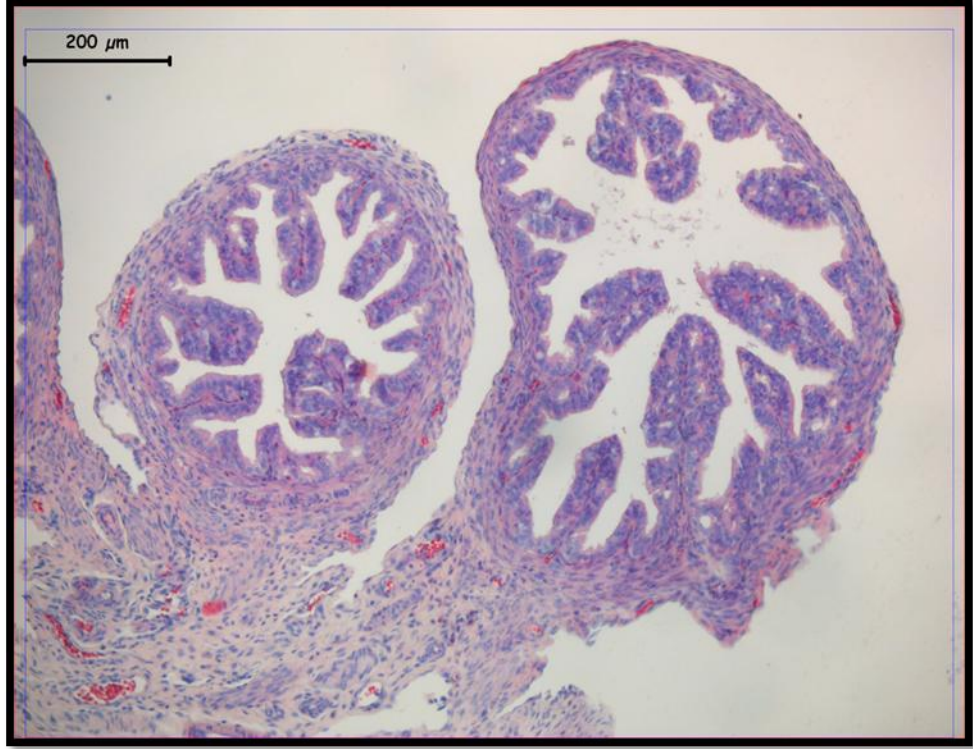
	Caspase 8 P değeri*	Caspase 9 P değeri*	Caspase 3 P değeri*
Kontrol/Acetyl L-Carnitin	0,059	0,021	0,076
Kontrol/Cisplatin	0,021	0,021	0,020
Kontrol/Acetyl L-Carnitin+Cisplatin	0,144	0,021	0,020
Acetyl L-Carnitin/Cisplatin	0,021	0,021	0,021
Acetyl L-Carnitin/Acetyl L-Carnitin+Cisplatin	0,021	0,021	0,021
Cisplatin/ Acetyl L-Carnitin+Cisplatin	0,021	0,663	0,021



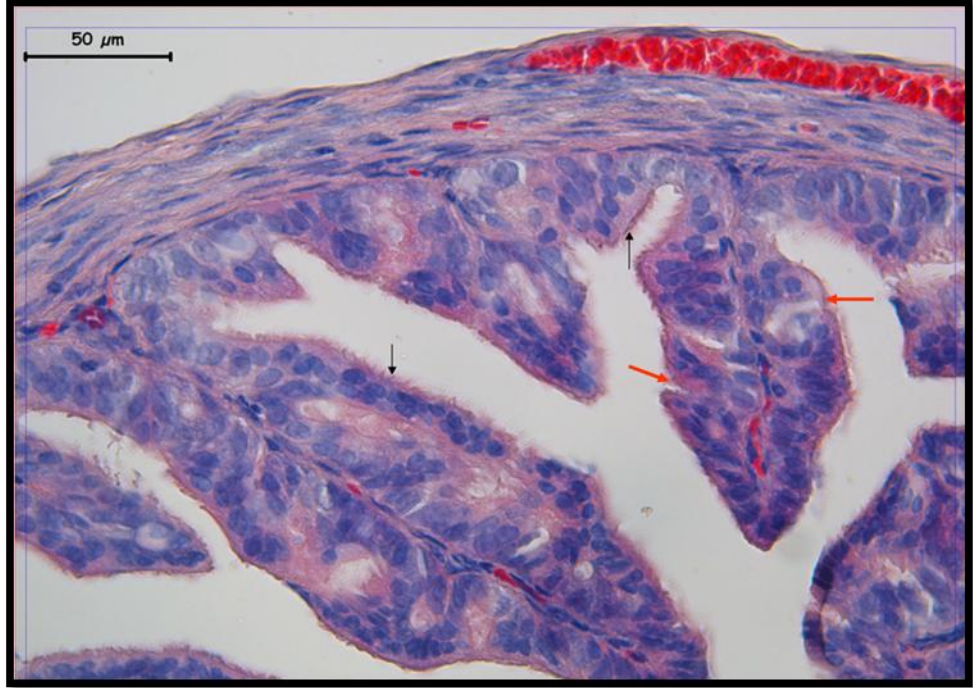
Resim 1. Kontrol grubunda normal görünümde tuba uterina morfolojisi. (H&E)



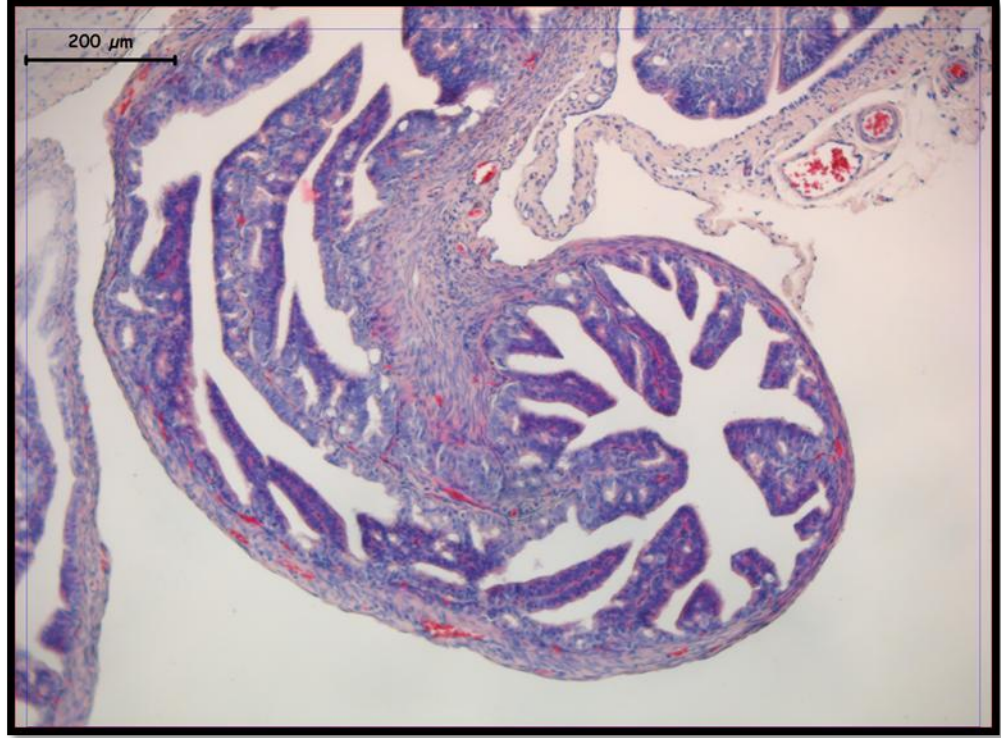
Resim 2. Kontrol grubunda normal görünümde tuba uterina epitelinde silli hücreler (siyah oklar), salgı hücreleri (kırmızı oklar). (H&E)



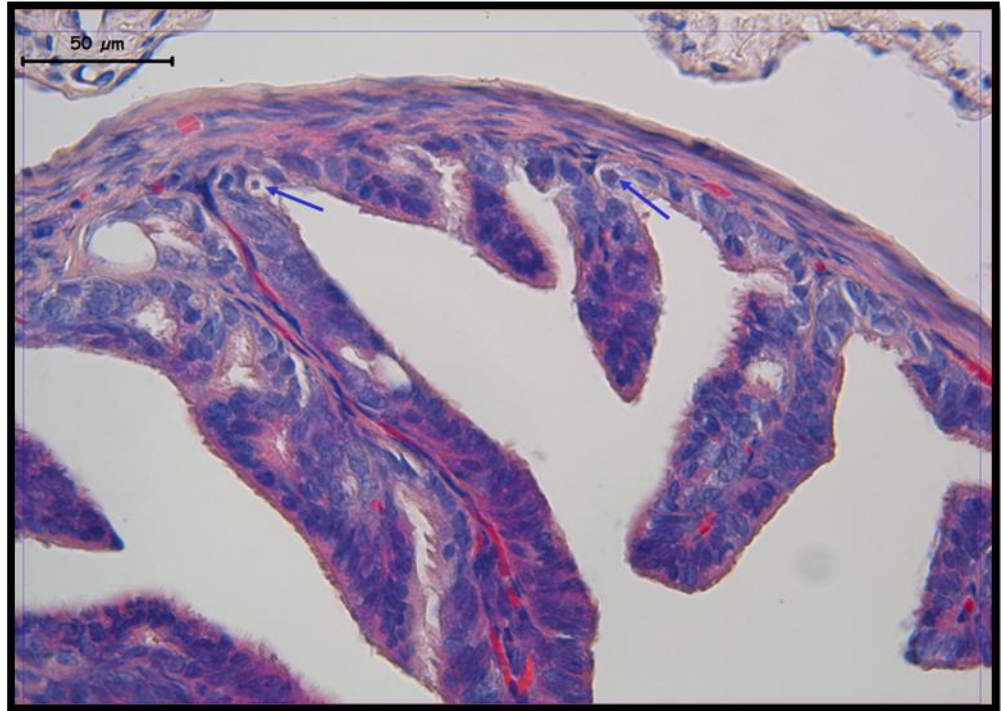
Resim 3. Acetyl L-Carnitin grubunda normal görünümde tuba uterina morfolojisi. (H&E)



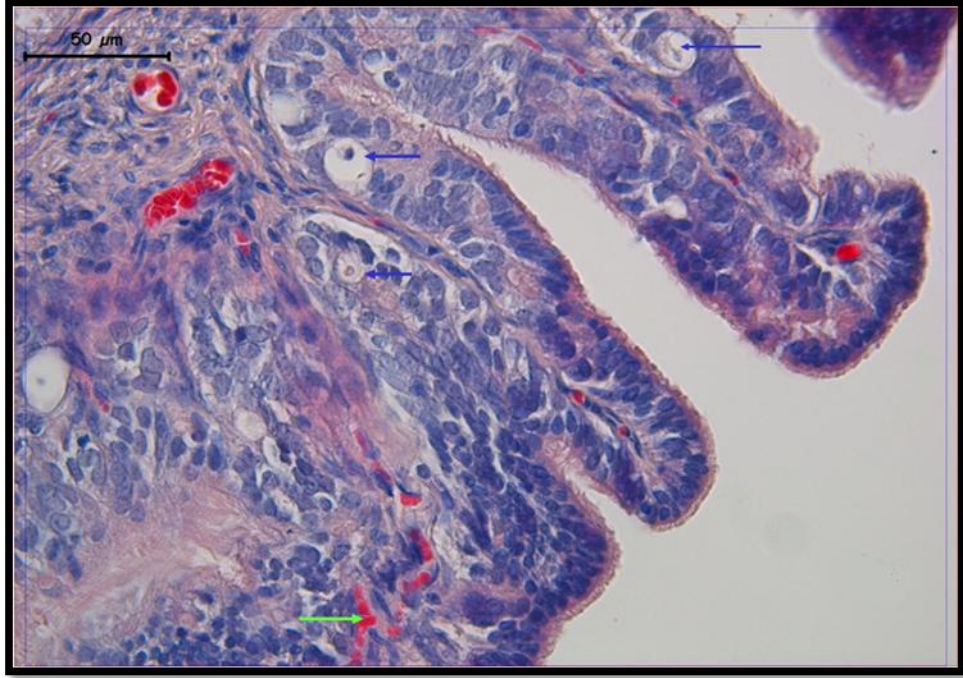
Resim 4. Acetyl L-Carnitin grubunda normal görünümde tuba uterina epiteli silli hücreler (siyah oklar), salgı hücreleri (kırmızı oklar). (H&E)



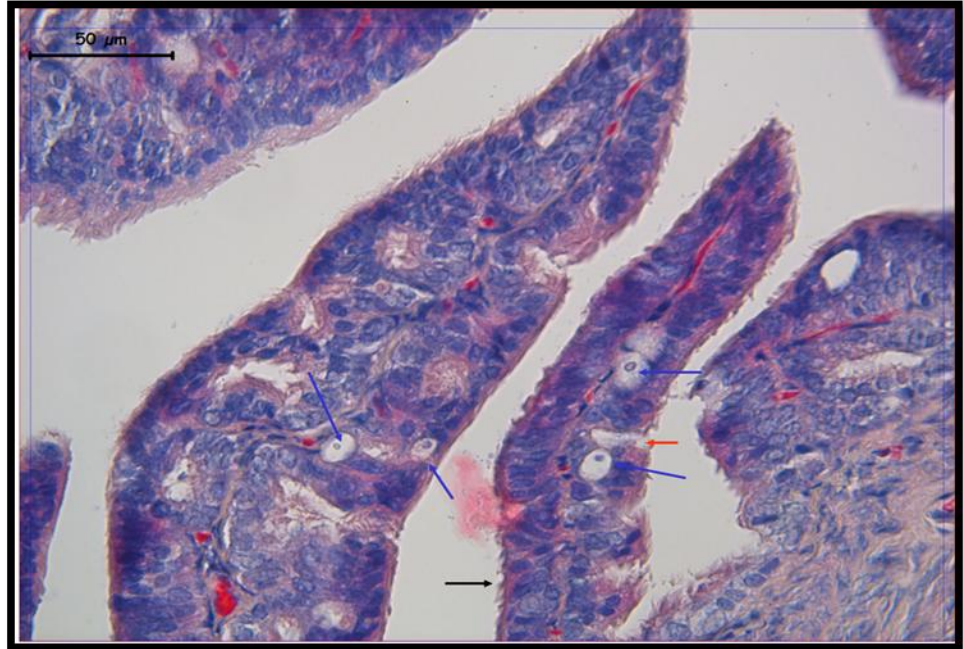
Resim 5. Cisplatin grubuna ait küçük büyültmede tuba uterina morfolojisi. (H&E)



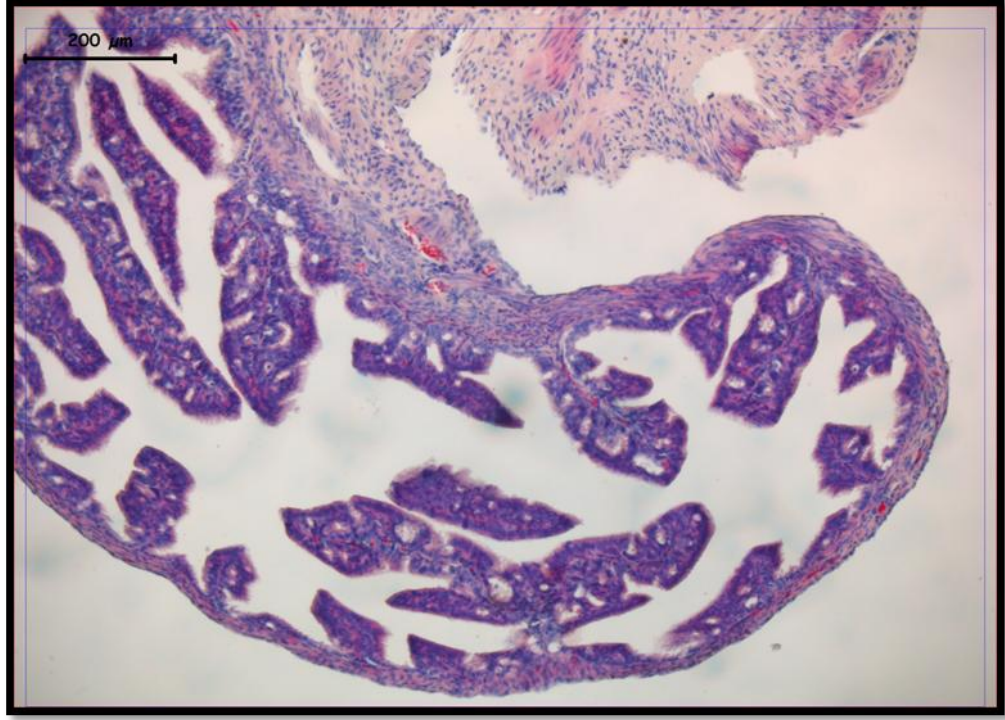
Resim 6. Cisplatin grubuna ait büyük büyültmede tuba uterinada intraepitelial lenfositler(mavi oklar). (H&E)



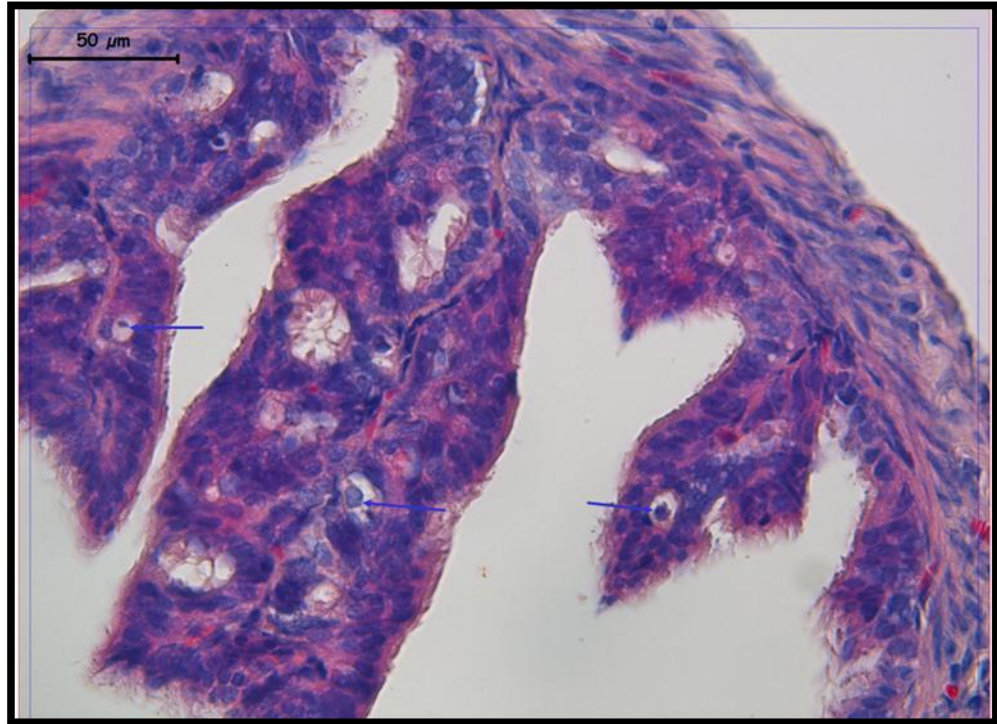
Resim 7. Cisplatin grubundan büyük büyültmede tuba uterinada intraepitelial lenfositler (mavi oklar) ve subepitelial hematom (yeşil oklar). (H&E)



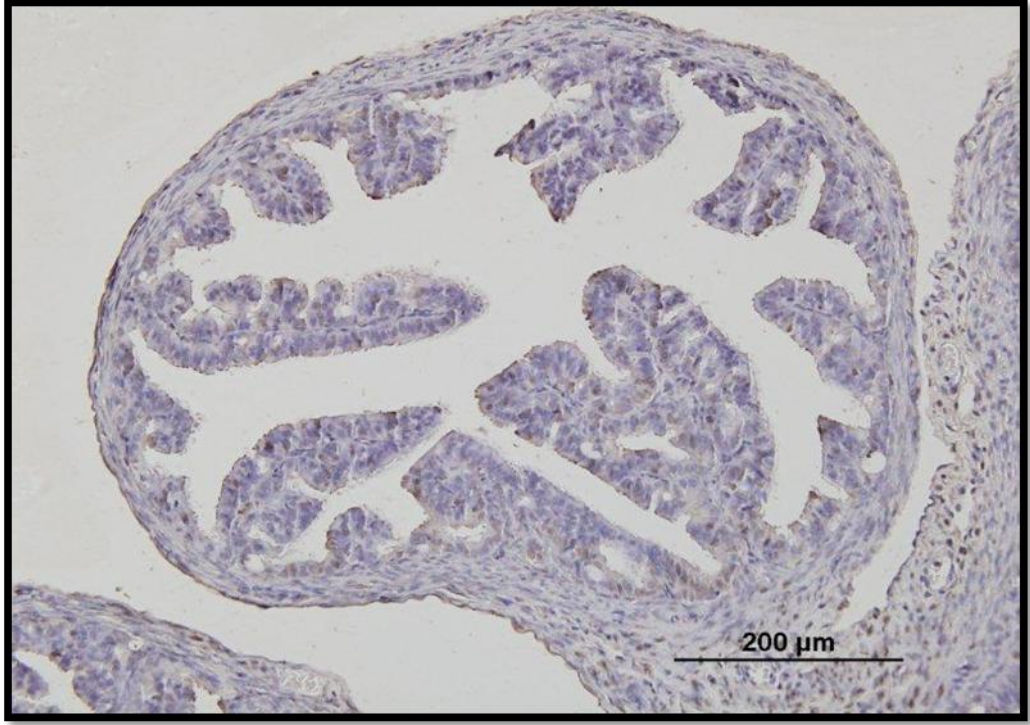
Resim 8. Cisplatin grubundan büyük büyültmede tuba uterinada intraepitelial lenfositler (mavi oklar), salgı hücreleri (kırmızı oklar), silli hücreler (siyah oklar). (H&E)



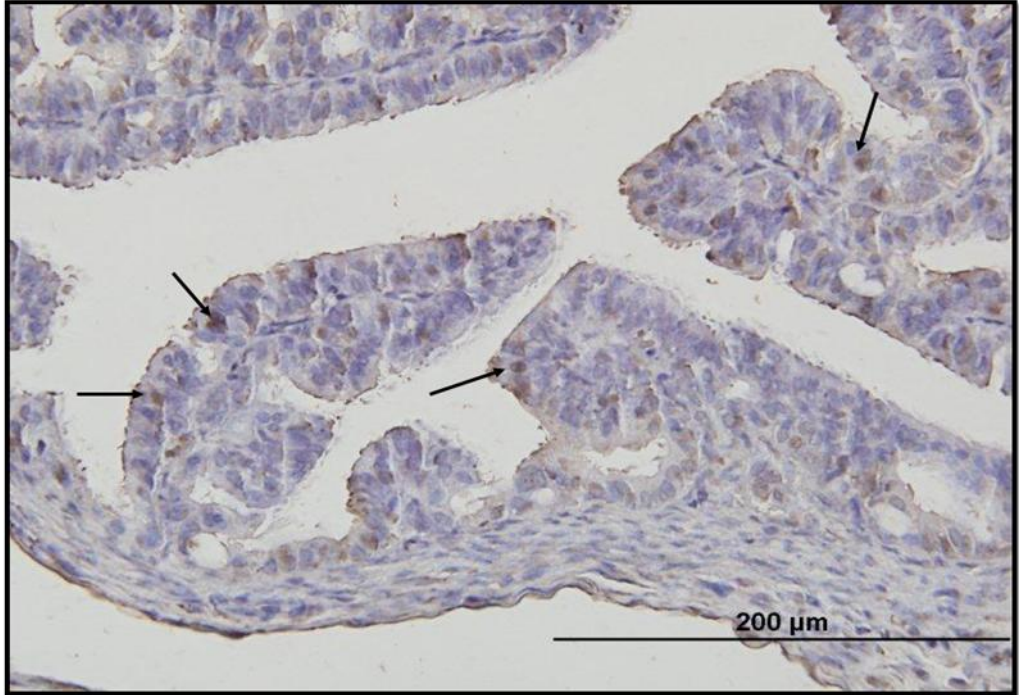
Resim 9. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda küçük büyültmede tuba uterina epiteli. (H&E)



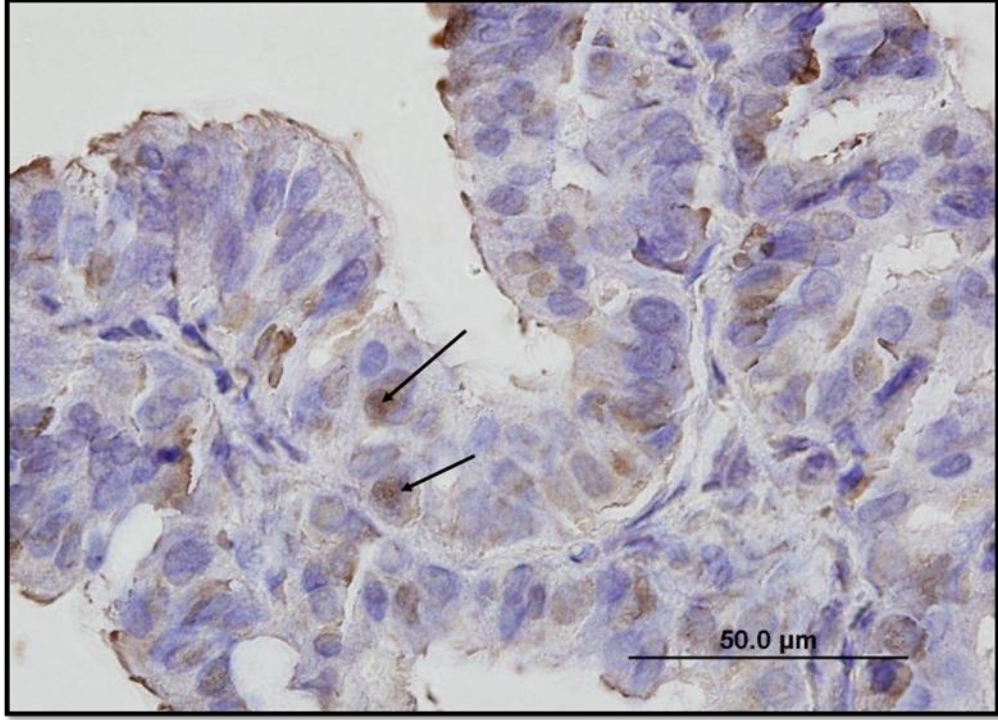
Resim 10. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda büyük büyültmede intraepitelial lenfositler (mavi oklar). (H&E)



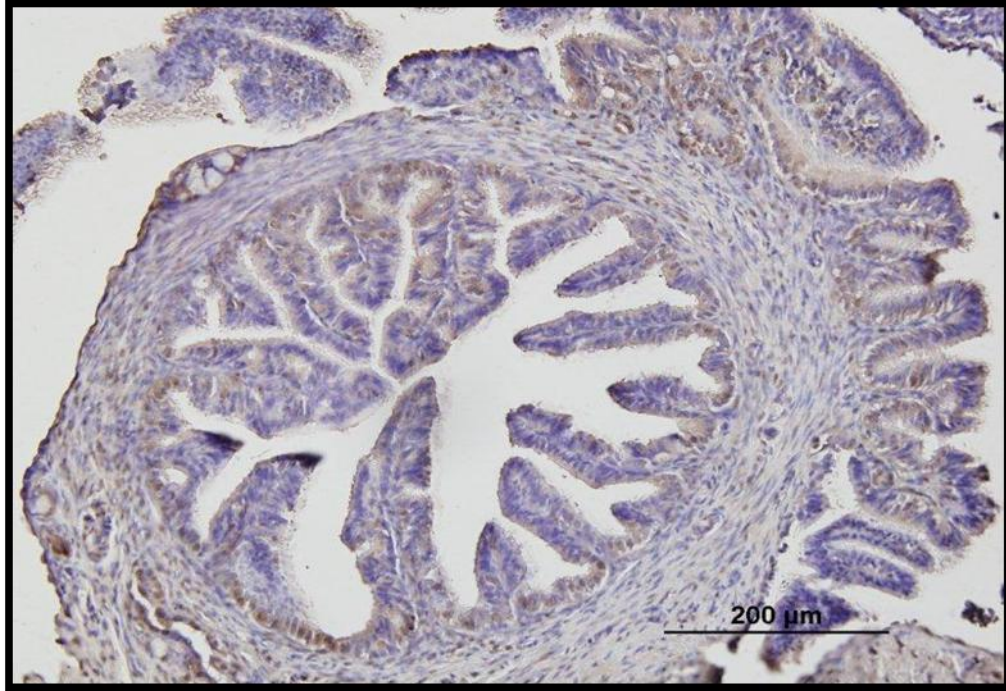
Resim 11. Kontrol grubunda tuba uterinanın TUNEL boyaması yapılmış küçük büyültmede görünümü. (DAB&Hematoksilen)



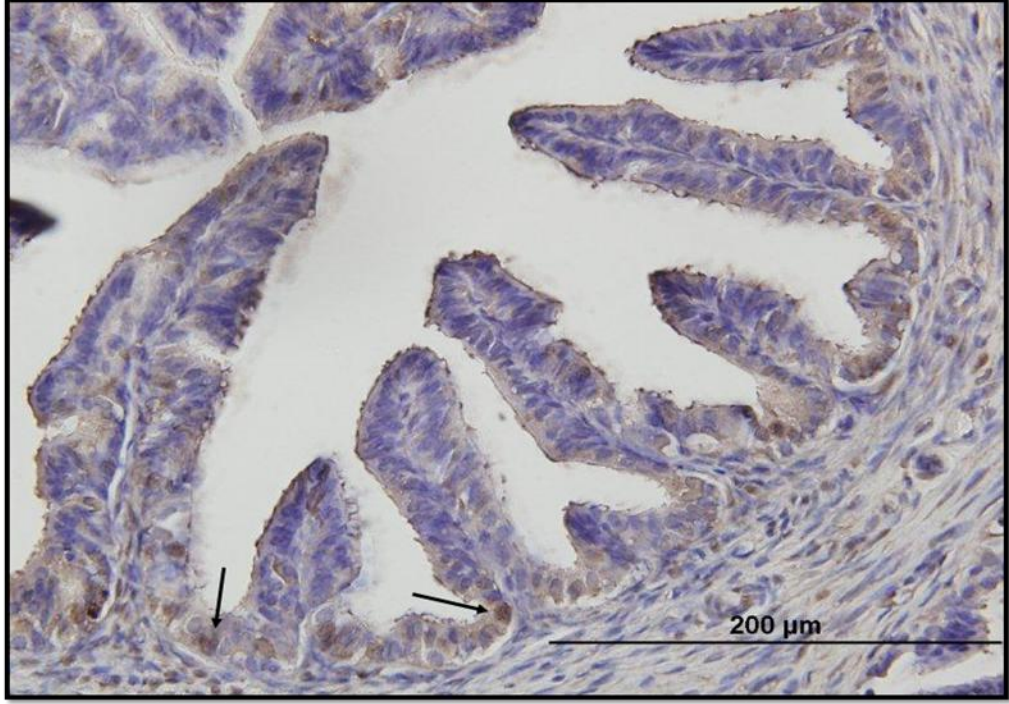
Resim 12. Kontrol grubunda zayıf reaksiyon gösteren az sayıda TUNEL pozitif epitel hücreleri (siyah oklar). (DAB&Hematoksilen)



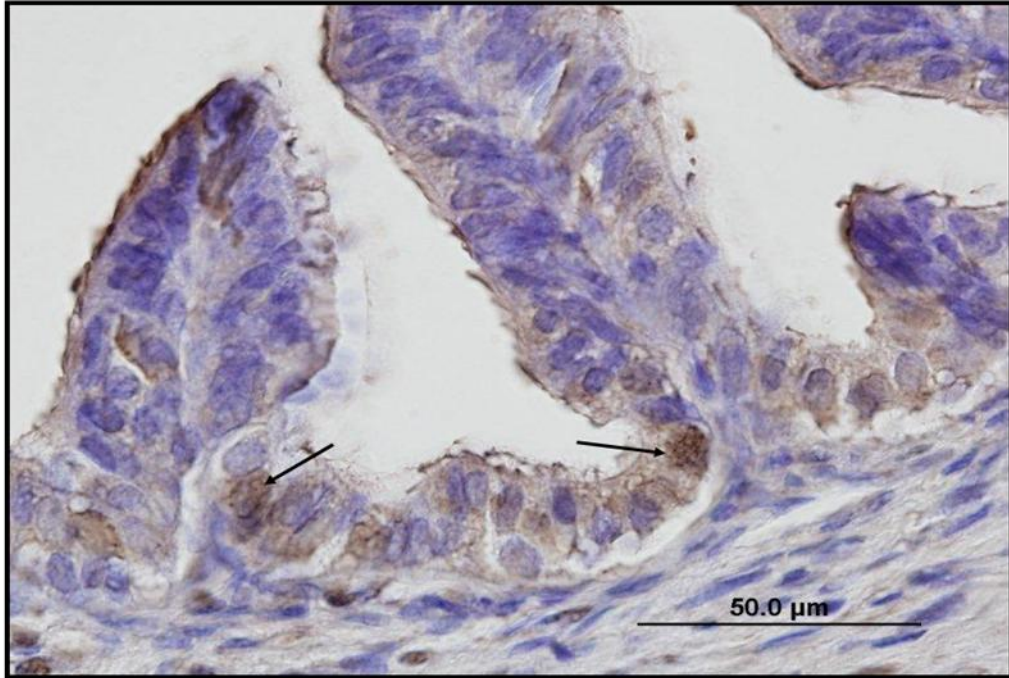
Resim 13.Kontrol grubunda büyük büyültmede zayıf reaksiyon gösteren TUNEL pozitif epitel hücreleri (siyah oklar). (DAB&Hematoksilen)



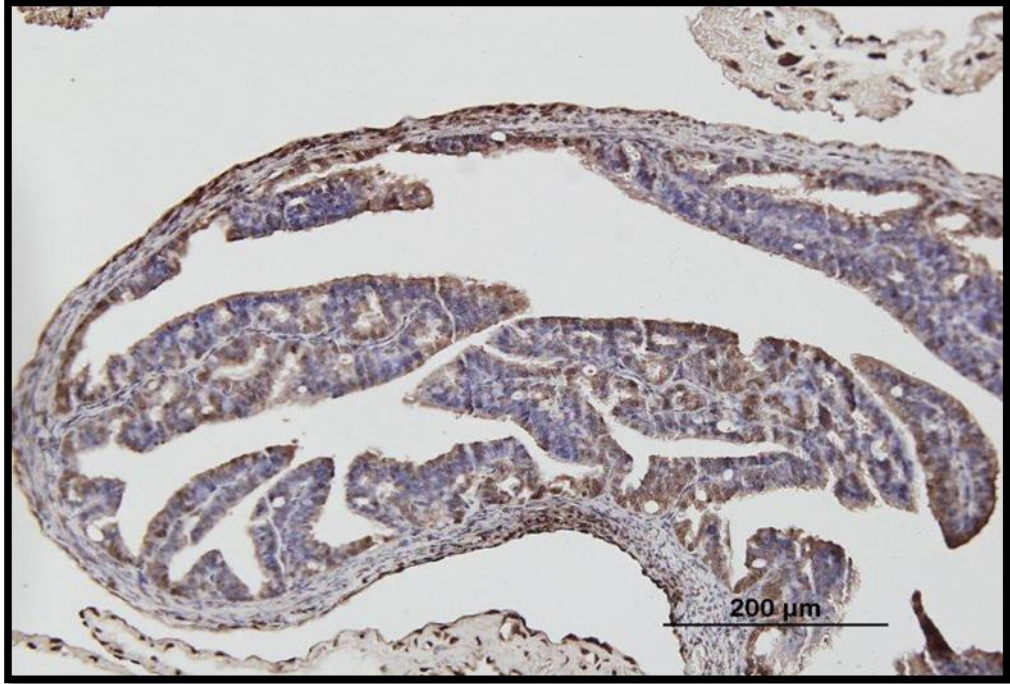
Resim 14. TUNEL boyaması yapılan Acetyl L-Carnitin grubunda küçük büyültmede bir görünüm. (DAB&Hematoksilen)



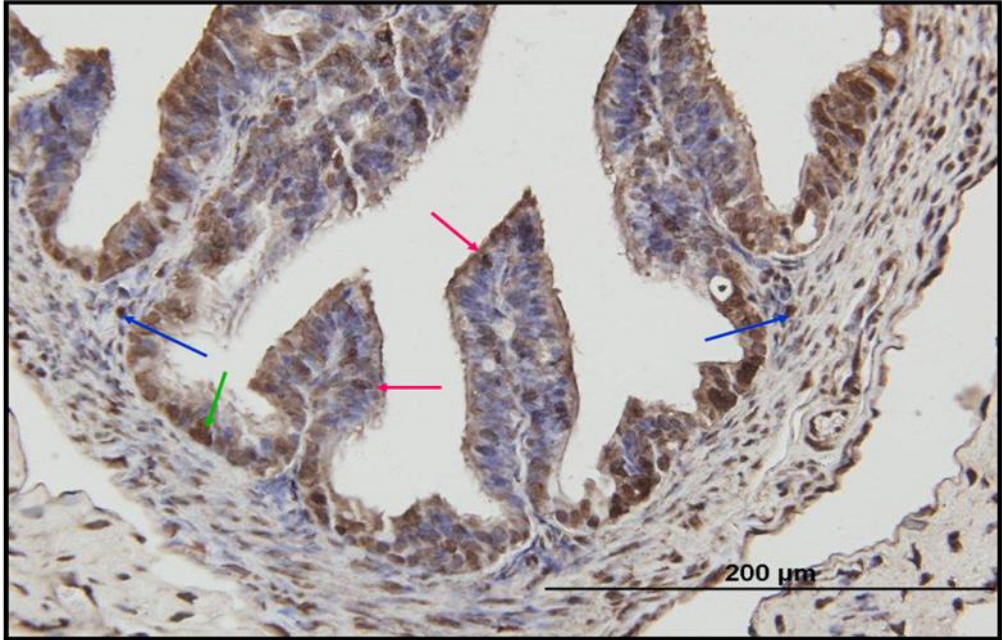
Resim 15. TUNEL boyaması yapılan Acetyl L-Carnitin grubunda özellikle epitel kıvrımlarının derin kısımlarında gözlenen az sayıda TUNEL pozitif hücreler (siyah oklar). (DAB&Hematoksilen)



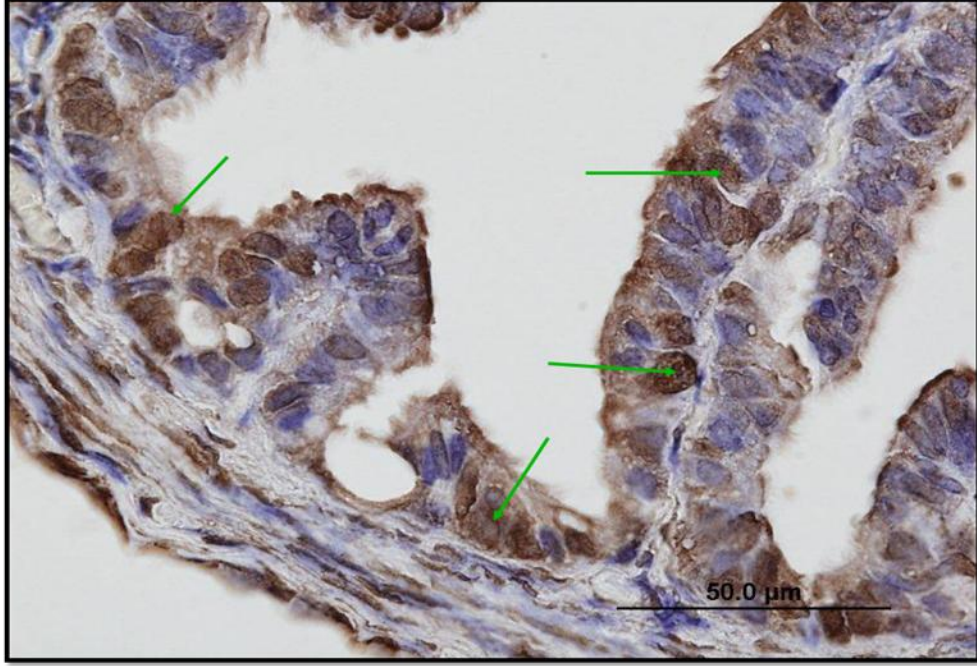
Resim 16. TUNEL boyaması yapılan Acetyl L-Carnitin grubunda az sayıda TUNEL pozitif hücreler (siyah oklar). (DAB&Hematoksilen)



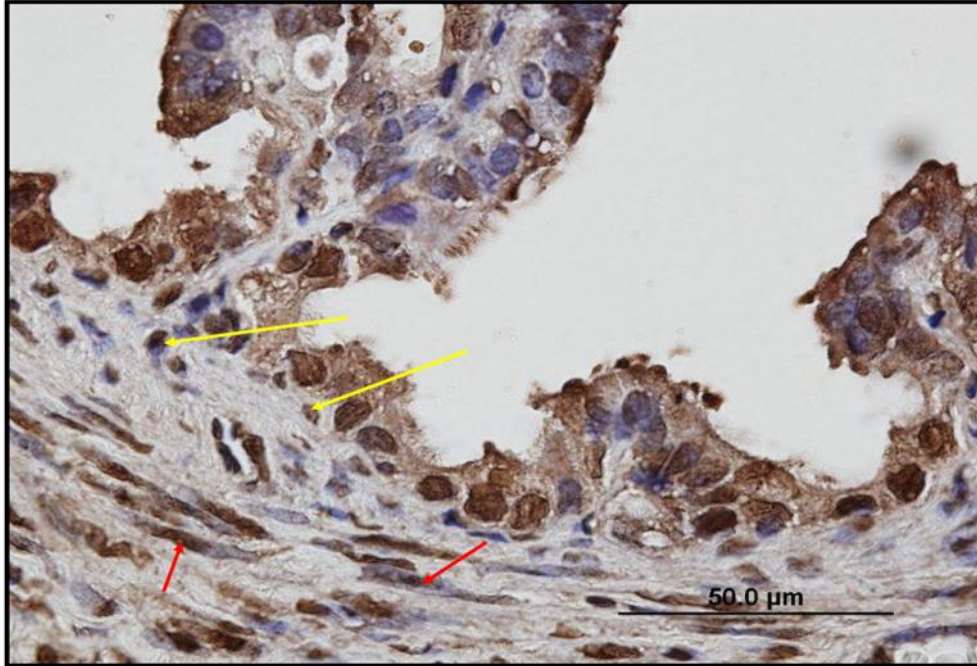
Resim 17. TUNEL boyaması yapılan Cisplatin grubunda küçük büyültmede bir görünüm. (DAB&Hematoksilen)



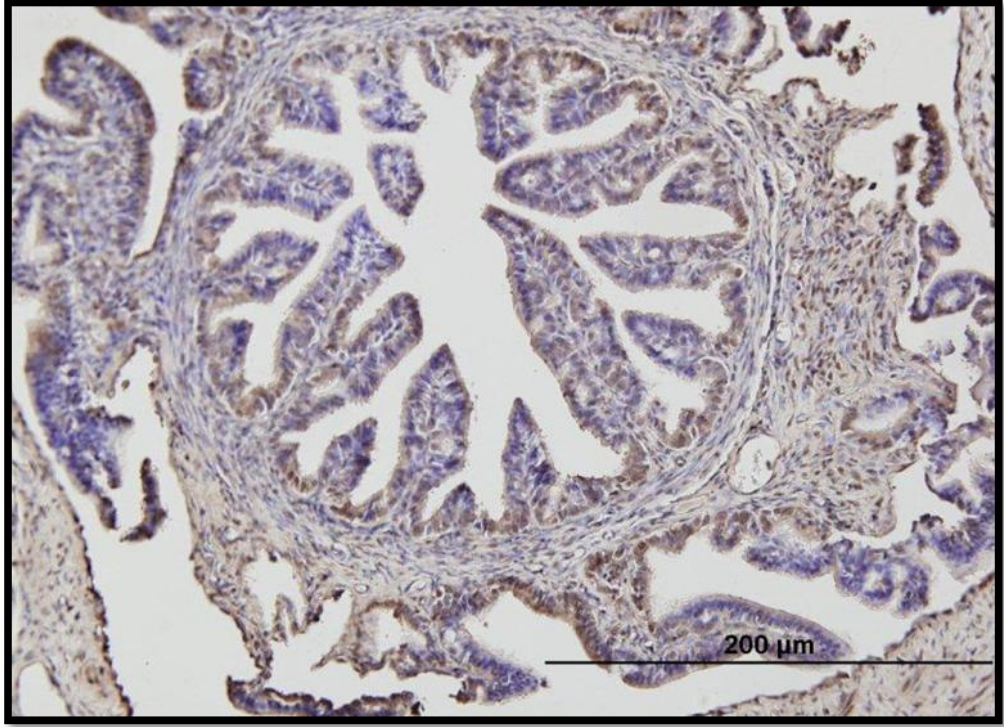
Resim 18. TUNEL boyaması yapılan Cisplatin grubunda daha büyük büyültmede epitel kıvrımlarının üst kısımlarında TUNEL pozitif hücreler (pembe oklar), derin kısımlardaki pozitif epitel hücreleri (yeşil oklar), pozitif bağ doku hücreleri (mavi oklar) gözleniyor. (DAB&Hematoksilen)



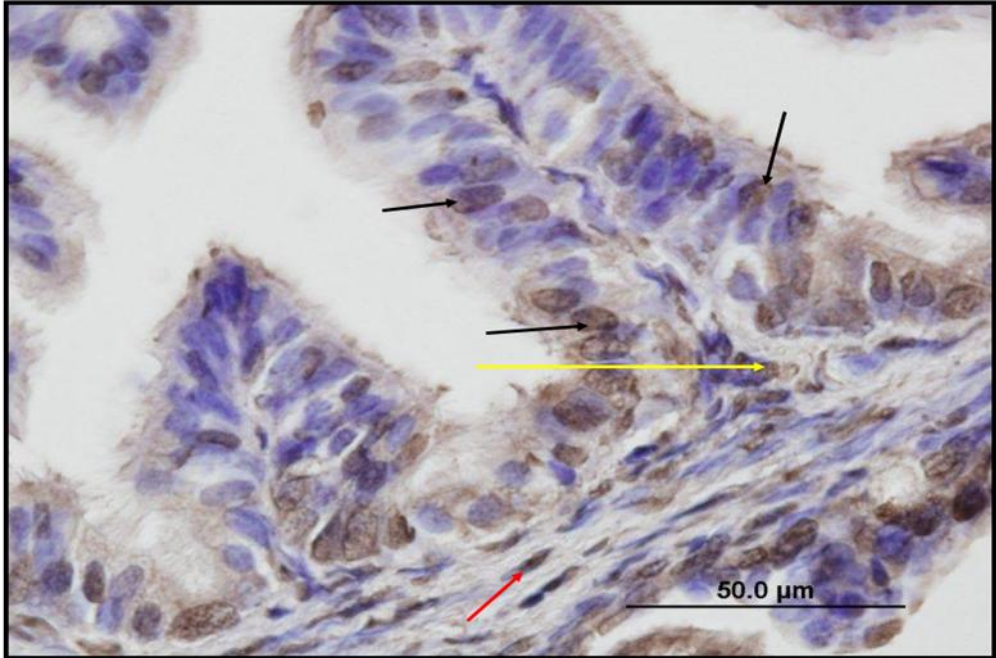
Resim 19. TUNEL boyaması yapılan Cisplatin grubunda daha büyük büyültmede görüntülenmiş tuba uterina epitelinde pozitif hücreler (yeşil oklar). (DAB&Hematoksilen)



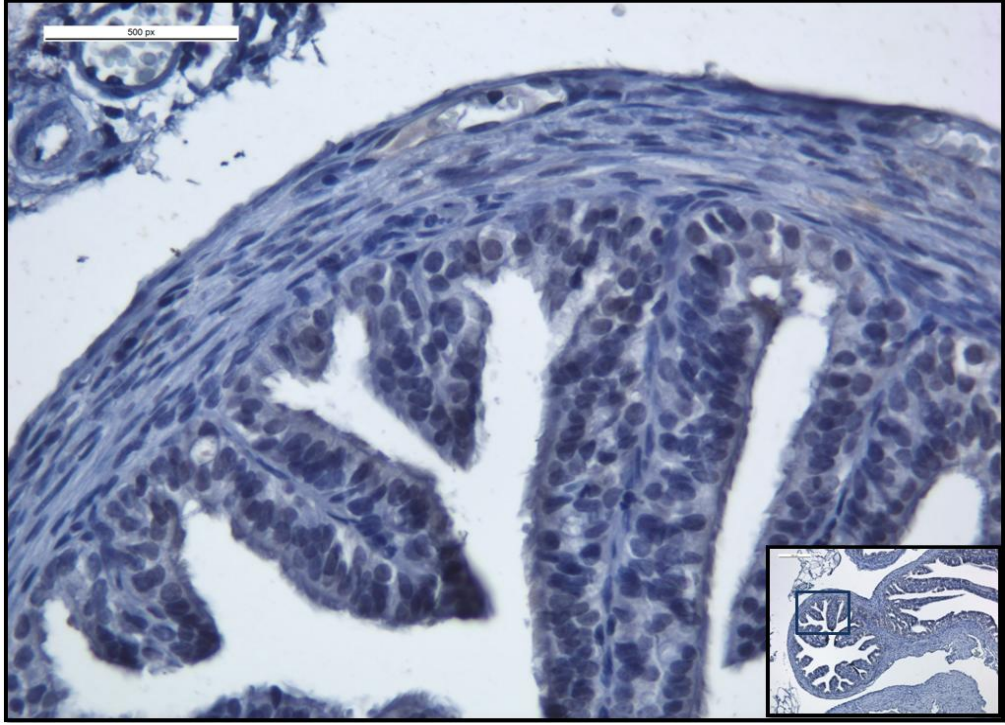
Resim 20. Cisplatin grubunda çok sayıda TUNEL pozitif bağ dokusu hücreleri (sarı oklar) ve düz kas hücreleri (kırmızı oklar). (DAB&Hematoksilen)



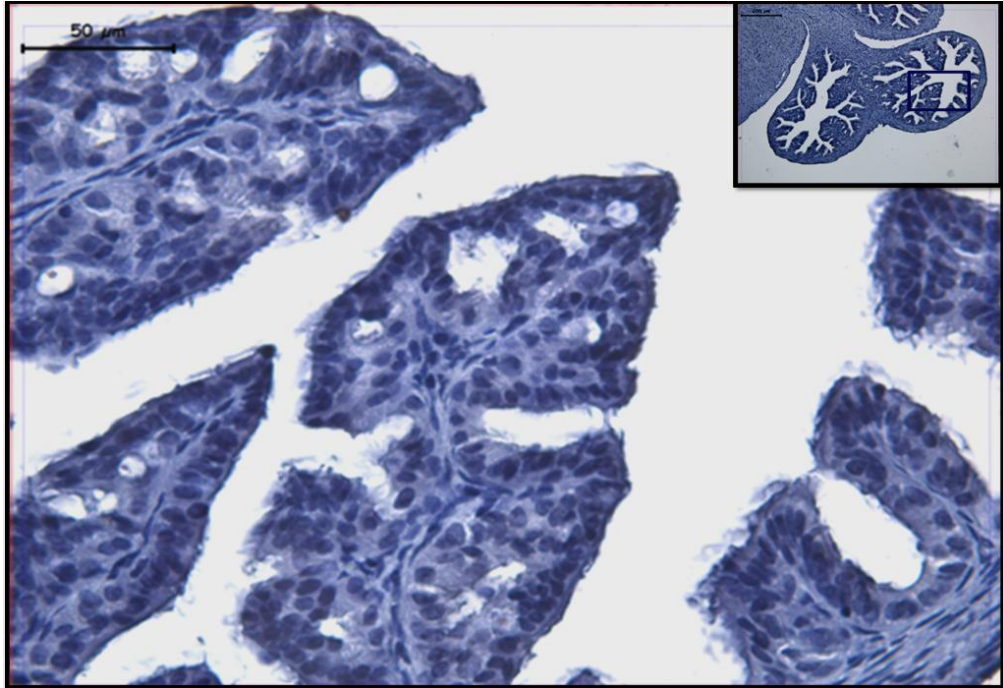
Resim 21. TUNEL boyaması yapılan Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubundan küçük büyültmede bir görünüm. (DAB&Hematoksilen)



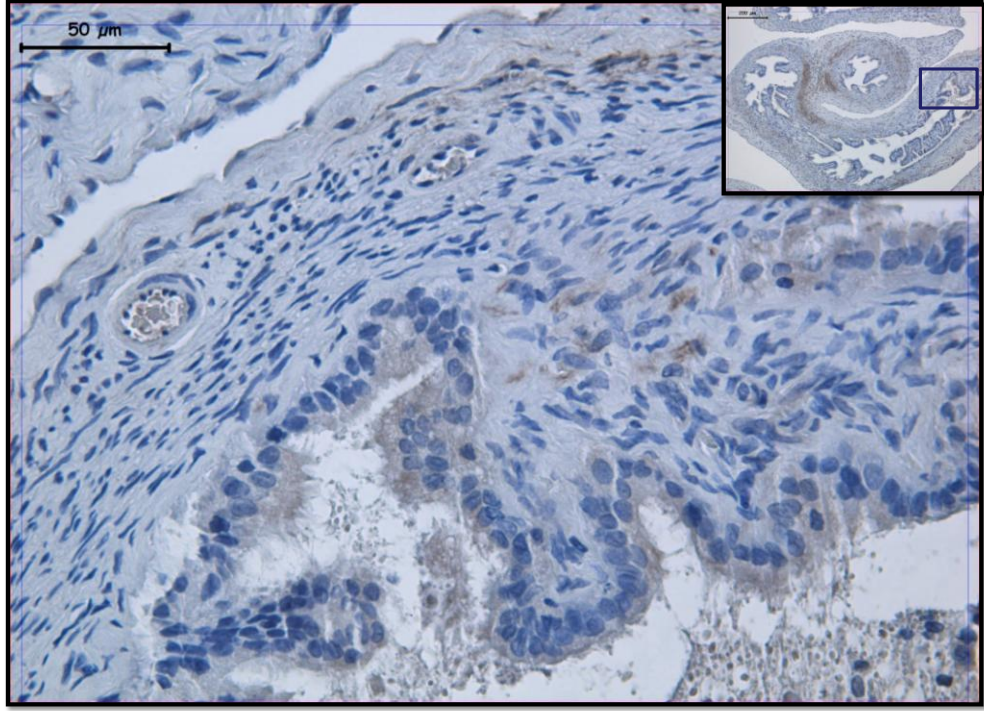
Resim 22. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda büyük büyültmede TUNEL pozitif epitel hücreleri (siyah oklar), bağ doku hücreleri (sarı oklar) ve düz kas hücreleri (kırmızı oklar). (DAB&Hematoksilen)



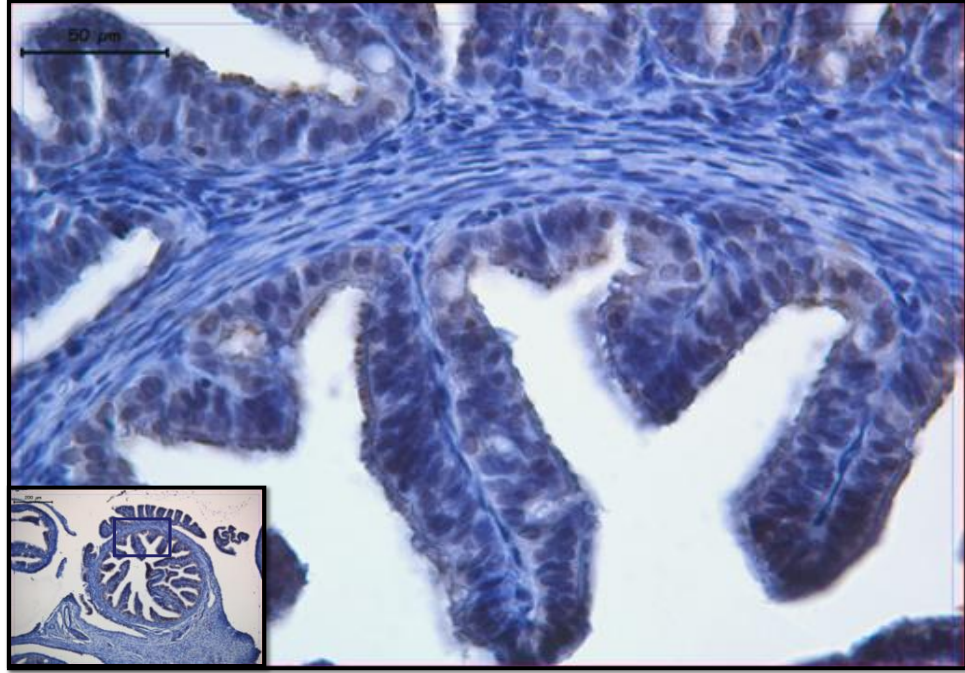
Resim 23. Caspase 8 immünişaretlemesi yapılan kontrol grubu.
(DAB&Hematoksilen)



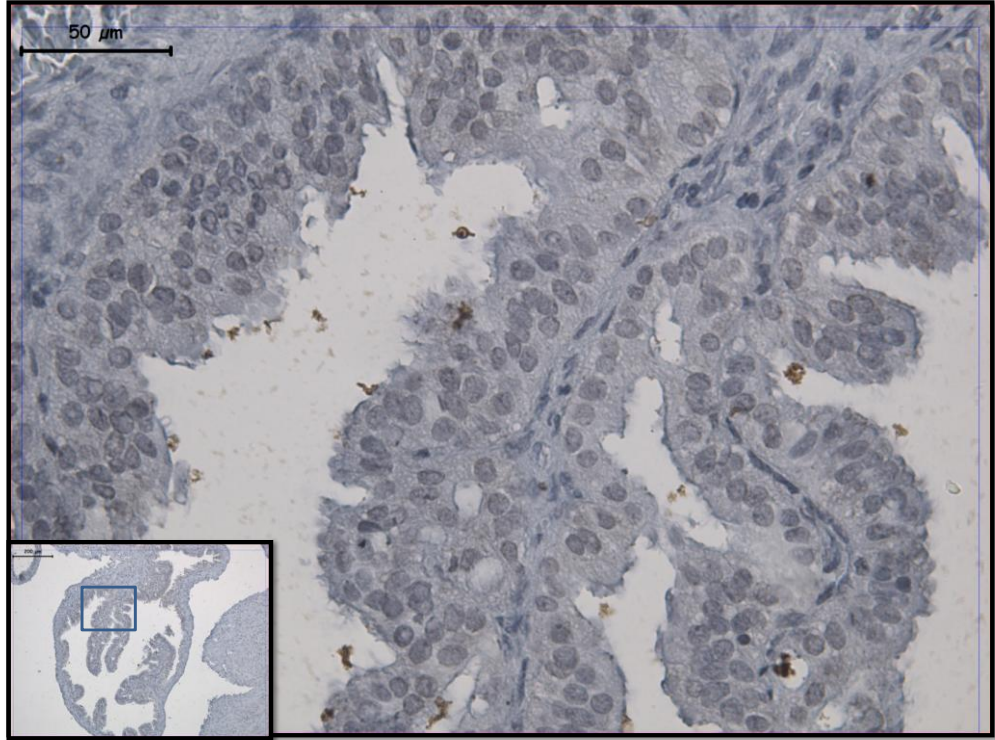
Resim 24. Caspase 8 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin grubu.
(DAB&Hematoksilen)



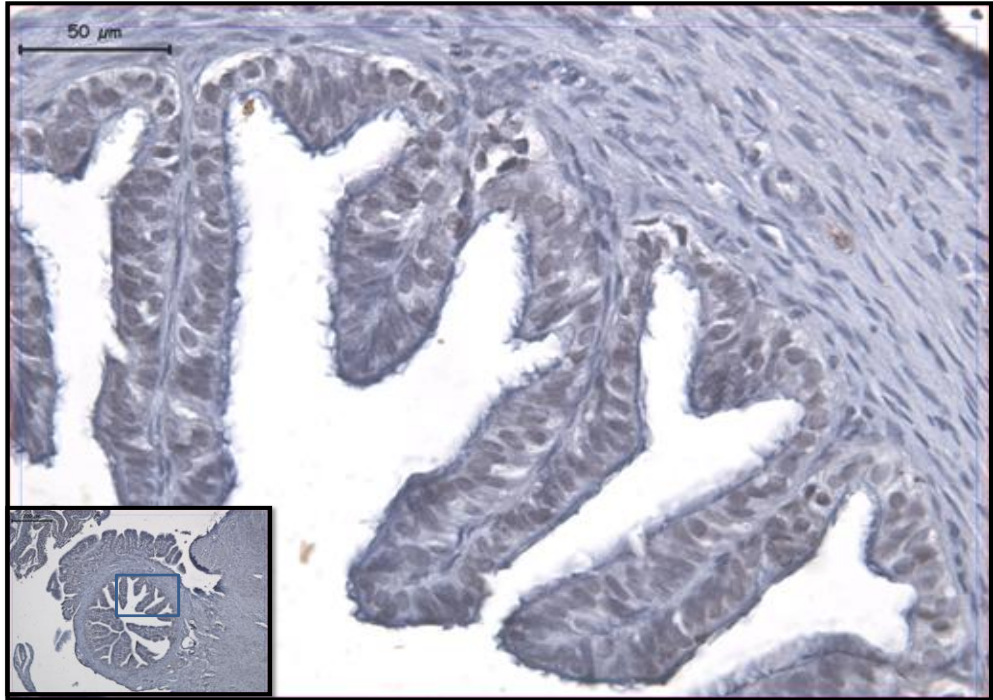
Resim 25. Caspase 8 immünişaretlemesi yapılan Cisplatin grubu. (DAB&Hematoksilen)



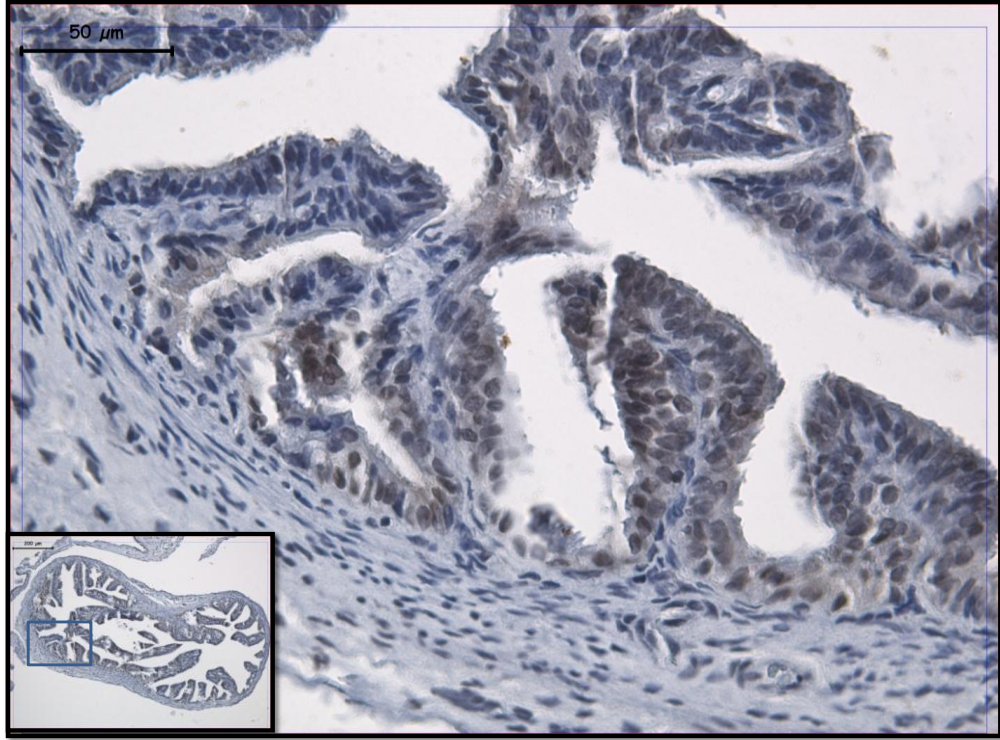
Resim 26. Caspase 8 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu. (DAB&Hematoksilen)



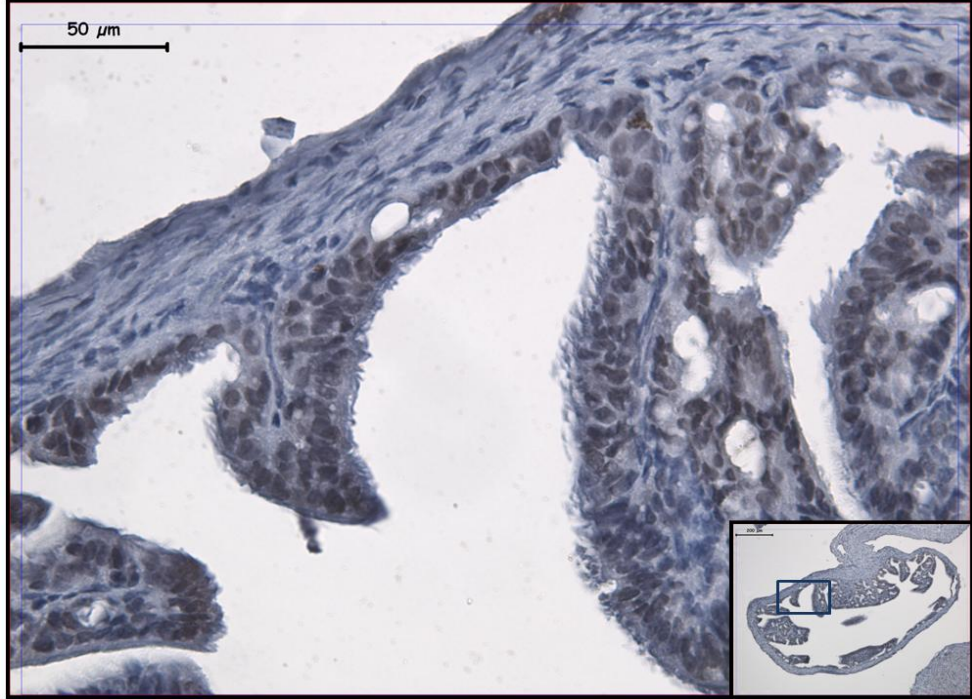
Resim 27. Caspase 9 immünişaretlemesi yapılan kontrol grubu.
(DAB&Hematoksilen)



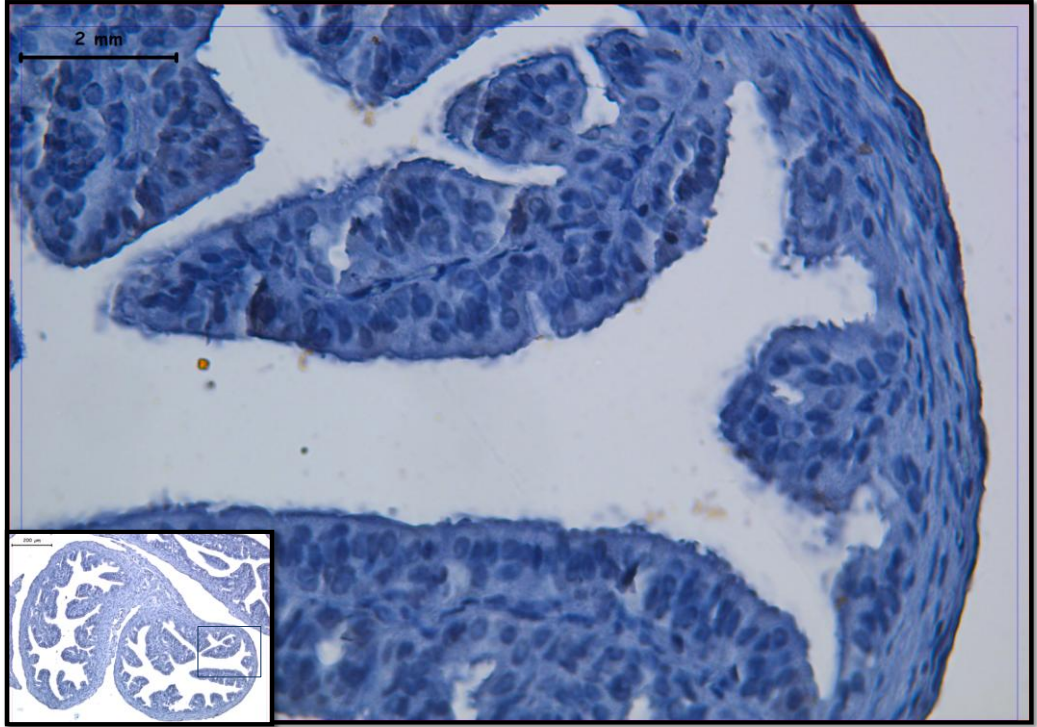
Resim 28. Caspase 9 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin grubu.
(DAB&Hematoksilen)



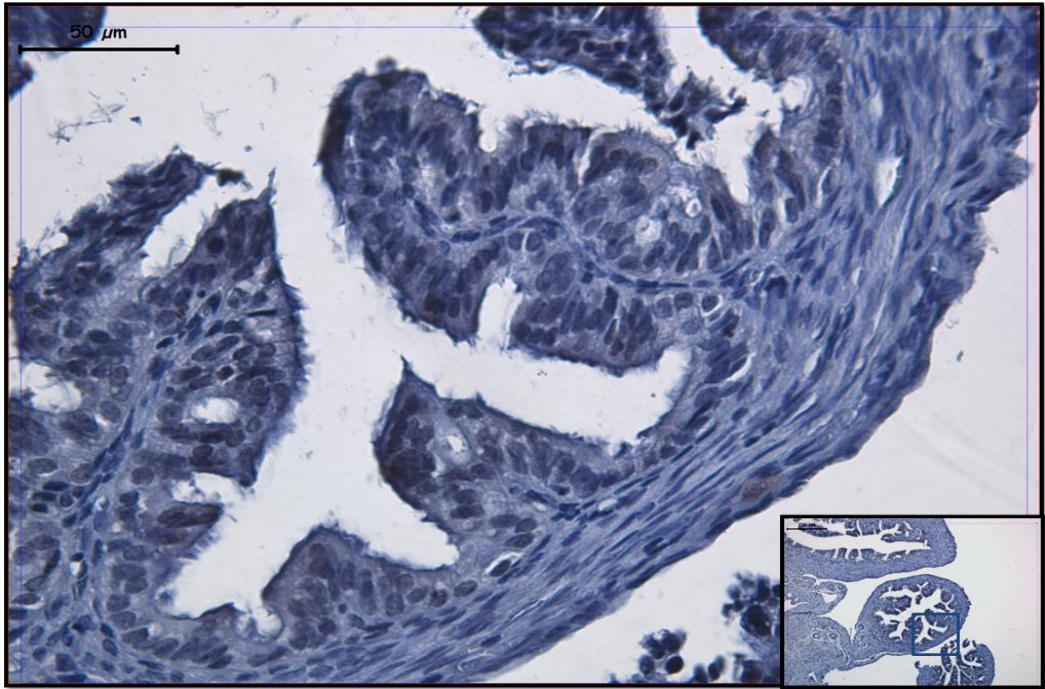
Resim 29. Caspase 9 immünişaretlemeesi yapılan Cisplatin grubu. (DAB&Hematoksilen)



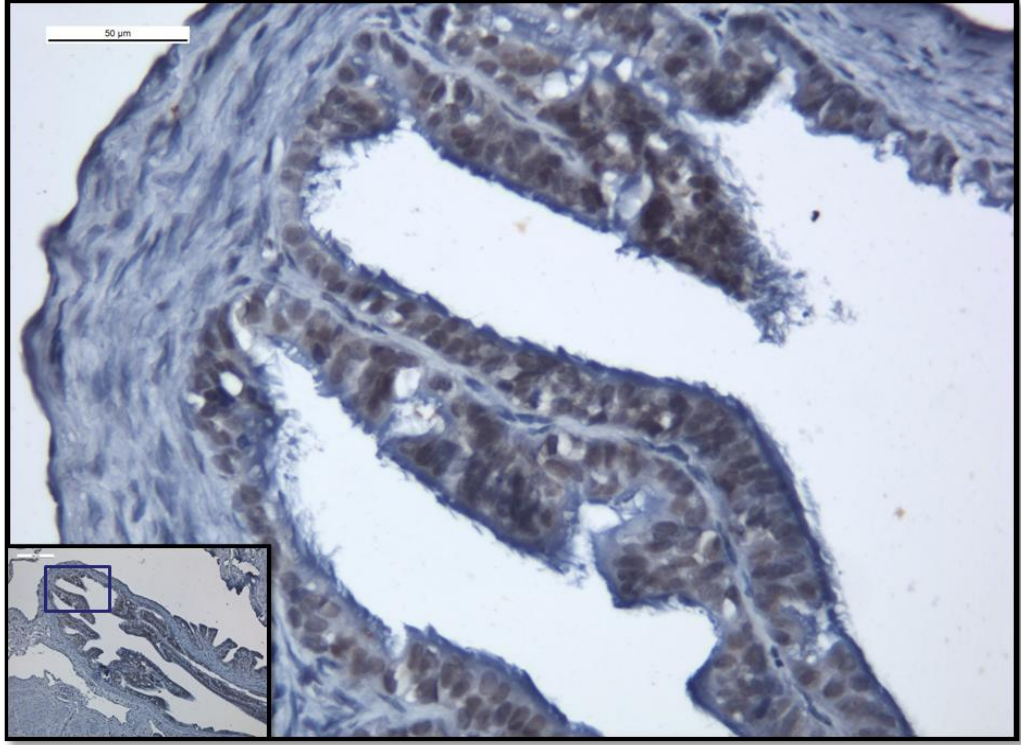
Resim 30. Caspase 9 immünişaretlemeesi yapılan Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu. (DAB&Hematoksilen)



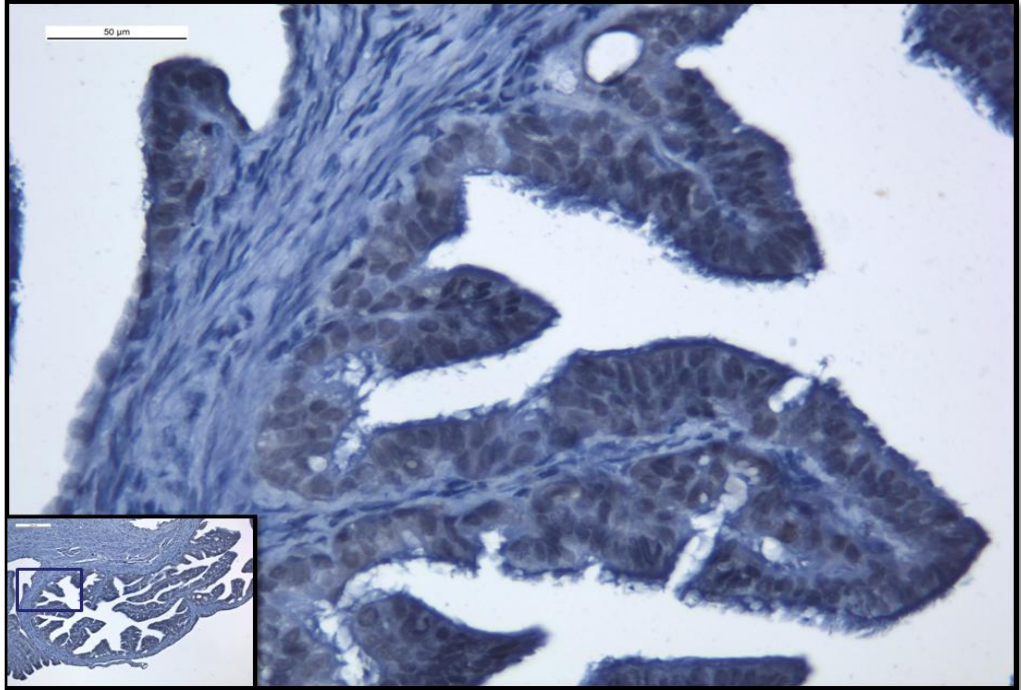
Resim 31. Caspase 3 immünişaretlemesi yapılan kontrol grubu.
(DAB&Hematoksilen)



Resim 32. Caspase 3 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin grubu.
(DAB&Hematoksilen)



Resim 33. Caspase 3 immünişaretlemesi yapılan Cisplatin grubu. (DAB&Hematoksilen)



Resim 34. Caspase 3 immünişaretlemesi yapılan Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubu. (DAB&Hematoksilen)

5. TARTIŞMA

Son yıllarda kanser oranlarındaki artışa bağlı olarak, kanser ile mücadelede umut verici tedavi yöntemleri gelişmektedir. Kanser insidansındaki artışa bağlı olarak gelişen tedavi modelleri sayesinde, sağkalım oranları da her geçen gün artmaktadır.

Kemoterapi, günümüzde kanseri önlemede en umut verici tedavi yöntemlerinden biridir. Modern kanser tedavisinin temelini oluşturan çok sayıda kemoterapötik ajan bulunmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar sayesinde kansere bağlı ölüm oranlarında azalma gözlenirse de, uzun dönem sağ kalımlarda, büyüme problemleri, kardiyovasküler problemler, nöronal gelişimsel problemler, ikincil malign tümörler gibi yaşam kalitesini etkileyen çok ciddi endikasyonlar gözlenmiştir.^{10,12}

Cisplatin, klinik olarak etkinliği kanıtlanmış, çeşitli tümöral tedavilerde sıklıkla kullanılan, temel antineoplastik bir ajandır. Oldukça geniş kullanım alanına sahip olan Cisplatin; ürogenital sistem kanserleri, santral sinir sistemi tümörleri, ilerlemiş yumurtalık kanserleri, nonseminomatöz testis tümörleri, mesane, prostat, serviks, özafagus, meme ve baş-boyun kanserleri gibi erişkin çağda görülen bir çok kanser türünün yanı sıra, nöroblastom, Wilms tümörü, hepatoblastoma, beyin tümörleri, germ hücreli tümör, osteosarkom gibi pek çok çocukluk çağı tümörünün de tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.^{15,165}

Cisplatin, hücre içi birçok sinyal ileti yolağını aktive ederek apopitoz, nekroz ve inflamasyona neden olarak kanserli hücrelerin çoğalmasını önler. Cisplatin ile tümör hücreleri tamamen yok edilip, büyüme ve çoğalmalarının engellenmesi hedeflense de normal hücre ile tümör hücreleri arasındaki yapısal benzerlikten dolayı sağlıklı hücrelerin de hasarlanmasına ve ciddi toksisite ile karşılaşılmasına neden olmaktadır.⁹

Son yıllarda onkolojik tedavi yöntemlerindeki ilerlemeler kanser hastalarında sağ kalımı uzatmakla birlikte, hem erken dönem hem de geç dönem toksisitelerin görülme sıklığını da arttırmıştır.

Oksidatif hasar, hipoksi ve mitokondriyal hasar Cisplatin toksisitesinin patogenezinde yer alan önemli olaylardandır. Kısmi gonadotoksik olduğu belirtilen Cisplatinin, birçok sistem üzerinde yan etkisi olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Nefrotoksisite, nöropati, ototoksisite ve gonadotoksisite Cisplatin'in kullanımını sınırlayan klinik açıdan önemli doz sınırlayıcı yan etkilerdir.¹⁵ Cisplatin toksisitesinin gelişmesinde reaktif oksijen radikallerinin (ROS) oluşumu ve mitokondriyal oksidatif hasarın rol oynadığı belirtilmektedir.¹⁶

Cisplatin antitümör aktivitesini, DNA ile etkileşime girerek gösterir. Cisplatinin az miktarı bile DNA ile etkileşime girerek DNA replikasyonunu engelleyebilir. DNA hasarını takiben hücreler ya kendini yeniler ve hücre döngüsüne devam eder ya da kendini yenileyemez ve hücre ölümü gözlenir. Cisplatin DNA da hasara neden olarak diğer kemoterapik ajanlar gibi apopitozu indükler.^{64,166}

Cisplatin toksisitesine karşı pek çok strateji geliştirilmiş, eş zamanlı olarak koruyucu ajan takviyesiyle Cisplatinin yan etkilerini önleyici pek çok çalışma yapılmıştır. Özellikle Cisplatinin neden olduğu serbest oksijen radikallerinin artışına karşın, serbest radikal temizleyicilerinin deneysel ve klinik kullanımının etkinliğini gösteren çalışmalardan özellikle önemi anlaşılan antioksidanlar son zamanlarda en yaygın yapılan çalışmalar arasına girmiştir.^{181,182} Maliyeti yüksek olan gonad ya da gamet kriyoprezervasyonu gibi çeşitli yöntemlere karşın alternatif bir metod oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın hedeflerinden biri, çeşitli organlarda toksik etkileri belirlenen cisplatinin tuba uterina üzerindeki etkilerini ortaya koymaktır.

Özellikle son on yılda yapılan çalışmalar oksidatif stresin Cisplatin nefrotoksitesinde önemli bir rolünün olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle çeşitli antioksidanların Cisplatin nefrotoksitesindeki koruyucu etkinliği araştırılmıştır. Vitamin E ¹⁸³ ve kafeik asit fenetil ester (CAPE) ¹⁸⁴ gibi antioksidan özelliği olan maddelerin Cisplatin nefrotoksitesindeki olumlu etkilerinin gösterilmesi diğer antioksidanların da etkinliğinin araştırılacağı çalışmaların önünü açmıştır.

Shimeda ve ark. ratlarda Cisplatine bağlı nefrotoksititeyi önlemede diyetteki antioksidanlardan kapsaisinın etkinliğini araştırdıkları çalışmada, Cisplatini intraperitoneal 5 mg/kg tek doz vererek nefrotoksitite oluşturmuşlardır.¹⁶⁷ Dickey ve ark. yaptıkları çalışmada, Cisplatin nefrotoksitesine karşı N-acetylsistein ve sodyum tiosülfatın etkinlikleri

araştırılmış, Cisplatin 10 mg/kg intraperitoneal tek doz uygulaması ile oluşturulan nefrotoksisiteyi 3. günde yapılan sakrifikasyon ile araştırılmışlardır.¹⁶⁸

L-Carnitin ve türevlerinin önemli bir özelliği antioksidan aktivite göstermeleridir. Yapılan çalışmalarda serbest radikalleri temizleyerek hücreleri reaktif oksijen türlerinden koruduğu bildirilmiştir.¹³⁹

Acetyl L-Carnitin serbest yağ asitlerini sitoplazmadan mitokondriye taşıyarak yağ asitlerinin beta oksidasyonla acetyl-KoA'ya dönüşmesini sağlar. KoA'nın TKA döngüsüne katılmasıyla bu reaksiyon için gerekli oksijen büyük oranda ortamdan uzaklaştırılır ve ATP üretilir. Bu döngünün sonunda oksijen suya indirgenerek serbest oksijen oranı düşer ve reaktif oksijen türleri oluşumu azaltılmış olur.^{82,83,139,162}

Acetyl L-Carnitin, bir antioksidan olarak antioksidan savunma mekanizmasında görevli SOD, GPx ve katalaz gibi enzimlerin aktivitelerini korur. Ayrıca yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan bozuklukları en aza indirdiği saptanmıştır.^{163,139} Yapılan bir çalışmada, L-Carnitin nitrikoksit miktarını, hücre solunumu düzenlediği belirtilmiştir.¹⁶⁴ Carnitin türevlerinin enerji üretimine aracılık eden molekülleri oksidatif hasardan koruduğu ve hasarlı biyomoleküllerin tamirine yardımcı olduğu bilinmektedir. L-Carnitin, lipid peroksidasyonunu indükleyen demir iyonlarının miktarını azaltmaktadır.¹⁴⁹

Acetyl L-Carnitin, glutasyonu arttırıp, yağ asitlerinin peroksidasyonu ile son ürün olarak meydana gelen MDA'nın oranını

düşürerek lipidler üzerinde koruyucu etki yapar.¹⁵⁹ Ayrıca Acetyl L-Carnitin'in ksantin oksidazı kısmen inhibe ettiği, buna bağlı olarak oksidatif hasarı engellediği gösterilmiştir.¹⁴⁹

Yakın bir zamanda yapılan bir çalışmada deneysel karaciğer zedelenmesi modelinde L-Carnitin'in hem inflamasyon hem de oksidatif strese karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir.¹⁸⁶ Yine bir başka sıçan çalışmasında L-Carnitin, serbest radikallere bağlı lipid peroksidasyonunu azaltmış ve mitokondrial antioksidanları arttırmıştır.¹⁸⁷

Sayad-Ahmed ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, D-Carnitin verilerek Carnitin eksikliği oluşturulan ratlara Cisplatin verildiğinde nefrotoksisitenin çok daha ağır şekilde ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu çalışmada Cisplatinin, böbrek dokusunda hücreleri sitotoksiteden koruyan glutatyon (GSH) düzeylerinde ve total Carnitin düzeylerinde önemli ölçüde düşüşe sebep olduğu vurgulanmıştır.¹⁸⁸

Carnitin'in bazı dokulardaki radyoprotektif etkisi çeşitli hayvan deneyleriyle gösterilmiştir. Dökmeci ve arkadaşlarının çalışmasında, yetişkin ratlara Carnitin 50 mg/kg gavaj yolu ile 15 gün verilmiş ve ardından tek fraksiyonda 8 Gy tüm vücut ışınlaması yapılmıştır. Bu çalışmada Carnitin'in radyoterapi etkisi ile oluşan plazma ve karaciğer malondialdehid seviyesindeki artışı, karaciğerdeki glutatyon seviyesindeki azalmayı, eritrositlerdeki süperoksid dismutaz ve katalaz seviyelerindeki azalmayı ve kemik iliğindeki olumsuz etkileri önlediği gösterilmiştir.¹⁸⁹

Thangasamy ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada yaşlanmış ratlara L-Carnitin verilmesi hücredeki DNA, protein, lipid gibi makro molekülleri oksidatif strese karşı korumaktadır. Bu etkiyi SOD, CAT ve glutatyon seviyelerini arttırarak ve inflamasyonun bir göstergesi olan lipid peroksit seviyelerini azaltarak gerçekleştirmektedir.¹⁹¹

Bir çalışmada Acetyl L-Carnitin yüklemesinin periferik kanda lenfosit proliferasyonunu arttırdığı ve periferik kan lenfositlerini hücreler tarafından açığa çıkarılan oksidatif stresten koruduğu gösterilmiştir.¹⁹⁴

L-Carnitin ve türevlerinin oksidatif stresi engellediği, mitokondriyal toksik ajanlara karşı koruyucu etki sağladığı, süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin yanı sıra katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerinde de koruyucu rol oynayarak güçlü bir antioksidan ve serbest radikal çöpçüsü olduğu yapılan birçok çalışmada kanıtlanmıştır.¹⁶³ Bu özelliklerine ek olarak yağ asitlerinin beta oksidasyonunu hızlandırarak uzun zincirli yağ asitlerinin toksik etkilerini azalttığı bilinmektedir. Serbest uzun zincirli yağ asitlerinin neden olduğu mitokondriyal işlev bozukluğunun Carnitin tarafından engellendiği ve Carnitinin birçok hücre tipinde mitokondriyal membran geçirgenliğindeki değişiklikleri ve apoptozu güçlü olarak önlediği gösterilmiştir.¹⁹⁰

Cisplatine bağlı böbrek ve ince bağırsak hasarı gelişimi üzerine L-Carnitinin etkisi araştıran bir çalışmada, carnitinin renal proksimal tübül hücre mitokondrilerine etki ederek, burada görülen oksidatif hasarlanma ve buna bağlı gelişen hücre ölümünün inhibe ettiği ve böylece nefrotoksisite gelişimini azalttığı belirlenmiştir. Aynı çalışmada, L-

Carnitinin Cisplatinin anti-tümoral etkilerine ise ek katkı sağlamadığı bildirilmiştir.¹⁹⁰

Aleise ve arkadaşları L-Carnitin ile Cisplatine bağlı nefrotoksisite arasındaki ilişkiyi toplam 40 rattan oluşan denek grubunda araştırdıkları çalışmada; Cisplatin sonrası böbrek dokusunda total nitrat\nitrit düzeylerinde artış, total Carnitin düzeylerinde ise azalma olduğunu, L-Carnitin uygulanması ile Cisplatine bağlı gelişen glomerüler ve tübüler hasarlanmada istatistiksel olarak anlamlı derecede düzelme olduğunu bildirmişlerdir.¹⁹⁸

Bu çalışmanın bir diğer hedefi, tuba uterineda toksik etkilerini belirlediğimiz cisplatine karşı acetyl L-carnitinin koruyucu etkilerini ortaya koymaktır.

Çeşitli çalışmalarda, Cisplatin ile beraber antioksidan alan gruptaki sıçanların kiloları antioksidan almayan gruptaki sıçanlar ile karşılaştırıldığında, antioksidan almayan grubun başlangıç kilolarında antioksidan alan gruptan anlamlı düzeyde daha fazla azalma olduğu belirtilmektedir. Shimeda ve arkadaşları, sıçanlarda Cisplatine bağlı nefrotoksisiteyi önlemede diyetteki antioksidanlardan kapsaisinin etkinliğini araştırdıkları çalışmada, sadece Cisplatin verilen grubun kilo kaybının Cisplatin+kapsaisin ve sadece kapsaisin verilen gruptan daha fazla olduğunu saptanmışlardır.¹⁶⁷

Bu çalışmada da, ratların deney öncesi ve deney sonrası ağırlık ortalamaları alındı. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede

kontrol grubu ve Acetyl L-Carnitin grubu deneklerin deney süreci sonunda kilo aldığı, Cisplatin ve L-Carnitin+Cisplatin gruplarındaki ratların ağırlık ortalamasının ise deney başlangıcına göre azaldığı belirlendi. Ancak Cisplatin grubundaki kilo kaybı Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubuna göre daha fazlaydı.

Braw ve arkadaşları Siklofosfamid ile tedavi edilen hastalardan alınan ovaryum biyopsilerinde folliküllerin azaldığını göstermişlerdir.¹⁷⁰ Ataya ve arkadaşları Siklofosfamid enjeksiyonundan sonra her ovaryum için granüloza hücre sayısında ve follikülerin ortalama çaplarında istatistiksel olarak belirgin bir azalma saptamışlardır.¹⁷¹ Ayrıca Siklofosfamid'in insan granüloza hücrelerindeki steroid üretimini azalttığını göstermişlerdir. Bu nedenle de granüloza hücrelerinin ovaryum toksisitesinde önemli hedef yapılar olarak kabul edildiklerini savunmuşlardır. Siklofosfamid, endometriyal hücreler gibi hızlı bölünen hücrelerde ise mitoz bölünmeyi azaltıcı etki göstermektedir. Bu nedenle endometriyum ve uterus kalınlığında bir azalma ortaya çıkmaktadır.²⁰⁰

Yapılan bir çalışmada, Siklofosfamid uygulaması yapılan grupların tuba uterina duvar kalınlığı ortalaması kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirtilmiştir.⁵⁷ Aynı çalışmada, uterus duvar kalınlığı siklofosfamid uygulaması yapılan gruba göre siklofosfamid beraberinde C vitamini, E vitamini ve selenyum uygulaması yapılan gruplarının uterus duvar kalınlığı ortalaması daha yüksek bulunmuştur.⁵⁷

Bu çalışmada da, Cisplatin grubu tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı ortalamaları diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı olarak incelenmiştir. Ancak Acetyl L-Carnitin+Cisplatin

pretedavi grubunda duvar ve epitel kalınlık ortalamaları kontrol ve yalın Acetyl L-Carnitin grubuna göre daha ince olmakla birlikte Cisplatin grubuna göre kalındı.

Yeter Topçu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmaya göre Gama radyasyonu uygulamasını takiben L-Carnitin'in germ-hücre azalmasını minimize ettiği belirtilmiştir. Ayrıca L-Carnitin'in rat testislerinde hücrelerin morfolojik hasarlarını azalttığı belirtilmiştir. Morfolojik analizlerde Gama radyasyonu uygulanmış testislerde germ hücrelerinde düzensizlik ve azalma, spermatogeneziste duraksama ve germinal epitelde vakuolizasyon gözlenmişken L-Carnitin uygulamasından sonra radyoterapinin neden olduğu hasara karşı koruduğu saptanmıştır.¹⁹⁷

Son yıllarda bilinen L-Carnitin'in bu kuvvetli antioksidan özelliği yanında antienflamatuvar etkisinin de bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır. Shekhawat ve arkadaşları yaptıkları çok yeni bir çalışmada, Carnitin transporter gen mutasyonu (OCTN1 -/- ve OCTN2 -/-) bulunan ratlarda tüm barsak boyunca makrofaj ve lenfosit infiltrasyonunda belirgin bir artış olduğunu histopatolojik olarak ortaya koydular.¹⁹² Rat modellerinde L-Carnitin'in bir lipid peroksidasyonu ve inflamasyon göstergesi olan MDA'yı düşürerek, aynı zamanda nötrofil infiltrasyonunu azaltarak antienflamatuvar etkili bir ajan olduğu ortaya koyulmuştur.^{186,193} Bu çalışmanın bir diğer bulgusu, hiperoksiye maruz bırakılan ratların akciğer dokusundaki fibrozisi azaltmış olmasıdır. L-Carnitin bu etkilerini antioksidan özelliğiyle veya direkt antienflamatuvar özelliği ile inflamasyonu azaltmak ve sonuçta fibrozisi azaltmak şeklinde göstermiş olabilir.

Bu çalışmanın histolojik bulguları Cisplatinin ve Acetyl L-Carnitin+Cisplatin gruplarında intraepitelial lenfositik infiltrasyonun varlığını ortaya koydu. Ancak Cisplatin grubunda gözlenen subepitelial hemoraji Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda gözlenmedi.

Cisplatin tedavisinin yan etkilerini azaltmak amacı ile çeşitli yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bunların içinde en çok araştırılanlar antioksidan ajanlardır. Cisplatinin serbest radikal yolu ile sebep olduğu toksik etkileri, antioksidan kullanımı ile bir ölçüde azaltılabilecek ve böylece hastaların hayat kalitesini ve Cisplatinin tedavi doz yoğunluğunu arttırılabilmek imkanı sağlayabileceklerdir.⁸⁶

Serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlarına engel olmak için antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Serbest radikaller antioksidan savunma sistemleri ile dengede tutulurlar ve normal şartlar altında organizma kendini antioksidan mekanizmalarla korur. Fakat bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez. Böyle durumda yani, oksidan-antioksidan dengenin oksidan lehine bozulması durumunda hücre ve doku hasarı meydana gelmekte ve oksidatif stres ilişkili hastalıklar oluşmaktadır. SOD, CAT, GPx gibi enzimler ve GSH gibi enzim olmayan antioksidanlar antioksidan savunma sistemini oluştururlar ve hücreleri oksidatif zedelenmeden korurlar.

Antikanserojen ajanların pek çoğu, oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengeyi bozarak, çeşitli organ ve dokularda toksisiteye neden olmaktadır. Özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar, oksidatif stresin Cisplatin toksisitesinde önemli bir rolünün olduğunu ortaya koymuştur. Bu

nedenle çeşitli antioksidanların Cisplatin toksisitesindeki koruyucu etkinliği araştırılmıştır.

Clerici ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; Cisplatinin, OH ve diğer serbest radikallerin artışına neden olduğu¹⁷⁶, yine benzer şekilde, Sasada ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise; peroksit radikallerinin artışına neden olduğu bildirilmiştir.¹⁷⁷

Sıçanlarda yapılan in-vivo çalışmalarda siplatinin SOD ve GSH-Px gibi bazı antioksidan enzimlerin aktivitelerini düşürerek, reaktif oksijen türlerini yakalamakla görevli olan GSSH' nin seviyesini de azalttığı gösterilmiştir. Artan reaktif oksijen türleri de DNA hasarına ve membranlarda lipit peroksidasyonuna neden olabilmektedir.⁸⁰

Sugiyama ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise Cisplatinin; dokuda SOD, GSH-Px gibi serbest radikal yakalayıcı enzimlerin aktiviteleri ile GSSH'nin düzeylerini azaltırken, O₂ başta olmak üzere oksijen radikallerinin artışına neden olduğu gösterilmiştir.¹⁷⁸

Pratibha ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları 'enzymatic studies of Cisplatin induced oxidative stress in hepatic tissue of rats' başlıklı çalışmalarında Cisplatinin glutatyon peroksidaz ve katalaz aktivitelerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.¹⁷⁹

Avacı ve arkadaşları da 2008 yılında 'Cisplatin causes oxidation in rat liver tissues: possible protective effects of antioxidant food

supplementation' başlıklı çalışmalarında Cisplatinin karaciğer dokusunda oksidasyon reaksiyonlarını hızlandırdığını bildirmişlerdir.¹⁸⁰

Mansour ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları bir çalışmanın sonucunda Cisplatinin yüksek dozlarının karaciğerde toksik etki meydana getirdiğini belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada Cisplatinin karaciğer dokusunda MDA miktarını artırdığını rapor etmişlerdir

Lapointe ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada inek tuba uterinasında östrus döngüsü süresince temel antioksidanlar olan glutatyon-peroksidaz (GPx), superoksid-dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT)'ın mRNA ekspresyonu ve enzimatik aktiviteleri incelenmiştir. İstmusda yüksek düzeyde GPx-3, ampulla ve infundibulumda ise GPx-1 ve GPx-2 eksprese olmuştur. CAT ve SOD ise tuba uterina boyunca eksprese olmuştur. GPx ve katalaz östrus döngüsünün ortasında (10-12.gün) ve sonunda (18-20.gün) yüksek düzeyde eksprese olmuşlardır. SOD ekspresyonu ise tuba uterinada tüm östrus döngüsü süresince sabit kalmıştır. Başarılı bir döllenme ve implantasyonda bu antioksidanların fizyolojik rollerinin önemli olduğu vurgulanmıştır.³⁷

Nazıroğlu ve arkadaşlarının, 'selenium and high dose vitamin E administration protects Cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats' başlıklı makalelerinde Cisplatinin karaciğer MDA miktarında artışa ve glutatyon peroksidaz aktivitesinde azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Vitamin E verilen grupta ise karaciğer MDA miktarının Cisplatin verilen gruba göre daha az olduğunu bildirmişlerdir.¹⁸⁵

Yine Naziroğlu ve arkadaşlarının yaptıkları diğer bir çalışmada selenyum verilmesinin GPx enzim aktivitesini artırdığını ve selenyum verilmesinin Cisplatin nefrotoksitesinde koruyucu etkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Caspase'lara karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılarak, sitoplazmik caspase ekspresyonunun immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmesi, apoptozisin tespitinde sık kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. TUNEL yöntemi ise apoptozis tayininde kullanılan bir diğer yöntemdir. Apoptozisin en önemli özelliği olan DNA fragmentasyonunun, TUNEL yöntemi ile gösterilmeye başlanması, toksisite çalışmalarında bu tekniğin kullanılmasını sağlamıştır. TUNEL apoptozisin erken aşamasındaki apoptotik hücrelerin tanımlanmasını sağlayan özel bir yöntemdir.¹⁷³

Ishii ve arkadaşları 2000 yılında Acetyl-L Carnitin ilavesinin kültüre edilmiş nöronlarda DNA fragmentasyonu ve nükleer kondenzasyonu azalttığını bildirmişlerdir.¹⁹⁵

Sundaram ve arkadaşları ise yaşlı ratların iskelet kaslarında artmış olan DNA tek zincir kırıklarının L-Carnitin uygulaması ile azaltılabileceğini göstermişlerdir. Bunların yanı sıra son çalışmalar ile L-Carnitin, DNA onarıcı enzim ADP-ribozil polimeraz'ın aktivitesini arttırdığını göstermişlerdir.¹⁹⁶

Bu çalışmada DNA fragmentasyonunu tespit etmek için yapılan TUNEL yönteminin sonuçları istatistiksel olarak

değerlendirildiğinde Cisplatin grubunda çok sayıda hücrenin DNA fragmantasyonu gösterdiği; Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavi uygulamasının DNA hasarını kısmen önlediği belirlendi.

Zhang ve arkadaşlarının Balb/c fareler ile yaptıkları çalışmalarında, uyguladıkları Cisplatin sonrasında germ hücrelerinde doza bağlı olarak apoptozisin indüklendiğini belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada Cisplatinin spermatogenik serideki hücrelerin olgunlaşma süreçlerini etkilediği, spermatogenezisi azalttığı ve azospermiye sebep olarak fertilitiyi etkilediklerini gözlemlemişlerdir.¹⁶

Kondo ve arkadaşlarının 1995 yılında yaptıkları bir çalışmada Cisplatine duyarlı ve Cisplatine dayanıklı insan glioblastoma hücrelerinde, Cisplatin ve nifedipinenin kombine uygulamasının indüklediği apoptozu incelemişlerdir. Nifedipine, kalsiyum kanal bloklayıcı (CCBs) sınıfındandır. Nifedipinenin, Cisplatine duyarlı insan glioblastoma U87-MG ve Cisplatine dayanıklı U87-MG-CR hücrelerinde, in vitro ve in vivo şartlarda , Cisplatinin anitümör aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada, normal ekstraselüler Ca yoksunluğunda, nifedipinenin Cisplatinin sitotoksik etkisini artırma yeteneği olduğu saptanmıştır. Yapısal analizlerde, DNA fragmantasyon deneylerinde ve hücre döngüsü deneyleri, Cisplatin ve nifedipine arasındaki sinerjik ilişkinin apoptozla sonuçlandığını göstermiştir.¹⁶⁹

Ormerod ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Cisplatin tarafından gerçekleştirilen hücre ölümünde apoptozun rolü araştırılmıştır. Lösemi hücresi olan L1210 hücrelerinin Cisplatin tarafından öldürülmesi, flow sitometri ve DNA elektroforez yöntemleri kullanılarak incelenmiştir.

100µM doz ilaç uygulamasından 10 saat sonra geniş yayımlı apoptoz indüklenmiştir. Düşük doz ilaç uygulamasında, hücrelerde S evresine yavaş geçiş ve ardından G2 evresinde bloklanma tespit edilmiştir. G2 evresindeki bloklanmadan kurtulan hücreler, hücre döngüsüne devam etseler bile sonunda ölmüşlerdir. Bu bulgular da bize hücrelere uygulanan yüksek doz ilacın, apoptozla hızlıca ölüme gittiğini, düşük doz ilaç uygulamasının da G2 safhasında bloklanmaya ve sonrasında ölümlerle sonuçlandığını göstermektedir.¹⁷²

Alkilleyici tip ajanların oluşturduğu sitotoksitenin en önemli basamağı oositlerde apoptozisin gözlenmesidir. İn vitro yapılan çalışmalarda Cisplatinin apoptozisi artırarak primordial foliküllerde hasara neden olduğu gösterilmiştir. Oosit, granüloza ve teka hücre hasarı, primordial foliküllerde apoptoz kemoterapinin etkileri olarak sıralanabilir.

Over rezervinin en önemli bölümünü oluşturan primordial foliküllerde meydana gelen bu hasarlanma ile ileri dönemde prematür ovaryan yetmezlik gelişimi kaçınılmaz bir sonuç olarak görülmektedir. Her ne kadar over rezervinin önemli bir bölümünü primordial foliküller oluştursa da matür foliküller de ovaryan rezervin oluşmasına katkıda bulunurlar. Kemoterapötik ajanların sitotoksik etkilerinden matür foliküller de etkilenerek over rezervinin azalmasına neden olurlar.

Chapmann ve arkadaşları reproduktif dönemde olan Hodking lenfomalı hastalarda 6 kür uyguladıkları MOPP (mekloreタミン, vinkristine, prokarbazin, prednizolon) rejimi ile hastaların % 40-70'inde prematür over yetmezliği geliştiğini bildirmişlerdir.¹⁷⁴

Kemoterapi sırasında yüksek oranda düzensiz menstruasyon ve amenore oluşur. Antitümöral tedaviden sonra normal menstrüel döngüye yeniden dönen hastalar, foliküllerin zarar görmesine bağlı azalan over rezervlerinden dolayı erken menopoz riski altındadırlar.¹⁷⁵ Kemoterapinin oluşan bu yan etkisi hastalar için ciddi bir sorun oluşturmaktadır. Folikül kaybı ve folikül güçsüzlüğü tedavi öncesi gonad ya da gamet kriyoprezervasyonu gibi çeşitli yöntemlerin ele alınmasını sağlamıştır. Böylece tedavi sonrası fertilitenin yeniden kazandırılmasında umut ışığı olmuştur. Ancak bu tekniklerin maliyetinin fazla olması açısından kullanımı yaygın değildir.

Shao ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada rat tuba uterinalarında, clomifene sitratın (CC) anormal tubal apopitoza ve östrojen reseptör aktivasyonuna neden olduğu belirtilmiştir. Clomiphene sitratın, ovaryumlarda, villuslarda ve desidua dokuda apopitozu arttırdığı belirtilmiştir. Çalışmada in vivo şartlarda, CC'nin kronik uygulanmasının tubal apopitozu intrensek yoldan indüklediği saptanmıştır. Apopitozun özellikle isthmusun epitel hücrelerinde gözlemlendiği ve bu hasarın östradiol (E2) ile tersine çevrilebildiği saptanmıştır. Fakat CC'nin kronik uygulanmasının indüklediği apopitoza karşı, E2'nin önceden uygulanması veya birlikte uygulanmasının tubal koruyucu bir etkisi olmadığı saptanmıştır.¹⁹⁹

Apoptosis, normal ve patolojik süreçlerde hücre ölümünün önemli bir yoludur. Hücre ölüm reseptörlerinin aracılık ettiği ekstrensek yolak, mitokondri üzerinden işleyen intrensek yolak ve Endoplazmik Retikulum (ER) stres yolağı apoptozisteki başlıca yolaklardır. Ekstrensek yolağın aktivasyonu ile aktive hale gelen caspase 8, mitokondriyondan sitoplazmaya sitokrom c salınımını aktive eder ve bir dizi etkileşim sonucu

caspase 9 aktive hale gelir. Caspase 8 ve 9 apoptozda kritik bir role sahip olan caspase 3'ü aktive ederek apoptozisin geri dönüşümsüz olarak başlamasına neden olur.

Jeong Hwan KIM ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları bir çalışmada insan renal epitelyal hücrelerinde decursinin Cisplatinin indüklediği hasara karşı koruyucu etkisi incelenmiştir. Decursin'nin anlamlı derecede Cisplatinin indüklediği hasarı bloke ettiği saptanmıştır. Ayrıca aynı çalışmada decursinin, Cisplatin uygulanan renal epitelyal hücrelerde, caspase 3 ve 9'u baskılayarak, hücre ölümünü inhibe ettiği saptanmıştır. Aynı zamanda Cisplatin uygulanan renal epitelyal hücrelerinde, decursin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidazın aktivitelerini etkili bir şekilde onarmıştır. Bu bulgulara renal epitelyal hücrelerinde decursinin, Cisplatinin indüklediği sitotoksisteyi ve apoptozu antioksidan enzimlerin aktivasyonu ile engellediği saptanmıştır.

Bu çalışmada yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonucu Cisplatinin neden olduğu apoptozun ekstrensek ve intrinsek olarak her iki yolakla da tetiklendiği belirlendi. Ancak Caspase 8 üzerinden tetiklenen apoptoziste Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavisinin etkin olduğu ve ekstrensek yolakla başlatılan apoptotik sürecin engellendiği gözlenirken, caspase 9 üzerinden etkili olan intrinsek apoptoziste Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavisinin etkili olmadığı ve procaspaselerin aktive olduğu ve apoptotik sürecin tamamlandığı belirlendi.

6. SONUÇ

Yapılan değerlendirmelerde ratların deney öncesi ve deney sonrası ağırlık ortalamaları alındı. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede kontrol grubu ve Acetyl L-Carnitin grubu deneklerin deney süreci sonunda kilo aldığı, Cisplatin ve L-Carnitin+Cisplatin gruplarındaki ratların ağırlık ortalamasının ise deney başlangıcına göre kilolarının azaldığı belirlendi. Ancak Cisplatin grubundaki kilo kaybı Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubuna göre daha fazlaydı.

Cisplatin grubu tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı ortalamaları diğer gruplar ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel anlamlı olarak incelmıştır. Ancak Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavi grubunda duvar ve epitel kalınlık ortalamaları kontrol ve yalın Acetyl L-Carnitin grubuna göre daha ince olmakla birlikte Cisplatin grubuna göre kalındı.

Histolojik incelemede Cisplatinin ve Acetyl L-Carnitin+Cisplatin gruplarında intraepitelial lenfositik infiltrasyonun varlığı gözlenirken, Cisplatin grubunda gözlenen subepitelial hemoraji Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda tespit edilemedi.

Tuba uterina epitelinde DNA fragmantasyonunu tespit etmek için yapılan TUNEL yönteminin sonuçları, Cisplatin grubunda çok sayıda hücrenin DNA fragmantasyonu gösterdiğini, Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavi uygulamasının fragmantasyonu önlediğini ortaya koydu.

Cisplatinin neden olduğu apoptotik yolağı ortaya koymak amacıyla uygulanan caspase 8, 9 ve 3 immünohistokimya sonuçları apoptozun ekstrensek ve intrinsek olarak her iki yolla da tetiklendiğini göstermekteydi. Caspase 9 üzerinden etkili olan intrinsek yolla aracılı apoptoziste Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavisinin etkili olmadığı, prokaspazların aktive olarak apoptotik süreci tamamladığı belirlendi. Ancak Caspase 8 üzerinden tetiklenen apoptoziste Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavisinin etkin olduğı ve ekstrensek yolla başlatılan apoptotik sürecin engellendiğı gözlendi.

Sonuc olarak, Cisplatin uygulaması ratlarda kilo kaybına neden olmuş, tuba uterina duvar ve epitel kalınlığında azalma ortaya çıkmıştır. Caspase 9 üzerinden tetiklenen apoptozis artan DNA fragmentasyonu bulgusunu desteklemiştir. Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavi uygulaması intrinsek yolla tetiklenen apoptozisi önleyememiş ancak ekstrensek yolla caspase 8 üzerinden tetiklenen apoptozisi engellemiştir.

Çalışmada Cisplatinin tuba uterinadaki toksik etkilerini belirleyerek ve Acetyl L-Carnitinin koruyucu etkisini ortaya koyarak literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

7. ÖZET

Kemoterapi protokollerinin vazgeçilmez elemanı olan Cisplatin, erişkin çağda görülen bir kaç tümörün ve pek çok çocukluk çağı tümörlerinin tedavisinde rol alır. Gonadotoksik olduğu belirtilen Cisplatinin, birçok sistem üzerinde yan etkisi olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Nefrotoksisite, nöropati, ototoksisite ve gonadotoksisite Cisplatinin kullanımını sınırlayan klinik açıdan önemli doz sınırlayıcı yan etkilerdir.¹⁵ Cisplatin hücre içerisine girdikten sonra bir çok sinyal ileti yolağını aktive ederek hücrede apoptozis, nekrozis, oksidatif stres, fibrogenez, inflamasyon, hipoksi ve mitokondriyal hasara yol açarak sitotoksik etki gösterir.¹⁶

Bu çalışmanın amacı, gonadotoksik etkisi bilinen Cisplatinin tuba uterinadaki etkileri belirlemek ve bu etkilere karşı uygulanan Acetyl L-Carnitin'in koruyucu etkisini ortaya koymaktır. Bu etkilerin incelenmesinde, morfometrik ve histolojik analizleri için hematoksilin-eosin (H&E) boyama, apoptotik etkiler için immünohistokimyasal olarak Caspase 3, 8 ve 9; DNA fragmentasyonunu belirlemek için de TUNEL yöntemi uygulandı.

Deney öncesi ve deney sonrası ratların ağırlık ortalamaları değerlendirildiğinde, Cisplatin ve pretedavili gruplarda kilo kaybı gözlemlendi. Ancak Cisplatin grubundaki kilo kaybı pretedavili gruba göre daha fazlaydı.

Cisplatin grubunda tuba uterina duvar kalınlığı ve epitel kalınlığı incelmisti. Ancak Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavi grubunda duvar ve epitel kalınlık ortalamaları Cisplatin grubuna göre kalındı.

Histolojik incelemelerde Cisplatin ve Acetyl L-Carnitin+Cisplatin gruplarında intraepitelial lenfositik infiltrasyonun varlığı gözlenirken, Cisplatin grubunda gözlenen subepitelial hemoraji Acetyl L-Carnitin+Cisplatin grubunda tespit edilemedi.

Tuba uterina epitelinde Cisplatin grubunda çok sayıda hücrede DNA fragmentasyonu gözlenirken; Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavi uygulamasının fragmentasyonu önlediği gözlemlendi. Cisplatinin neden olduğu apoptotik yolağı ortaya koymak amacıyla uygulanan caspase 8, 9 ve 3 immünohistokimya sonuçları apoptozun ekstresek ve intrinsek olarak her iki yolla da tetiklendiğini göstermekteydi.

Acetyl L-Carnitin+Cisplatin pretedavi uygulaması intrinsek yolla tetiklenen apoptozisi önleyememiş ancak ekstresek yolla caspase 8 üzerinden tetiklenen apoptozisi engellemiştir.

Çalışma sonunda, Cisplatin uygulamasının tuba uterinalarda toksik etki gösterdiği, profilaktik olarak uygulanan Acetyl L-Carnitin'in histomorfolojik ve apoptotik etkileri önlediği belirlendi.

8. SUMMARY

Cisplatin is an essential element of chemotherapy protocols which plays a role in the treatment of a few tumor seen in adulthood and many childhood tumors. Cisplatin is indicated as partial gonadotoxicity which has the adverse affects in many systems as shown in studies. Nephrotoxicity, neuropathy, ototoxicity and gonadotoxicity are clinically important dose-limiting side effects that limit the use of Cisplatin. After Cisplatin entering inside the cell, it shows the cytotoxic effect in cell leading to apoptosis, necrosis, oxidative stress, fibrogenesis, inflammation, hypoxia and mitochondrial damage by activating a multi-signal transduction pathway.

The purpose of this study; known the effects of gonadotoxicity which is caused by cisplatin, we want to determine the effercts in rats tuba fallopians and present the protective effect of Acetyl L-Carnitine which is determined against these effects. An examination of these effects, hematoxylin-eosin(H&E) staining was applied for morfometric and histologic analysis and determine the apoptotic effects by by using Caspase 3, 8, 9 and TUNEL methods were applied to identify DNA fragmentation.

When the mean weight was evaluated before and after the experiment, weight loss was obsereved in Cisplatin and pre-treatment group. However in Cisplatin Groups weight loss was greater than pre-treatment group.

In Cisplatin group, tuba uterina wall thickness and the thickness of the epithelium had slimmed. But the average thickness of the wall and epithelium in Acetyl L-Carnitine+Cisplatin pre-treated group thicker than Cisplatin group.

During histological examinations, the presence of intraepithelial lymphocytic infiltration was observed in Acetyl L-Carnitine +Cisplatin groups. Subepithelial hemoragy, which was observed in Cisplatin group, was not detected in Acetyl L-Carnitine+Cisplatin group.

In fallopian tube epithelial, a large number of cells DNA fragmentation was observed. It was observed that Acetyl L-Carnitine+ Cisplatin pre-treatment practice prevents the fragmentation. The result of Caspase 8, 9 and 3 immunohistochemistry which is caused by Cisplatin in order to demonstrate apoptotic pathway, showed that apoptosis was triggered with two pathways as intrinsic and extrinsic.

Acetyl L-Carnitine+ Cisplatin pre-treatment application failed to prevent apoptosis triggered by intrinsic pathways but prevented the apoptosis triggered by extrinsic pathways over Caspase 8.

As a result of this study that occurs toxic effects of Cisplatin application on tuba uterina and Acetyl L-Carnitine prevent to histomorphologic and apoptotic effects which is applied prophylactically.

9. KAYNAKLAR

1. Cascatio DA, Lowitz BB. Klinik Onkoloji El Kitabı. Manavoğlu O (Çev), 1. Basım, Ankara, Palme Yayıncılık, 2007.
2. Sipahioğlu H. Onkoloji-Medikal Onkolojide Tedavi Prensipleri ve Protokoller. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık; 1981.
3. Kutluk T, Kars A. Kanser Konusunda Genel Bilgiler. Ankara: Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Yayınları; 1992.
4. Türkiye istatistik yılığı, T.C. Basbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü; 2004.
5. Şengelen M. Türkiye’de Kanser İstatistikleri. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2002.
6. <http://www.saglik.gov.tr/TR/belge/1-3417/kanser-istatistikleri-2003-2004-2005>.
7. Kayaalp O. Kanser Kemoterapisinin Esasları ve Antineoplastik İlaçlar. Rasyonel Teddavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Feryal Matbaacılık; 2002.
8. Akyol H. Kemoterapinin Temel İlkeleri. Dokuz Eylül Üniv Onk Ens. 18-22 Mayıs 2004. XIII. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, Hemşire Programı.

- 9.** Chu E, DeVita VT. Principles Of Medical Oncology. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Eds.). Cancer, principles & practice of oncology. 7th ed. Philadelphia: A Wolters Kluwer Co 2005; 295-306.
- 10.** Sönmezer M, Oktay K: Fertility preservation in female patients. Hum Reprod Update 2004; 10: 251-66.
- 11.** Oktay K: Ovarian tissue cryopreservation and transplantation preliminary findings and implications for cancer patients. Hum Reprod Update 2002; 7: 526-34.
- 12.** Familiari G, Caggiati A, Nottola SA, Ermini MD, Benedetto MR, Motta PM: Ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. Hum Reprod 1993; 8: 2080-2.
- 13.** Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FI: Cyclophosphamide induced ovarian failure N Engl J Med 289; 1159-62: 1973.
- 14.** Mackie EJ, Radford M, Shalet SM: Gonadal function following chemotherapy for childhood Hodgkin's disease. Med Pediatr Oncol 27; 74-8, 1996.
- 15.** Xin Yao, Panichpisal K. Cisplatin Nephrotoxicity: A review The American Journal of the Medical Sciences 2007; 334: 115-124.
- 16.** Zhang X, Yamamoto N, Soramoto S, Takenaka I. Cisplatin-Induced Germ Cell Apoptosis In Mouse Testes. Arch Androl 2001;46(1): 43-49.

- 17.** Furlong JH. Acetyl-L-carnitine: metabolism and applications in clinical practice. *Altern Med Rev* 1996; 1: 85–93.
- 18.** Kalinec G.M., Fernandez-Zapico M.E., Urrutia R., Esteban – Cruciani N., Chen S., Kalinec F. Pivotal role of Hsp70 in the induction and prevention of gentamicin – induced hearing loss. *PNAS* 2005; 102 (44): 16019 – 16024.
- 19.** Arockia-Rani PJ, Panneerselvam C Carnitine as a free radical scavenger in aging. *Exp Gerontol* 2001; 36(10):1713–1726.
- 20.** Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çeviri editörü), 6.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
- 21.** Sadler T W: Medikal Embriyoloji. Başaklar AC (Çeviri editörü), 9. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
- 22.** Coşgun A, Aras D, editörler. Anatomi, Histoloji, Embriyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri; 1998.
- 23.** Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1.Cilt. Ankara: Güneş Kitabevi; 2001.
- 24.** Hatiboğlu MT. Anatomi. 2. baskı. Ankara: Hatiboğlu yayınevi; 2003.
- 25.** Gövsa F. Sistemik Anatomi. İzmir: Güven Kitabevi; 2003.

26. Junqueira L C, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri editörleri). 10. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006.

27. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviri editörleri), Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2009.

28. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Demir R (Çeviri editörü), 2. baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.

29. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 3. Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2007: 489-501.

30. Ross MH, Pawlina W. Histology A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology. 5. Edition. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins; 2006.

31. El-Mowafi DM, Diamond MP. Fallopian Tube [online]. 2007 [cited 2007 Oct 30]. Available from : URL : http://www.gfmer.ch/International_activities_En/El_Mowafi/Fallopian_tube.htm.

32. Ieuan AH, Howard M, Jarmo J, Carlo AL. Nuclear receptor action involved with sex differentiation. Pure Appl Chem. 2003; 75 (11):1771-1784.

33. Taşkinalp O. Kadın Genital Sistemi Anatomisi. Gökmen FG (Editör). Sistemik Anatomi. İzmir: Güven Kitabevi; 2003.

34. Feneis H, Dauber W. Sistemantik Resimli Anatomi Sözlüğü. Yıldırım M, Marur T (Çeviri Editörleri), 8. Almanca baskıdan çeviri. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2001.

35. Aktümsek A. Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi. 1. Baskı. Ankara; Nobel Yayın Dağıtım; 2001.

36. Ayhan A, Tekin D, Günalp S, Gürgen T, Önderoğlu LS, Yaralı H, Yüce K. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. 2. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2008.

37. Snell RS. Klinik Anatomi. 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2004.

38. İnan VS, Vatansever HD, Özbilgin MK, Yurtseven M, Tuncel M. İnsan Tuba Uterina Epitelinin Morfometrik ve Ultrastrüktürel Olarak Değerlendirilmesi. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri. 2000; 20 (6): 347-355.

39. Lyons RA, Saridogan E, Djahanbakhch O. The reproductive significance of human Fallopian tube cilia. Human Reproduction. 2006; 12 (4): 363-372.

40. Akay T. Sitoloji. 4. baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2004.

41. Evirgen O, Tekelioğlu M, Küçükali M, Bahçeci M. İnsan Tuba Uterina Ampulla ve Fimbriya Bölgeleri Mukoza Epitelinde Menstruel Siklus Süresince Meydana Gelen Ultrastrüktürel Değişiklikler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 1997; 50 (4): 181-185.

- 42.** Erkoçak A. Özel Histoloji. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Basımevi; 1982.
- 43.** Abe H. Regional variations in the ultrastructural features of secretory cells in the rat oviductal epithelium. Anat Rec. 1994; 240 (1): 77-85.
- 44.** Gürel A. Menstrüel Siklusta Tuba Uterinada Epidermal Büyüme Faktör Reseptörlerinin Dağılımlarının İmmünohistokimyasal Olarak Gösterilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2007.
- 45.** Şahin Ş. Yaşlanmaya Koşut Sıçan Tuba Uterina'sında Cinsiyet Hormonlarının İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi ve Ultrastrüktürel Değişimlerin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2008.
- 46.** Fredricsson B, Björkman N. Studies on the ultrastructure of the human oviduct epithelium in different functional states. Cell and Tissue Research. 1962; 58 (3): 387-402.
- 47.** Guyton AC, Hall EJ. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H (Çeviri Editörü), 11. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2007.
- 48.** Fox SL. Human Physiology. 8. Edition. Mc Graw Hill; 2004; 666- 668.
- 49.** Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (Çev.) 20. Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2002.
- 50.** Attar E, Ata B, Editörler. Gomel'in Jinekolojisi. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi; 2007.

51. Yaman K. Fizyoloji. 3.Baskı. Bursa: Vipaş; 1999.
52. Bal EM. Ovulasyon İndüksiyonunda Tuba Uterina Yapısı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2010.
53. Durna Z, Aydın A. Kanseri Kemoterapi Rehberi ve Uygulamaya Yönelik Öneriler. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2003.
54. Yeter K. Kemoterapi Alan Hastalara Verilen Eğitimin Yaşam Kalitesi Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Osmangazi Üniversitesi; 2006.
55. Şanlı Y, Kaya S. Veteriner Farmakoloji ve İlaçla Sağıtım Seçenekleri. Ankara: Medisan Yayınevi; 1994.
56. Akkan HA, Karaca M. Veteriner İç Hastalıklarında Antibiyotiklerin Kullanımı. YYÜ Vet. Fak. Derg. 2003; 14 (2): 72-77.
57. Aydın H. Meme Tümörü Oluşturulmuş Sıçanlarda Kemoterapi Uygulamasının Tuba Uterina ve Uterus Dokuları Üzerine Etkisi ve Çeşitli Antioksidanların Koruyucu Rollerinin Yapısal ve İmmünohistokimyasal Düzeyde Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2010.
58. Şimşek H. Kemoterapi Hazırlayan ve Uygulayan Hemşirelerin Önlem Alma Durumları ve Etkileyen Faktörler. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2010.
59. DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer Principles and practice of oncology. 8. Edition. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

- 60.** Yarbrow CH, Gobel BH, Wujcik D. Cancer Nursing: Principles and Practice. 7. Edition. Sudbury MA: Jones and Bartlett Publishes; 2010.
- 61.** Capizzi RL. Clinical status and optimal use of amifostine. *Oncology*. 1999; 13 (1): 47-59.
- 62.** Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994; 266 (5192): 1821-1828.
- 63.** Garrett MD. Cell cycle control and cancer. *Current Science*. 2001; 81 (5): 515-522.
- 64.** Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7: 573-584.
- 65.** Chirino YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Exp Toxicol Pathol*. 2009; 61 (3): 223-242.
- 66.** Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanism involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57: 1229-1235.
- 67.** <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?id=32159>
- 68.** Olinski R, Wedrychowski A, Schmidt WN, Briggs RC, Hnilica LS. In vivo DNA-protein cross-linking by cis- and trans-diamminedichloroplatinum II. *Cancer Res* 1987; 47: 201-205.

- 69.** Lippert B. Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Zurich: Wiley VCH; 1999.
- 70.** <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/cisplat.htm>
- 71.** Chabner BA, Ryan DP, Paz-Ares L, Carbonero RG, Calabresi P. Antineoplastic Agents. Hardman JG, Limbird LE (Eds.). The pharmacological basis of therapeutics. 10 th edition. New York: Mc Graw Hill Co; 2001: 1432-4.
- 72.** Cooley ME, Davis LE, Destefano M, Abrahm J. Cisplatin: a clinical review. Part I--Current uses of cisplatin and administration guidelines. Cancer Nurs. 1994; 17: 173-84.
- 73.** Pil P, Lippard SJ, Bertino JR. Cisplatin and related drugs. Encyclopedia of Cancer. Academic Press: New York; 2002: 525–543.
- 74.** Holzer AK, Samimi G, Katano K, et al. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. Mol Pharmacol. 2004; 66: 817-823.
- 75.** Wang D, Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. Nat Rev Drug Discov 2005; 4: 307-320.
- 76.** Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis?. Mol Pharmacol. 2001; 59: 657-663.

- 77.** Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279.
- 78.** Boulikas T, Vougiouka M. Recent clinical trail using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs. *Oncol Rep* 2004; 11 (3): 559-95.
- 79.** Hartmann JT, Lipp HP. Toxicity of platinum compounds. *Expert Opin Pharmacother* 2003; 4: 889-901.
- 80.** Kuhlman MK, Burkhardt G, Köhler H. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrol Dial Transplant*. 1997; 12: 2478-80.
- 81.** Kröning R, Lichtenstein AK, Nagami GT. Sulfur-containing amino acids decrease cisplatin cytotoxicity and uptake in renal tubule epithelial cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000; 45: 43-9.
- 82.** Tufekci O, Gunes D, Ozogul C, Kolatan E, Altun Z, Yılmaz O, Aktas S, Erbayraktar Z, Kırkım G, Mutafoğlu K, Soylu A, Serbetcioglu B, Güneri EA, Olgun N. Evaluation of the Effect of Acetyl L-Carnitine on Experimental Cisplatin Nephrotoxicity. *Chemotherapy* 2009; 55: 451-459.
- 83.** Tüfekçi Ö. Asetil L-Karnitin'in Deneysel Sisplatin Nefrotoksitesisi Üzerindeki Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi; 2009.
- 84.** <http://www.cancercare.on.ca/pdfdrugs/CISPLATI.pdf>

85. Cornelisonn TL, Reed E. Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin and ormaplatin. *Gynecol Oncol.* 1993; 50: 147-158.

86. Uzunoğlu S. Sisplatine bağlı böbrek dokusunda meydana gelen hasarı önlemede karnitinin etkinliğinin standart sitoprotektif ajan olduğu bilinen amifostinin etkinliği ile karşılaştırılması. Yan Dal Uzmanlık Tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi; 2009.

87. Badary OA, Abdel-maksoud S, Ahmed WA, Owieda GH. Naringenin attenuates cisplatin nephrotoxicity in rats. *Life Sci.* 2005; 76: 2125-35.

88. Fischer U, Schulze-Osthoff K. Apoptosis-based therapies and drug targets. *Cell Death and Differentiation.* 2005; 12: 942-961.

89. Saunders MW, Birchall MA. Molecular biology series apoptosis, matters of life and death. *The Journal of Laryngology and Otolaryngology.* 1998; 112: 822-826.

90. Aral H. Apoptozis. *Sendrom Tıp Dergisi.* 1996; 33-37.

91. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi *Dergisi.* Malatya: 2002; 9(2): 143-148.

92. O' Shaghnessy JA, Cowan KH, et al. Human Gene Therapy. Retroviral Mediated Transfer of the Human Multidrug Resistance Gene (MDR-1) into Hematopoietic Stem Cells During Autologous Transplantation After Intensive Chemotherapy for Metastatic Breast cancer. 1994; 5: 891-911.

- 93.** Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol.* 2000; 182: 41-9.
- 94.** Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001; 41: 367-401.
- 95.** Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri* 2003; 23: 499-508.
- 96.** Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35(4): 495-516.
- 97.** Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. In: Kopman WJ (Ed.) *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions.* Lippincott Williams & Wilkins 2001.
- 98.** Cohenn JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus.* 1998; 1:1-19.
- 99.** Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 1999; 47 (9): 1101-1109.
- 100.** Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999; 4: 332-9.
- 101.** Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; 13: 102-7.

102. Thompson EB. Apoptosis. Annual Review of Physiology 1998; 60: 525-32.

103. Nanji AA, Hiller-Sturmhöfel S. Apoptosis and necrosis: two types of cell death in alcoholic liver disease. Alcohol Health and Research World 1997; 21: 325-30.

104. Gewies A. 2003, ApoReview- İnroduction to Apoptosis [online], <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro>, [ziyaret tarihi: 10.04.2011].

105. Erdoğan BB, Uzaslan EK. Apoptozis Mekanizmaları Tümör Gelişiminde Fas-FasL Bağımlı Apoptozis. Akciğer Arşivi. 2003; 4: 165-174.

106. Ulukaya E. Akciğer Kanseri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. Bölüm III. Engin K, Özyardımcı N. (editörler).

107. Serbes U. HeLa Hücre Kültürlerinde Apoptoz ve Moleküler Mekanizması. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2009.

108. <http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/chap10.htm>

109. Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun S, Billig H. Gonadal cell apoptosis. Recent Progress in Hormone Research 1996; 51: 432-457.

110. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 1995; 267:1456-62.

111. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes & Development* 2001; 15: 2922-33.

112. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 684-8.

113. Fadel B, Orrenius S. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications In Human Disease. *Journal of Internal Medicine*. 2005; 258: 479-517.

114. Deniz G. Kalıcı atriyal fibrilasyon ve normal sinüs ritimli olgularda atriyal hücrelerde apoptozis ve apoptozisi regüle edici proteinlerin karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2008.

115. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular apoptosis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.

116. Nasi S, Ciarapica R, Jucker R, Rosati J, Soucek L. Making decisions through Myc. *FEBS Letters* 2001; 490:153-162.

117. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2005; 37 (11): 719-727.

118. Mastanabad MF. Kaspaz promotör Bölge Polimorfizmleri ve Ovaryum Kanseri Arasındaki İlişki. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2009.

119. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. J Clin Invest 2005; 115 (10): 2665-2672.

120. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. Int J Low Extrem Wounds 2005; 4: 138-44.

121. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.

122. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: function and regulation of caspases. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64 (4): 821-846.

123. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nat Rev Cancer 2002; 2: 277-88.

124. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science 1998; 281: 1305-8.

125. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science 2002; 296: 1635-6.

126. Yıldız Y. Meme kanserli hastalarda TNF ile ilişkili apoptoz uyarıcı ligand ve Bcl-2 ile ilişkili X-protein gen polimorfizmlerinin araştırılması. Yüksek lisans tezi. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2008.

127. Gulbins E, Dreschers S, Bock J. Role of mitochondria in apoptosis. Ex Physiol 2003; 88: 85-90.

128. Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. Cancer Res 2004; 64(20):7183-90.

129. Yuvacı H. Dişi ratlarda non iyonize radyasyonun over dokusundaki apoptozis üzerine etkisi. Uzmanlık tezi. Ankara: Fatih Üniversitesi; 2009.

130. Aksoy Y. The Role of Glutathione in Antioxidant Mechanism. T Klin J Med Sci. 2002; 22: 442-448.

131. Sezer S. Sağlıklı ve Uzun Yaşama Kılavuzu. 2. Baskı. İstanbul; Remzi Kitabevi; 1998.

132. Lamson DW, Brignall MS. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. Altern Med Rev 1999; 4 (5): 304-329.

133. <http://www.oksante.com.tr/oxy2.pdf>

134. Uysal N. Sıçanlarda L-Karnitinin Streptozotocinle Diyabet Oluşumunu ve Oksidan Stres Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi; 1998.

135. Özgöçmen S. Romatizmal Hastalıklarda Oksidatif Stresin Rolü. Türk Fiz Tıp Rehab Derg. 2007; 53 (2):33-5.

136. Barber DA, Harris SR. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Am Pharmavy. 1994; 34 (9): 26-35.

137. Onat T, Emerk K. Temel Biyokimya I. Saray Medikal Yayıncılık: 1997.

138. Çetinkaya A. Ratlarda N-Asetil Sistein ve L-Karnitin'in Karbon Tetraklorür ile Oluşturulan Akut Karaciğer Hasarı Üzerine Etkileri. Yan dal uzmanlık tezi. Kahramanmaraş: Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi; 2009.

139. Keskin F. Ratlarda Bilirubin ile Oluşturulan Nörotoksisitede Oksidatif Stresin Rolü ve L-Karnitin'in Koruyucu Etkisi. Uzmanlık tezi. Erzurum: Atatürk Üniversitesi; 2008.

140. Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J. Free radicals and antioxidant systems in health and disease. Br J Hosp Med 1990; 43: 334-344.

141. Nielsen F, Mikkelsen B, Nielsen J, Andersen HR, Grandjean P. Plazma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effect of life-style factors. Clinical Chemistry 1997; 43 (7): 1204-1214.

142. Akkuş T. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya. Mimoza Yayınları. 1995: 1-80.

143. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull. 1993; 49 (3): 479-480.

144. Bilge M. Hemodiyaliz hastalarında serbest radikallerin organizmaya ve antioksidan savunma sistemleri üzerine etkisi. Yüksek lisans tezi. Kütahya : Dumlupınar Üniversitesi;2010.

145. Kılınç K. Oksijen Radikalleri, Üretilmeleri, Fonksiyonları, Toksik Etkileri. Biyokimya Dergisi 1985; 10:60-89.

146. Gaeta LM, Tozzi G, Pastore A, Federici G, Piemonte F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subject. Clinica Chimica Acta 2002; 322 (1): 117-120.

147. Eskandari HG, Acartürk E, Yüreğir GT, Demir M, Belge E. Glutathione Concentration, Glutathione Peroxidase and Superoxide Dismutase Activity of Erythrocytes in the Early Onset of Acute Myocardial Infarction. Annals of Med Sci 2001; 110-112.

148. Aydın A, Sayal A, Isiner A. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi. 2001; 20: 1-87.

149. Kopuz M. Tekrarlayan Düşük (Recurrent Abortion) Olgularında Oksidan- Antioksidan Dengenin L- Karnitin ile İlişkisi. Yüksek lisans tezi. Trabzon: Karadeniz Teknik Üniversitesi; 2008.

150. Bieber LL. Carnitine. Annu Rev Biochem 1988; 57: 261-83.

151. Matera M, Bellinghieri G, Constantino G, Santoro D, Calvani M, Savica V. History of L-carnitine: Implications for renal disease. Journal of Renal Nutrition 2003; 13 (1): 2-14.

152. Arslan A. diyabetik sıçanlarda karnitinin yara iyileşmesi ve flep yaşayabilirliğine etkisi: Deneysel çalışma. Uzmanlık tezi. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi; 2010.

- 153.** Monograph. L-carnitine. Altern Med Rev 2005; 10: 42-50.
- 154.** Rebouche CJ, Engel AG. Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man. Biochim Biophys Acta 1980; 630: 22-29.
- 155.** Vaz FM, Wanders RAJ. Carnitine biosynthesis in mammals. Journal of Biochemistry 2002; 361: 417-429.
- 156.** Rebouche CJ. Carnitine. Nutrition in Health and Disease. 9. Edition. 1999; 505-512.
- 157.** Bremer J. Carnitine-metabolism and functions. Physiol Rev 1983; 63: 1420-1480.
- 158.** Hathcock JN, Shao A. Risk assesment for carnitine. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2006; 46:23-28.
- 159.** Akin H. Farelerde asetil-L-karnitin uygulamasının deneysel ağrı modelleri üzerine etkileri. Yüksek lisans tezi. Edirne: Trakya Üniversitesi; 2005.
- 160.** Bourdin B, Adenier H, Perrin Y. Carnitine is associated with fatty acid metabolism in plants. Plant Physiology Biochemistry 2007; 45: 926-931.
- 161.** Yeste M, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Bonet S. A diet supplemented with l-carnitine improves the sperm quality of Pietrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase. Theriogenology 2010; 73: 577-586.

162. Mayes PA. Lipids of physiological significance. Harper's Biochemistry. Stamford. 2000; 160-171.

163. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid. Toxicology. 2006; 217: 213-220.

164. Kalaiselvi T, Panneerselvan C. Effect of L-carnitine on the status of lipid peroxidation and antioxidants in aging rats. Journal of Nutritional Biochemistry. 1998; 9: 575-581.

165. Nozaki Y, Furubo E, Matsuno T, Fukui R, Kizawa K, Kozaki T, Sanzen T. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity 6) Two-or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. J toxicol Sci 2009; 34: 73-81.

166. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. Journal of Nucleic Acids. 2010; Article ID 201267.

167. Shimeda Yuka, Hirotani Y, Akimoto Y, Shindou K, Ijiri Y, Nishihori T et al. Protective effects of capsaicin against cisplatin nephrotoxicity in rats. Biol Pharm Bull 2005;28(9):1635-8.

168. Dickey TD, Wu J, Muldoon LL, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced toxicities by N-Acetylcysteine and sodium thiosulfate as assessed at the molecular, cellular and in vivo levels. J Pharmacol Exp Ther 2005;314:1052-8.

169. Kondo S, Yin D, Morimura T, Kubo H, Nakatsu S, Takeuchi J. Combination therapy with cisplatin and nifedipine induces

apoptosis in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human glioblastoma cells. *British Journal of Cancer*. 1995; 71:282-289.

170. Himmelstein-Braw R, Peters II, Faber I. Morphologic study of the ovaries of leukemic children. *Br. J Cancer*. 1978; 38:82-87.

171. Ataya KM, Valeriote FA, Ramahi-Ataya AJ. Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. *Cancer Res*. 1989;49:1660-1664.

172. Ormerod MG, Orr RM, Peacock JH. The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometric study. *Br. J. Cancer* 1994; 69: 93-100.

173. Pabla N, Dong Z. Cisplatin Nephrotoxicity: Mechanisms And Renoprotective Strategies. *Kidney Int*. 2008; 73: 994-1007.

174. Chapman RM, Sutcliffe SB, Malpas JS. Cytotoxic-induced ovarian failure in women with Hodgkin's disease. I. Hormone function. *J Am Med Assoc* 1979;242:877–81.

175. Oktay K, Sönmezer S: Chemotherapy and amenorrhea: risks and treatment options. *Curr. Opin Obstet. Gynecol* 20;408-15 2008.

176. Clerici WJ, Hensley K, Dimartino DL, Butterfield DA. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hear Res* 1996; 98(1-2): 116-124.

177. Sasada T, Iwata S, Sato N, et al. Redox control of resistance to cisdiamminedichloroplatinum (II) (CDDP): Protective effect of human thioredoxin against CDDP-induced cytotoxicity. J Clin Invest 1996; 97: 2268-2278.

178. Sugiyama S, Hayakawa M, Kato T, et al. Adverse effect of anti-tumor drug, cisplatin, on rat kidney mitochondria: Disturbances in glutathione peroxidase activity. Biochem Biophys Res Commun 1989; 159: 1121-1127.

179. Pratibha, R., Sameer, R., Rataboli, P.V., Bhivgade, D.A., Dhume, C.Y., 2006. Enzymatic studies of cisplatin induced oxidative stres in hepatic tissue of rats. European Journal of Pharmacology 532, 290-293.

180. Avcı A, Çetin R, Ergüder İB, Devrim E, Kılıçoğlu B, Çandır Ö, Öztürk HS, Durak İ. Cisplatin Causes Oxidation in Rat Liver Tissues: Possible Protective Effects of Antioxidant Food Supplementation. Turk J. Med.Sci 2008; 38(2): 17-120.

181. Kozluca O. Serbest Radikaller Ve Kanser, Kartal Eğitim Ve Araştırma Klinikleri.

182. Delibaş N , Özcanakaya R. Serbest Radikaller. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi 1995; 2(3): 11-17.

183. Weijl NI, Elsendoorn TJ, Lentjes EG, Hopman GD, Wipkink-bakker A, Zwinderman AH, Cleton FJ, Osanto S. Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based

chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1713-23.

184. Ozen S, Akyol O, Iraz M, Söğüt S, Ozuğurlu F, Ozyurt H, Odacı E, Yildirim Z. Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Appl Toxicol* 2004; 24: 27-35.

185. Nazıroğlu M, Karaoğlu A, Aksoy O. Selenium and High Dose Vitamin E Administration Protects Cisplatin-Induced Oxidative Renal, Liver and Lens Tissues in Rats. *Toxicology* 2004; 195: 221–230.

186. Demirdag K, Bahcecioglu IH, Ozercan IH, Ozden M, Yilmaz S, Kalkan A. Role of L-carnitine in the prevention of acute liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *J Gastroenterol Hepatol* 2004; 19: 333-338.

187. Kumaran S, Deepak B, Naveen B, Panneerselvam C. Effects of levocarnitine on mitochondrial antioxidant systems and oxidative stress in aged rats. *Drugs R D* 2003; 4: 141-147.

188. Sayad-Ahmed MM, Eissa MA, Kenawy SA, Mostafa N, Valvani M, Osman MA. Progression of cisplatin-induced nephrotoxicity in a carnitine-depleted rat model. *Chemotherapy* 2004;50:162-70.

189. Dokmeci D, Akpolat M, Aydogdu N, Uzal C, Doganay L, Turan FN. The protective effect of L-carnitine on ionizing radiation-induced free oxygen radicals. *Scand J Lab Anim Sci* 2006;33(2):75-83.

190. Chang B, Nishikavva M, Sato E, Utsumi K, Inove M. L-Carnitine inhibits cisplatin-induced injury of the kidney and small intestine. Arch Biochem Biophys 2002;405:55-64.

191. Thangasamy T, Jeyakumar P, Sittadjody S, Joyee AG, Chinnakannu P. L-carnitine mediates protection against DNA damage in lymphocytes of aged rats. Biogerontology 2009;10:163-72.

192. Shekhawat PS, Srinivas SR, Matern D. Spontaneous development of intestinal and colonic atrophy and inflammation in the carnitine-deficient jvs (OCTN2(-/-)) mice. Mol Genet Metab 2007;92:315-24.

193. Cetinkaya A, Bulbuloglu E, Kantarceken B et al. Effects of L-carnitine on oxidant/antioxidant status in acetic acid-induced colitis. Dig Dis Sci 2006;51:488- 94.

194. Perk H, Soyupek S, Oksay T. Erkek İnfertilitesine Neden Olan Fiziksel Ajanlar, İlaçlar Ve Toksinler. Oksay Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji ABD İnfertilite Dergisi.

195. Ishii T, Shimpo Y, Matsuoka Y, Kinoshita K. Anti-Apoptotic Effect Of Acetyl-L-Carnitine And L-Carnitine İn Primary Cultured Neurons. Jpn J Pharmacol 2000; 83:119-24.

196. Sundaram K, Panneerselvam Ks. Oxidative Stres And DNA Single Strand Breaks İn Skletetal Muscle Of Aged Rats: Role Of Carnitine And Lipoicacid. Biogerontology 2006; 7:111-8.

197. Topçu Y, Kanter M, Uzal M. Role Of L-Carnitine İn The Prevention Of Seminiferous Tubules Damage İnduce By Gamma

Radiation: A Light And Electron Microscopic Study. Reproductive Toxicology 2009; 83:735-746.

198. Aleisa AM, Al-Majed AA, Al-Yahya AA, Al-Rajeie SS, Bakheet SA, Al-Shabanah OA et al. Reversal of cisplatin-induced carnitine deficiency and energy starvation by propionyl-Lcarnitine in rat kidney tissues. Clin Exp Pharmacol Physiol 2007;34:1252-9.

199. Shao R, Nutu M, Weijdegard B, Egecioglu E, Fernandez J, Karlsson L, Gemzell K, Bergh C, Billig H. Clomiphene Citrate Causes Aberrant Tubal Apoptosis and Estrogen Receptor Activation in Rat Fallopian Tube: Implications for Tubal Ectopic Pregnancy. Bio of Reproduct 2009; 80: 1262-1271.

200. Farokhi F, Sadrkhanlou R, Hasanzadeh Sh, Sultanalinejad F. Morphological and morphometrical study of cyclophosphamide induced change in the ovary and uterus in the Syrian mice. Iranian Journal of Veterinary Research. 2007;8 (4):337-342.

10. EKLER

EK 1. ETİK KURUL RAPORU



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

11.02/2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/15-
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Candan ÖZOĞUL
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

“Deneyisel Cisplatin Gonadotoksitesinde Asetil L-Carnitinin Apoptotik Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı araştırma öneriniz Başkanlığımız evrak kayıtlarına 11.02.2010 tarih ve 29 nolu kayıt numarasıyla giriş yapmıştır.

N. Güner
Nursel GÜNER

EK 2. KATILIM SERTİFİKASI



18-28 Nisan 2011

IX. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Sanem ALIK

Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi
Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve
Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından,
18-28 Nisan 2011 tarihleri arasında düzenlenen
"Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu IX"a katılarak,
Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve
bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. Rıza AYHAN
Rektör

Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
Merkez Müdürü

Sertifika No. 2011/09-29

11. TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN' a, yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi birikimi ve hayat tecrübesinden faydalandığım, hoşgörüsü ve desteği ile her zaman yanımda olan değerli danışmanım Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL' a, eğitmenlik yapan hocalarım Prof. Dr. M. Tahir HATİPOĞLU' na, Prof. Dr. Celal ILGAZ' a, Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU' a, Doç. Dr. Çiğdem ELMAS' a ve Doç. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU' na teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarım boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve her koşulda desteklerini yanımda hissettiğim Dr. Seda Nur AKYOL'a, arkadaşlarım Bahar KARTAL'a, Neslihan COŞKUN'a ve Sema KURNAZ'a, Anabilim Dalımızın tüm araştırma görevlilerine, yüksek lisans arkadaşlarıma, çalışmalarım süresince yardımcı olan Anabilim Dalı personelimiz Recep Orhan'a,

Beni bugünlere getiren, maddi ve manevi olarak her zaman destekleyen, koşulsuz anlayış ve sevgi gösteren canım Annem Hatice ARIK'a, canım Babam Nuri ARIK'a,

Sonsuz sabır ve desteği ile her zaman yanımda olan Emre SARIBAŞ'a teşekkürlerimle.

G.Sanem ARIK
Aralık 2011-ANKARA

12. ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Ankara’da doğdum. İlkokulu (1992-1997) ve ortaokulu (1997-2000) Ahmet Hamdi Tanpınar İlköğretim Okulu’nda, liseyi Batıkent Lisesi’nde (2000-2003) tamamladım. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden 2009 yılında mezun oldum. Aynı yıl Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım.