

BİDGE Yayınları

Veteriner Biyokimyada Güncel Yaklaşımlar

Editör: Doç. Dr. Mert PEKCAN

ISBN: 978-625-6645-45-5

1. Baskı

Sayfa Düzeni: Gözde YÜCEL

Yayınlama Tarihi: 25.12.2023

BİDGE Yayınları

Bu eserin bütün hakları saklıdır. Kaynak gösterilerek tanıtım için yapılacak kısa alıntılar dışında yayıncının ve editörün yazılı izni olmaksızın hiçbir yolla çoğaltılamaz.

Sertifika No: 71374

Yayın hakları © BİDGE Yayınları

www.bidgeyayinlari.com.tr - bidgeyayinlari@gmail.com

Krc Bilişim Ticaret ve Organizasyon Ltd. Şti.

Güzeltepe Mahallesi Abidin Daver Sokak Sefer Apartmanı No: 7/9 Çankaya /
Ankara



ÖNSÖZ

Hücrenel ve moleküler süreçlerin araştırılmasıyla kimyayı bütünleştiren biyokimya; bilimin farklı alanları ile etkileşim içindedir. Biyokimya alanında, karbonhidrat, protein, nükleik asit, lipid, vitamin ve hormon gibi moleküllerin hücrelerdeki mekanizmalarının ortaya konması amaçlamakta ve aynı zamanda, bu moleküllerin kimyasal reaksiyonları nasıl denetlediği irdelenmektedir.

Hedef, biyolojik süreçlerin anlaşılması, insan, hayvan ve bitkilerdeki hastalıkların nedenlerinin açıklanması ve bu tür hastalıklardan korunma ve sağaltım için yollar önerilmesidir. Bunlarla birlikte, biyokimyanın pratik uygulamaları moleküler genetik ve biyomühendislik gibi birçok disiplinin yapı taşlarını oluşturmaktadır.

Biyokimya ile haşır neşir olmak, analitik becerilerin geliştirilmesi, çeşitli alanlarda iyileştirmeler yapma yeteneği ve yaşamın moleküler temelini derinlemesine anlaşılmasını sağlamayı da kapsayan pek çok fayda ve katkı sağlar. Biyokimyacılar, molekülleri analiz etmek ve manipüle etmek, yapılarını, işlevlerini ve biyolojik sistemlerdeki rollerini ortaya çıkarmak için spektroskopi, kromatografi, elektroforez, enzim deneyleri ve moleküler modelleme gibi yöntemler başta olmak üzere pek çok teknikten faydalanmakta ve hatta bazen var olan teknikleri geliştirmekte ya da yenilerini önermektedir.

Bu alan, veteriner hekimlikte, eğitim ve araştırmalar için temel oluşturarak, hayvanların sağlık ve hastalığıdaki metabolik işlevlerinin kavranmasında dinamik rol oynamaktadır.

Veteriner hekimler, bir hastalığı veya durumu gösteren değişiklikleri biyokimyasal araçlarla tespit edebildiklerinden, hayvan hastalıklarının teşhis ve tedavisi sürecinde bu alana başvuru vazgeçilmezdir. Bu nedenle, hayvanların çeşitli sağlık sorunlarının

anlaşılması, ele alınması, etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve hayvan refahının iyileştirilmesinde her zaman katkı sağlamaya devam edecektir.

Editor

Doç. Dr. Mert PEKCAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	3
İÇİNDEKİLER	5
Ekstraselüler Veziküller	7
Burcu Menekşe BALKAN	7
4-Hidroksi-2-Nonenal, Metabolizması ve Hastalıklarla İlişkisi	37
Burcu Menekşe BALKAN	37
Doğuş ÖZALKAN	37
Polifenollerin Anti-Kanser Etkisi.....	62
Dilek Nur BESTİL	62
Hamdi UYSAL.....	62

İnflamasyon ve Kanser.....	77
Recep BOZKURT	77
Görkem KISMALI	77
Köpek ve Kedilerde İdrar Analizi.....	104
Efe KURTDEDE.....	104
Veteriner Hekimlikte Kitosan Uygulamaları	122
Simge AKBULUT.....	122
Mert PEKCAN	122
Kedi ve Köpeklerde Kanser ve Sitokinler.....	136
Yeliz KAYA KARTAL.....	136
Tevhide SEL.....	136
Kök Hücrelerin Kriyoprezervasyonu	173
Sare UYURCA	173
Öğünç MERAL	173
Mezenkimal Kök Hücrelerin Biyolojik Özellikleri	193
Sare UYURCA	193
Öğünç MERAL	193
Veteriner ve Tıp Hekimliğinde Elektriksel Stimülasyon.....	207
Filiz KAZAK.....	207

BÖLÜM I

Ekstraselüler Veziküller

Burcu Menekşe BALKAN¹

Giriş

Hormonlar veya nörotransmitterleri taşıyan salgı keseciklerinin özel hücreler tarafından salınması gibi, tüm hücreler, ekstraselüler veziküller olarak bilinen çeşitli tipteki lipit membranla çevrili vezikülleri salgılama yeteneğine sahiptir (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018). Ekstraselüler veziküller (EV'ler), ayırdığı hücrenin moleküler içeriği barındırır (Akers & ark., 2013; Doyle & Wang, 2019) ve hücre içine alınmalarının ardından sonraki hedeflerini modüle edebilirler. EV'lerdeki izole moleküler içerik, bir hücrenin iç durumu hakkında bilgi sağlayabilir (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018). EV'lerin lipit membranı, moleküler içeriği enzimatik yıkımdan korur ve bu yapıları umut verici potansiyel teşhis ve ilaç dağıtım araçları haline getirir (Shao & ark., 2012;

¹ Doç. Dr., Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Vader & ark., 2016). EV'ler, hücreler arası iletişim için ek bir mekanizma olarak kabul edilmiş ve hücrelerin protein, lipit ve genetik materyal alışverişine katkı sağladığı bildirilmiştir. Ekstraselüler vesiküllerin biyolojisini yöneten hücresel süreçler konusundaki bilgi birikimi, bu veziküllerin fizyolojik ve patolojik fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasının yanında, bunların kullanımını ve/veya analizini içeren klinik uygulamalara ışık tutmak için gereklidir (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018).

EV'lerin normal ve patofizyolojik hücre etkileşimlerindeki rolü kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır (Skog & ark., 2008; Peinado & ark., 2016; Al-Nedawi & ark., 2008; Lachenal & ark., 2011; Thery, Ostrowski & Segura, 2009). EV'lerin normal hücreler arası iletişimde rol oynadığı gibi, bir sistemde homeostaz değiştiğinde (oksidatif strese artış gibi), EV içeriği değişebilir ve EV'lerin sonraki hedeflerindeki moleküler etkilerini değiştirebilir (Shah, Patel & Freedman, 2018; Lachenal & ark., 2011; Thery, Ostrowski & Segura, 2009; Harmati & ark., 2019).

EV biyogenezi progenitör hücrelerde meydana gelir. Daha sonra progenitör hücreler tarafından eksozomlar, mikroveziküller ve apoptotik cisimler gibi çeşitli EV'ler salgılanır. Eksozomlar mikroveziküller içinde salgılanır. Mikroveziküller doğrudan plazma membranından tomurcuklanarak salgılanır, apoptotik cisimler ise membran kabarcıklanması yoluyla salınır. Ekstraselüler matriksten geçtikten sonra EV'ler endositoz, füzyon ve sinyalleme yoluyla hücre fenotipini etkileyebilir. Daha sonra EV'ler, lizozom tarafından parçalanma, doğrudan alıcı hücrenin dışına salınma ve içeriklerin alıcı hücrenin sitoplazmasına salınması dahil olmak üzere üç olası yol ile alıcı hücrede metabolize olabilirler (Liu, & Wang, 2023).

EV'ler ile ilgili yapılan çalışmalar, hücre-hücre iletişimi ve kanser metastazı alanlarının daha iyi aydınlatılmasını sağlamış ve klinik ortamda tanı amaçlı biyobelirteçler olarak kullanılabilirlikleri bildirilmiştir (Doyle & Wang, 2019).

Ekstraselüler Veziküllerin Sınıflandırılması

EV'ler biyogenezlerine ve boyutlarına bağlı olarak eksozomlar, mikroveziküller (MV'ler) ve apoptotik cisimler olmak üzere üç alt tipe ayrılır (Jin & ark., 2022). Biyogenezlerine, salınım yollarına, boyutlarına, içeriklerine ve işlevlerine göre farklılaşır. EV'lerin içeriği veya kargosu lipitlerden, nükleik asitlerden ve proteinlerden, özellikle de plazma zarı, sitozol ve lipit metabolizmasında rol oynayan proteinlerden oluşur. Farklı EV türleri arasında ayırım yapacak spesifik bir protein belirteci tanımlanmamış olsa da, MV'ler, eksozomlar ve apoptotik cisimler, farklı oluşum yollarından dolayı farklı protein profillerine sahiptir (Doyle & Wang, 2019).

Mikropartiküller ve eksozomlar arasındaki temel fark, mikropartiküllerin salgılanması sırasında hücre içi zarın karışmamasıdır (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018). Apoptotik cisimler ise olarak daha büyüktür (1–5 µm) ve programlanmış hücre ölümü süreci sırasında üretilir (Battistelli & Falcieri, 2020).

Eksozomlar

Eksozomlar, endozomal yolla oluşturulan bir EV alt tipidir (Borges, Reis & Schor, 2013; Zaborowski & ark., 2015). Eksozomlar, mikroveziküler cisimciklerin plazma zarı ile füzyonundan sonra salgılanan multivesiküler cisimlerin olgunlaşması sırasında endozomal zarın içe doğru tomurcuklanmasıyla oluşturulan intralüminal keseciklerdir (ILV'ler) (Bebelmann & ark., 2018; Harding, Heuser & Stahl, 1984; Pan & ark., 1985; Raposo & Stoorvogel, 2013; Yáñez-Mó & ark., 2015). ILV'ler olarak da adlandırılan eksozomlar, tek bir dış zar tarafından çevrelenir. Tüm hücre tipleri tarafından salgılanan eksozomların, plazma, idrar, meni, tükürük, bronş sıvısı, beyin omurilik sıvısı (BOS), anne sütü, serum, amniyotik sıvı, sinovyal sıvı, gözyaşı, lenf, safra ve mide asidi gibi birçok biyolojik sıvıda bulunduğu bildirilmiştir (Doyle & Wang, 2019; (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018). Eksozomların boyutlarının yaklaşık olarak 30-150 nm

(Bebelma & ark., 2018; Borges, Reis & Schor, 2013; Raposo & Stoorvogel, 2013; Zaborowski & ark., 2015) ile 40-120 nm (Théry, Zitvogel & Amigorena, 2002) aralığında olduğu bildirilmektedir.

ILV ağı, proteinleri, lipitleri ve nükleik asitleri parçalamak, geri döndürmek veya ekzositozlamak için kullanılır. Endozomal sistem veya endositik yol içerisinde endozomlar erken endozomlar, geç endozomlar ve geri dönüşüm endozomlar olmak üzere farklı bölümlere ayrılır (Grant & Donaldson, 2009). ILV'lerin multiveziküler cisimler (MVB'ler) içindeki oluşumu, ekzosomların biyogenezinin başlangıcıdır. ILV oluşumu iki farklı süreç gerektirir. İlk olarak endozom zarı tetraspaninler açısından oldukça zenginleşecek şekilde yeniden düzenlenir. İkincisi de AP-3 yolağıdır (Pols & Klumperman, 2009).

Multiveziküler cisimler, sınırlayıcı membranın bazı kısımları intralümenal veziküller (ILV'ler) oluşturmak üzere kompartmanın lümenine doğru invaginasyon yaptığı ve tomurcuklandığında oluşan geç endozomal yapılardır. Bu işlem sırasında, transmembran proteinleri ve lipitlerin bir alt kümesi bu keseciklere ayrılır. Lizozomlar/vakuoller ile füzyon üzerine, ILV'ler bölmenin hidrolitik lümenine maruz kalır ve hem ILV kargo proteinlerinin hem de lipitlerin bozulmasına neden olur (Woodman & Futter, 2008; Davies & ark., 2009). Bu nedenle MVB yolu, ökaryotik hücrelerde önemli bir transmembran proteini ve lipid dönüşüm sistemini oluşturur (Babst, 2011).

Araştırılan membran proteinlerinin çoğunluğunda, MVB'lerin lümenal keseciklere ayrılması, ubikuitininin hedef proteinlerin lizin kalıntılarına eklenmesi anlamına gelen ubikuitinasyon ile gerçekleştirilir. Bu ubikuitin etiketleri, toplu olarak Taşıma için Gerekli Endosomal Ayırma Kompleksi (ESCRT'-The endosomal sorting complex required for transport) olarak adlandırılan ve ubikuitinlenmiş kargolara bağlanan ve bunların oluşan ILV'lere uygun şekilde ayrılmasını sağlayan bir grup protein kompleksi tarafından tanınır (Hanson, Shim & Merrill, 2010).

ESCRT, membran boyunlarının içeriden kesilmesine aracılık etmek için ATPase VPS4 ile işbirliği yapan protein alt komplekslerinin (ESCRT I-III) bir birleşimidir (Christ & ark., 2017). Eksozomların taşınması için ise endozomal sınıflandırma kompleksleri (ESCRT'ler), ILV oluşum bölgesine alınır (Colombo & ark., 2013; Wollert & Hurley, 2010). ILV'lerin MVB'lere dönüşümü, biri ESCRT bağımlı ve diğeri ESCRT'den bağımsız olmak üzere iki farklı yolla gerçekleşir (Ho, Chaiswing & St. Clair, 2022).

Eksozomlardaki belirteçler sitozolik proteinleri içerirken, mikropartikül belirteçleri transmembran veya lipide bağlı proteinleri içerir (Ho, Chaiswing & St. Clair, 2022). EV'lerin incelendiği çalışmalarda en az üç pozitif belirteç kullanılması tavsiye edilir. Ayrıca bu belirteçlerden en az birinin sitozolik bir protein ve birinin de bir transmembran proteini olması gerekir. Ayrıca, izole edilmiş örnekte ne kadar kontaminasyonun mevcut olduğunu belirtmek için negatif veya kontaminasyon protein belirtecini kullanılması da önerilir. Özetle, EV'lerin protein kompozisyonunu incelemek için en az üç pozitif belirteç ve bir negatif (kontaminasyon) işaretleyici gereklidir (They & ark., 2018).

MVB'ler, hücrenin endositik ve trafik fonksiyonlarında rol oynar (Borges, Reis & Schor, 2013). Özellikle, proteinlerin sınıflandırılması, geri dönüştürülmesi, depolanması, taşınması ve salınması süreçlerinde rol alırlar (Borges, Reis & Schor, 2013). Mikroveziküler cisimciklerin kaderini belirleyen faktörler henüz tam aydınlatılmamıştır (Raposo & Stoorvogel, 2013). Ancak belirli bir mikroveziküler cisimciklerin kaderinin mikroveziküler cisimciklerdeki kolesterol seviyesine bağlı olduğunu gösteren çalışmalar yapılmış ve kolesterol açısından zengin bir vezikül salgılanırken, kolesterol içermeyen morfolojik olarak özdeş bir vezikül parçalanmak üzere lizozoma gönderildiği vurgulanmıştır (Möbius & ark., 2002).

Mikroveziküller

Eksozomların biyogenez şekli, doğrudan dışarıya doğru tomurcuklanma ve plazma zarının bölünmesi yoluyla ortaya çıkan keseciklerden farklıdır. Bu vezikülleri biyogenez tarzlarına göre ayırt etmek için adlandırılan ikinci sınıf veziküllere mikroveziküller denir (Cocucci, Racchetti & Meldolesi, 2009).

Mikroveziküller, eksozomlara göre boyut olarak daha büyüktür, ancak boyut aralıkları bu iki tip vezikül arasında örtüşmektedir. Bu sebeple, biyogenez mekanizması aralarındaki temel ayırt edici kriterdir (Akers & ark., 2013). Yaklaşık 100 ila 1 µm çapındaki mikroveziküler cisimcikler, plazma zarının dışa doğru tomurcuklanmasıyla oluşur ve doğrudan hücre dışı ortama salınır (Bebelmann & ark., 2018; Doyle & Wang, 2019; Raposo & Stoorvogel, 2013; Tricarico, Clancy & D'Souza-Schorey, 2017; Yáñez-Mó & ark., 2015; Zaborowski & ark., 2015).

MV oluşumunun mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır, ancak aktin ve mikrotübüller gibi hücre iskeleti bileşenlerinin yanı sıra moleküler motorlar (kinesinler ve miyozinler) ve füzyon makinelerinin (SNARE'ler ve bağlama faktörleri) gerekli olduğu bildirilmektedir (Cai & ark., 2007). Üretilen mikroveziküllerin sayısı donör hücresinin fizyolojik durumuna ve mikro ortamına bağlıdır. Benzer şekilde, tüketilen MV sayısının alıcı hücrelerin fizyolojik durumuna ve mikro ortamına bağlı olduğu da gösterilmiştir (Zaborowski & ark., 2015).

Apoptotic Cisimler

Apoptotik cisimler genellikle 1 ila 5 µm çapındadır ve apoptotik hücreler tarafından hücre dışı boşluğa salınır (Caruso & Poon, 2018). Bu cisimler, hücre kasıldıktan sonra artan hidrostatik basıncın bir sonucu olarak hücrenin plazma zarının hücre iskeletinden ayrılmasıyla oluşur (Wickman & ark., 2012). Apoptotik ölümün son aşaması olarak hücre, değişken sayıda apoptotik cisimlere bölünür. Bunlar, boyut ve içerik bakımından oldukça değişken olan ekstraselüler keseciklerdir (Hauser, Wang &

Didenko, 2017). Mikronükleuslar, kromatin kalıntıları, sitozol kısımları, bozulmuş proteinler, DNA fragmanları ve hatta sağlam organeller gibi çok çeşitli hücrel bileşenler içerebilirler (Battistelli & Falcieri, 2020).

Ekstraselüler Veziküllerin İçerikleri

Eksozomlar gibi, mikroveziküllerin içeriği oldukça zengin protein yapıları içermektedir. Mikrovezikülleri eksozomlardan ayırt edecek spesifik belirteçler bulunmamaktadır (Doyle & Wang, 2019; Jeppesen & ark., 2019). Ancak, mikroveziküllerin proteomik profilleri büyük ölçüde izolasyon yöntemine bağlı olsa da, biyogenez süreçlerinin bir sonucu olarak hücre kökenine bakılmaksızın mikroveziküllerde bulunan proteinler olan "işaretleyici proteinler" olarak adlandırılan bir protein kategorisi bildirilmektedir (Ostergaard & ark., 2012).

Mikroveziküller, hücrenin plazma zarının dışı doğru tomurcuklanmasıyla oluştuğundan, mikroveziküller esas olarak sitozolik ve plazma zarıyla ilişkili proteinler, özellikle tetraspaninler gibi plazma zarı yüzeyinde kümelendiği bilinen proteinleri içerirler (Doyle & Wang, 2019; Escola & ark., 1998; Zoller, 2009). Bu tür proteinlerin mikroveziküllerde hücre lizatına kıyasla 100 kat daha yüksek konsantrasyona sahip olabildiği rapor edilmiştir (Escola & ark., 1998; Zoller, 2009). Mikroveziküllerde yaygın olarak tanımlanan diğer proteinler arasında hücre iskeleti proteinleri, ısı şoku proteinleri, integrinler ve glikosilasyon ve fosforilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonları içeren proteinler bulunur (Di & ark., 2012; Heijnen & ark., 1999; Morello & ark., 2013). Mikroveziküllerin yüzeyindeki glikan bağlayıcı proteinler, mikroveziküllerin diğer hücreleri nasıl hedeflediğini ve onlarla nasıl etkileşime girdiğini anlamada önemli bir faktörlerdir (Christianson & ark., 2013; Doyle & Wang, 2019).

Ortalama 1-5 µm boyutlarında olan apoptotik cisimler tipik olarak diğer EV'lerden daha büyüktür ve programlanmış hücre ölümü süreci sırasında üretilir (Battistelli & Falcieri, 2020).

Apoptotik cisimlerin bileşimi, eksozomlar ve mikroveziküllerden çok farklıdır. Eksozomlar ve mikroveziküllerin aksine, apoptotik cisimler sağlam organeller, kromatin ve az miktarda glikolize edilmiş proteinleri içerir (Battistelli & Falcieri, 2020; Trajkovic & ark., 2008). Bu nedenle, çekirdek (yani histonlar), mitokondri (yani HSP60), Golgi aygıtı ve endoplazmik retikulum (yani GRP78) ile ilişkili proteinlerin daha yüksek seviyelerinin gözlemlenmesi beklenebilir. Ayrıca, apoptotik cisimlerin ve hücre lizatının proteomik profilleri oldukça benzerdir. Aksine, eksozomlar ve hücre lizatı proteomik profilleri arasında keskin farklılıklar vardır (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018).

Ekstraselüler Veziküllerin Biyolojik İşlevleri

Eksozomların başlangıçta hücrel atık kaynağı veya hücrelerin gereksiz veya istenmeyen materyalden kurtulmasının bir yolu olduğu düşünülmüştür. Ancak geçen süreçte eksozomların hücre-hücre iletişimine, hücre onarımı ve tümör gelişimine katıldığı gösterilmiştir. Ayrıca, eksozomların antijen sunan veziküller gibi davranarak immün yanıtı uyardığı da bulunmuştur. (Bobrie & ark., 2011; Chaput & Théry, 2011)

Eksozomlar gibi mikroveziküllerin de hücrenin istenmeyen materyalden kurtulacağı bir hücrel boşaltma veya bakım mekanizması olduğu düşünülmüş (Yáñez-Mó & ark., 2015), ancak, mikroveziküllerin (ve eksozomların) yerel ve uzak hücreler arasındaki hücre-hücre iletişimde rol oynadığı anlaşılmış, EV'lerin hedef alıcı hücreyi değiştirme konusundaki etkileri gösterilmiştir (Harding, Heuser & Stahl. 2013).

Eksozomlar, çeşitli intralüminal kesecikleri sıralayan düzenleyen ve bunları lizozomlar ve hücre yüzeyi membranları da dahil olmak üzere uygun yerlere yönlendiren membranöz bir bölme olan endozomal ağ içinde oluşturulur. Endozomlar bunu yaparken, bazı proteinleri/lipitleri lizozomal bozunma için hedeflerken diğerlerini geri dönüşüm veya ekzositoz için hedefler (Akers ve ark., 2013).

EV'lerin biyolojik amacına ilişkin bu yeni çalışmalar, EV'lerin teşhis ve tedavi potansiyeli konusunda büyük bir ilgi uyandırmıştır (Skog & ark., 2008). Hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve doğrudan etkileşim gibi hücre-hücre iletişiminin diğer biçimleri ve çok hücreli organizmaların nasıl tek bir sistem olarak işlev görebileceği konularının aydınlatılmasında önemli rol oynamaktadır (Yáñez-Mó & ark., 2015).

EV'lerin en önemli özellikleri, aktif kargoyu (proteinler, nükleik asitler ve lipitler) paketleyip bunu komşu veya uzaktaki başka bir hücreye iletme ve bu teslimatla alıcı hücrenin fonksiyonlarını değiştirme yeteneğine sahip olmalarıdır (Zaborowski & ark., 2015). Fizyolojik olarak sağlıklı hücreler arasında bu tür iletişim biçimleri meydana gelirken, kanser hücreleri gibi hastalıklı hücrelerin aktif mekanizmalarını EV'lerde paketlediği, bunu sağlıklı hücrelere taşıdığı ve böylece kanser metastazında rol oynadığı bildirilmektedir (Hood, San & Wickline, 2011; Rak, 2010). Bu sebeple de MV'nin ve eksozomal oluşumun ve düzenlemenin daha iyi anlaşılması, kanser gelişimi ve ilerlemesinde kritik bir rol oynadıkları için, kanser tedavileri için umut verici yeni bir seçenek sunabileceği bildirilmektedir (Doyle & Wang, 2019). Eksozomların biyobelirteç taşıyıcıları olarak kullanılması umut vadetmelerinin sebebi, bu veziküler kan ve idrar gibi vücut sıvılarında bulunur ve bu da invaziv olmayan "sıvı biyopsi" tipi yöntemlerle tanı koymaya ve hatta hastanın tedaviye yanıtını izlenmesine olanak tanır. Eksozomların hastaların tedavisine vereceği yanıtın bu şekilde izlenmesi, bu veziküllerin klinik olarak bir başka potansiyel uygulamasıdır (Sonoda & ark., 2009).

Eksozomların klinik ortamda çok çeşitli potansiyel uygulamaları ve kullanımları olsa da, eksozomların biyobelirteç ve aşı olarak kullanılmasına yönelik FDA ve diğer düzenleyici kurumların gerekliliklerini karşılamak amacıyla eksozom izolasyonu ve analizi için daha standartlaştırılmış yöntemlere ihtiyaç duyulmuş (Raposo & Stoorvogel, 2013), bu amaçla güncel kaynaklar yayınlanmıştır (Thery & ark., 2018).

Eksozomlar, çeşitli hücreler tarafından salgılanan nano ölçekli hücre dışı keseciklerdir ve tümör mikroçevresindeki (TME) biyoaktif maddeleri taşıyarak hücreler arası iletişimde ve epigenetikte önemli bir rol oynarlar. Dolaşımsal RNA (circRNA), eksozomlar açısından geniş çapta zenginleştirilmiş ve eksozomların aracılık ettiği çeşitli patofizyolojik süreçlerde yer alan, spesifik bir yapıya sahip, kodlamayan bir RNA (ncRNA) türüdür. Eksozomal circRNA'lar, Gastrik kanserin epitelyal-mezenkimal geçişini, anjiyogenezini, çoğalmasını, istilasını, göçünü ve metastazını düzenleyerek gastrik kanser gelişiminde kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (Han & ark., 2023).

Artan kanıtlar, hücre dışı veziküllerin (EV'ler) miktarı ve bileşimindeki değişikliklerin, immün baskılayıcı tümör mikroçevrenin yeniden şekillenmesine katkıda bulunduğunu ve dolayısıyla immünoterapinin etkinliğini etkilediğini göstermektedir. Bu bilgiler, klinikte immün duyarlılık için EV'lerin kullanılmasına yönelik çalışmaları arttırmıştır (Yue & ark., 2023).

Ekstraselüler Veziküllerin Biyogenezi, Taşınması, Alımı ve Bozulması

Ekstraselüler oluştuktan sonra, mikroveziküller plazma zarından kopar, oysa eksozom salgılanması, ILV'lerle (eksozom olarak) hücre dışı ortama kaynaşmak ve salmak için mikroveziküllerin plazma zarına taşınmasını ve yerleştirilmesini gerektirir. Bunların salgılanmasına yol açan farklı hücre içi olaylar, her iki ekstraselüler vezikül türü için de üretim ve salınımları arasında bir zaman farkı oluşmasına neden olabilir (Doyle & Wang, 2019). Kargoların yalnızca mikrovezikülleri hedef almak için plazma zarında kalması gerektiğinden ve sonraki salınımları doğrudan mikroveziküllerin oluşumunu ve bölünmesini takip ettiğinden, mikroveziküllerin salınımı muhtemelen daha hızlı olur. Buna karşılık, eksozomların salınmasının daha yavaş olması sözkonusudur (Doyle & Wang, 2019).

Mikroveziküller öncelikle bozunma için lizozomlarla kaynaşmaya yöneliktir. Ancak bunların bozulmasını önleyen ve mikrovezikül salgılanmasına izin veren, böylece eksozom salınımını sağlayan mekanizmalar mevcuttur. Mikroveziküllerin, parçalayıcı ve salgılayıcı kapasiteleri arasındaki dengenin düzenlenmesi büyük ölçüde araştırılmamıştır, ancak bu dengenin kurulması şüphesiz hücre fonksiyonunu etkileyebilir (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018). Örneğin, eksozom salgılanmasını teşvik eden lizozomal bozunma kusurlarının, nörodejeneratif hastalıklar bağlamında amiloidler gibi istenmeyen ve/veya kusurlu proteinlerin etkili bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağladığı gösterilmiştir (Alvarez-Erviti, & ark., 2011; Eitan & ark. 2016). Multiveziküler endozomları salgılama ve bozunma için hedefleme arasındaki dengenin nasıl kurulduğuna dair bazı bilgiler yakın zamanda ortaya çıkmıştır. EV'ler aynı zamanda taşıma kapasiteleri ve kan-beyin bariyeri gibi biyolojik engelleri geçme yetenekleri nedeniyle ilaçlar ve nükleik asitler de dahil olmak üzere kargoyu hedeflenen doku veya organlara etkili bir şekilde ulaştırabilir (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018).

Ekstraselüler Veziküllerin -Hücresel Etkileşimi İçin Etki Faktörleri

EV, progenitör hücre ve alıcı hücre ile ilgili hücre yüzeyindeki karakteristik moleküller ve EV'lerin hücresel ortamları, EV-hücre sel etkileşimi için etki faktörleridir. Karakteristik yüzey molekülleri protein, lipit ve glikanı içerirken, hücre sel ortamlar sıcaklık, pH ve ekstraselüler matriksi içerir (Liu, & Wang, 2023).

Eksozomların hücreyi hedeflemesinde biyolojik ortamda eksozomların yönünü belirleyen, herhangi bir organa veya belirli bir hücre tipine doğru hareketine yol açtığını gösteren net bir kanıt olmadığı bildirilmekle birlikte (Mulcahy, Pink & Carter, 2014; Wiklander & ark., 2015), eksozomların çeşitli tipteki alıcı hücrelere seçici olmayan bir şekilde hedefleyebileceği göstermiştir (Horibe & ark, 2018). Bununla birlikte başka bir çalışma, hücre sel hedeflemenin morfojen gibi sinyal molekülleriyle olma ihtimalinin olduğunu ve kaynak-havuz mekanizmasının (source-sink

mekanizması) rol oynayabileceğini bildirmektedir (Takahashi & ark., 2013). Bu veriyi destekleyen biyodağılım çalışması, kırmızı kan hücresinden türetilen EV'lerin ağırlıklı olarak karaciğeri ve kemiği hedeflediğini (Yáñez-Mó & ark., 2015), melanomdan türetilen EV'ler esas olarak akciğerler ve dalak tarafından tutulduğunu göstermektedir (Takahashi & ark., 2013). Organ hedeflemenin yanı sıra, çeşitli çalışmalar EV'lerin donör hücrelerine dayalı doğal bir hedefleme yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (Luan & ark., 2017; Liu, & Wang, 2023). Mezenkimal kök hücrelerin, miRNA'ları EV'ler aracılığıyla glioblastoma (GBM) hücrelerine iletebildiğini göstermişlerdir (Sharif, Ghahremani & Soleimani, 2018). Bunun nedeninin, EV'lerin belirli reseptör hücrelere yönelik spesifikliğe sahip olan progenitör hücreyle ilgili spesifik lipit ve hücresel yapışma moleküllerini eksprese etmesi olabileceği vurgulanmaktadır (Liu, & Wang, 2023).

Hücre tipi spesifik hedefleme, reseptör-ligand bağlanmasıyla ilişkili olabilir. Bu durumda hücre/doku/organ hedeflemenin moleküler sinyallemeyle mi yoksa alıcı hücrelerin seçici alımıyla mı ilişkili olduğunun açıklığa kavuşturulmasını gerektirir (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018). Yapılan çalışmada, EV alımının esas olarak EV'ler ve reseptör hücreleri uygun ligand ve reseptörü paylaştığında meydana geldiği gösterilmektedir (Feng & ark., 2010). Hücre özgüllüğü hedeflemesinin, EV'lerin yüzeyinde zenginleştirilmiş ligandlar ile alıcı hücrelerin plazma zarındaki reseptörler arasındaki özel etkileşimler tarafından belirlenmesi muhtemeldir. Reseptör-ligand etkileşimi nedeniyle bağlanma özgüllüğüne dair kanıtlar hedefleme oryantasyonunun bağlanma özgüllüğü ile ilişkili olabileceğini gösterir (Mathieu & ark., 2019; Sharif, Ghahremani & Soleimani, 2018). Örneğin, nöroblastoma hücrelerinden gelen bir alt tip eksozom, amiloid öncü proteininin varlığından dolayı onları spesifik olarak nöronlara hedeflerken, başka bir eksozom alt tipi hem nöronlara hem de glial hücrelere bağlanır (Laulagnier & ark., 2018).

EV'lerin Hücre Membranlarına Bağlanması ve Etkileyen Faktörler

EV'ler, spesifik yüzey reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelere bağlanarak hücreSEL davranışı ve işlevi etkileyebilecek çeşitli hücre içi sinyal yollarını tetikler. EV'lerin hedef hücrelere bağlanması, EV membranı, protein, lipit ve glikan gibi bileşimler gibi çeşitli faktörleri içeren karmaşık bir süreçtir. Protein, lipit ve glikanlara ek olarak, hücreSEL çevre ve EV'lerin alım rotası ve EV'lerin boyutları bağlanmayı etkileyen önemli faktörlerdir (Liu, & Wang, 2023).

EV'lerin kökeni, türü ve özellikleri EV'nin boyutlarını etkiler (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018; Théry & ark., 2018). Örneğin, daha büyük EV'ler tipik olarak mikropartiküllerle ilişkilendirilirken, daha küçük EV'ler genellikle eksozomlarla ilişkilidir (van Niel, D'Angelo, & Raposo, 2018). Bu heterojenlik, hücreSEL etkileşimlerini etkileyebilir. EV bağlanma mekanizmalarını anlanması, hücreler arası iletişimi manipüle etmek ve hastalık teşhis ve tedavisini iyileştirmek için yeni stratejiler geliştirmek açısından kritik öneme sahiptir (Liu, & Wang, 2023).

Proteinler, protein-protein, protein-lipit ve protein-glikan etkileşimi yoluyla reseptör-ligand tanınmasına önemli ölçüde katkıda bulunan essential bileşenlerdir (Christianson & Belting, 2014; French, Antonyak & Cerione, 2017; Hoffmann, Ohlsen & Hauck, 2011; Johannes, Wunder & Shafaq-Zadah, 2016; Liu & Wang, 2023; Mathieu & ark., 2019; Mulcahy, Pink & Carter, 2014). Bağlanmaya katılan proteinler genel olarak tetraspaninler, lektinler, integrinler ve scaffold proteinleri gibi çeşitli gruplara ayrılabilir (French, Antonyak & Cerione, 2017; Gonda & ark., 2019; Jankovičová & ark., 2020; Liu, & Wang, 2023).

EV'lerde en yaygın olarak bulunan eksozomal proteinler anneksinler, tetraspaninler (CD63, CD81, CD82 ve CD9) ve ayrıca ısı şoku proteinleridir (Hsp60, Hsp70 ve Hsp90) (Valadi ve ark., 2007). Tetraspaninler EV'lerin yüzeyinde oldukça bol miktarda bulunur (Andreu & Yáñez-Mó 2014). CD9, CD63, CD81 ve CD82,

EV'lerin köklü belirteçleri olan geniş çapta dağılmış tetraspaninlerdir (Andreu & Yáñez-Mó 2014; Hassanpour & ark., 2020). Tetraspaninler biyobelirteç görevi görmekle birlikte, integrinler ve adezyon reseptörleri ile etkileşime girerek EV kenetlenmesinde, yerleşme ve alımında önemli bir rol oynar (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). Hücre içi adezyon molekülü gibi yapışma molekülleri, tümör mikroçevrede yaygın olarak bulunur ve eksozomların hedef hücelere, özellikle de bağışıklık hücelere bağlanmasında rol oynar (Rana & ark., 2012; Liangsupree & ark., 2022). EV'lerin yüzeyindeki tetraspanin, hedef hücre seçimine katkıda bulunur (Rana & ark., 2012).

Lipitler, EV'lerin zarındaki temel moleküllerdir ve EV'ler ile hücreler arasındaki etkileşimde çok önemli bir rol oynarlar (Record & ark., 2018). Membranöz lipitler, lipitlerin farklı yapılarına göre gliserofosfolipitler, sfingolipitler ve kolesterol olarak sınıflandırılabilir. Her lipit grubunun farklı varyasyonlarda karbon atomları ve çift bağlar içerirler (Skotland & ark., 2020).

Hem EV'lerin hem de alıcı hücelerin lipit bileşimi EV alım mekanizmasını büyük ölçüde etkiler. Çünkü lipitler EV'lerin hücelere alınmasına önemli ölçüde katkıda bulunur (Escrevente & ark., 2011). Lipidler ayrıca sinyalleri düzenleyebilir ve iletebilir. Bu şekilde de onkogenез ve metastazda yer alan hücre sinyal yollarını aktive edebilir (French, Antonyak & Cerione, 2017). Yüzey fosfatidilserin, hücresel iletişimde yer alan gliserofosfolipid çeşitidir (Wei & ark., 2016). Fosfatidilserin ve reseptörü Tim4 arasındaki etkileşim Ca^{2+} koordinelidir. Tim4'e ek olarak, ileri glikasyon son ürünleri, RAGE (He & ark., 2011), beyne özgü anjiyogenез inhibitörü 1, Bai-1 (Buzás & ark., 2018) ve stabilin-2 (Park & ark., 2008) gibi araştırılan birçok başka reseptör de vardır. Fosfatidilserin büyümenin durdurulmasına özgü protein 6, Gas6, tarafından dolaylı olarak tanınır. Fosfatidilserin-Gas6 kompleksi, makrofajların yüzeyindeki MER tirozin kinazlarını aktive ederek EV alımını tetikler ve antiinflamatuvar yanıtı neden olur (Graham & ark., 2014). Seramid, EV'lerin yüzeyinde zenginleştirilmiş kritik bir sfingolipittir ve hücre sinyal yollarını etkiler (Elsherbini & Bieberich, 2018).

Karbonhidrat yapıları, lipitlere ve proteinlere glikanlar halinde veya proteoglikanlarda tekrarlanan glikozaminoglikan zincirleri olarak konjuge olarak bulunur ve farklı boyutlarda oluşan bağlanmalar farklı işlevler gösterir. Bu işlevler hücre düzeyde tanıma olaylarını ve hem hücre içi trafiğin kontrolünü hem de bireysel proteinler düzeyinde katlanma olaylarının kalite kontrolünü içerir (Ghazarian, Itoni & Oppenheimer, 2011; Ohtsubo & Marth, 2006). Özellikle proteoglikanlar hücre dışı matrisin önemli bir bileşenidir ve doku mimarisi için gereklidir (Frantz & Stewart, 2010).

Glikanlar şeker-şeker ve şeker-protein reaksiyonlar ile EV'lerin hücrelere bağlanmasında hayati rol oynar (Gerlach & Griffin, 2016; Williams & ark., 2018). Proteoglikan (PG), ana yapısı glikozaminoglikan olan glikolizlenmiş bir proteindir (Cerezo-Magaña, Bång-Rudenstam & Belting, 2020; Iozzo & Schaefer, 2015). Proteoglikanlar, poliaminler, nükleik asit-peptit kompleksleri, katyonik lipitler, viral kapsid proteinleri ve apolipoproteinler gibi polibazik ligandlarla çok çeşitli bağlanma reaksiyonlarında rol oynar (Cerezo-Magaña, Bång-Rudenstam & Belting, 2020). Glikozidaz uygulamasının vezikül yükünde farklılıklar meydana getirdiği gösterilmiş ve glikanların, yük bazlı etkilerle, doğrudan glikan tanıma yoluyla veya her iki yolla birlikte, EV alımının düzenlenmesinde kilit oyuncular olduğu bildirilmiştir (**Williams** & ark., 2019). Ayrıca, proteoglikanların veya lektin gibi reseptörlerinin inhibe edilmesi EV alımının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Nishida-Aoki & ark., 2020; Atai & ark., 2013).

Proteoglikanların yanı sıra glikolipitler ve glikoproteinler de EV aracılı alım için bağlanma etkileşimine geniş ölçüde katılır. Ayrıca glikozile edilmiş sialik asit ve mannoz içeren glikoproteinler de EV bağlanma etkileşiminde yer alan glikan yapılarıdır ve EV alımını önemli ölçüde etkilerler (Fendl & ark., 2018).

EV'ler genellikle iletişim kurmak için uzun mesafeler kat ederler. Hücresel çevre, EV'ler ile hücre arasında, EV-hücre

etkileşiminde belirli bir düzeyde etkiye sahip araçtır (Stranford & ark., 2017). Hücresel ortam, ekstraselüler matriksin yanı sıra mikro çevreyi oluşturan, pH durumu, sıcaklık, oksidatif/hipoksik durum ve diğer faktörleri içerir. Bu koşulların modülasyonu EV alımını etkileyebilir. Örneğin, ekstraselüler matriksin sertliğindeki değişiklikler EV alımını modüle edebilir (Stranford & ark., 2017) ve hücre matriksin mekanik özellikleri, su geçirgenliği ile çapraz bağlanarak EV taşınmasını düzenleyebilir (Lenzini & ark., 2020).

EV'ler hedef hücrelerin yüzeyine bağlandıktan sonra, endositoz, füzyon ve sinyalleme gibi çeşitli alım mekanizmaları yoluyla hücre fenotipini etkileyebilir. Endositoz, EV'lerin sinyalleri iletmesi için yaygın kullandıkları yollarından biridir ve kltrin bağımlı yollar, kaveolin aracılı alım, makropinositoz, fagositoz ve lipid raft-aracılı alım dahil olmak üzere farklı yollardan gerçekleşir (Gurung & ark., 2021; Liu, & Wang, 2023).

EV'lerin alım yolları, EV'lerin özellikleri (yüzey proteini, lipid, glikan ve boyut), alıcı hücre ve hücre ortamı (örneğin pH ve sıcaklık) dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenir. Örneğin, eksozomların yüzeyindeki CD47, fagositoz yoluyla EV'lerin monositlere internalization üzerinde güçlü bir inhibitör etkiye sahiptir (Kamerkar & ark., 2017).

Kaynaklar

Akers, J.C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C.C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of neuro-oncology*, 113(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, 10, 619–624.

Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhali, S., & Wood, M. J. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature biotechnology*, 29(4), 341–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>

Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology*, 5, 442.

Atai, N. A., Balaj, L., van Veen, H., Breakefield, X. O., Jarzyna, P. A., Van Noorden, C. J., Skog, J., & Maguire, C. A. (2013). Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 115(3), 343–351.

Babst, M. (2011). MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current opinion in cell biology*, 23(4), 452–457. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.04.008>

Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, 9(1), 21.

Bebelman, M. P., Smit, M. J., Pegtel, D. M., & Baglio, S. R. (2018). Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer.

Pharmacology & Therapeutics, 188, 1–11.
doi:10.1016/j.pharmthera.2018.02.013

Bobrie, A., Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2011). Exosome secretion: Molecular mechanisms and roles in immune responses. *Traffic*, 12, 1659–1668.

Borges, F., Reis, L., & Schor, N. (2013). Extracellular vesicles: Structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 46, 824–830. doi:10.1590/1414-431X20132964

Buzás, E. I., Tóth, E. Á., Sódar, B. W., & Szabó-Taylor, K. É. (2018). Molecular interactions at the surface of extracellular vesicles. *Seminars in Immunopathology*, 40(5), 453–464. doi:10.1007/s00281-018-0682-0

Cai, H., Reinisch, K., & Ferro-Novick, S. (2007). Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental Cell*, 12, 671–682. doi:10.1016/j.devcel.2007.04.005

Caruso, S., & Poon, I. K. H. (2018). Apoptotic cell-derived extracellular vesicles: More than just debris. *Frontiers in Immunology*, 9, 1486.

Cerezo-Magaña, M., Bång-Rudenstam, A., & Belting, M. (2020). The pleiotropic role of proteoglycans in extracellular vesicle-mediated communication in the tumor microenvironment. *Seminars in Cancer Biology*, 62, 99–107.

Chaput, N., & Théry, C. (2011). Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology*, 33, 419–440. doi:10.1007/s00281-010-0233-9

Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E. M., Campsteijn, C., & Stenmark, H. (2017). Cellular functions and molecular mechanisms of the ESCRT membrane-scission machinery. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(1), 42–56. doi:10.1016/j.tibs.2016.08.016

Christianson, H. C., & Belting, M. (2014). Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biology*, 35, 51–55.

Christianson, H. C., Svensson, K. J., Van Kuppevelt, T. H., Li, J.-P., & Belting, M. (2013). Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17380–17385. doi: 10.1073/pnas.1304266110.

Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: Artefacts no more. *Trends in Cell Biology*, 19(2), 43–51. doi: 10.1016/j.tcb.2008.11.003.

Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., ... & Raposo, G. (2013). Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science*, 126(24), 5553–5565. doi: 10.1242/jcs.128868.

Davies BA, Lee JR, Oestreich AJ & Katzmann DJ. (2009). Membrane protein targeting to the MVB/lysosome. *Chem Rev*, 109:1575–1586. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

Di Vizio, D., Morello, M., Dudley, A. C., Schow, P. W., Adam, R. M., Morley, S., ... & Freeman, M. R. (2012). Large oncosomes in human prostate cancer tissues and in the circulation of mice with metastatic disease. *The American Journal of Pathology*, 181(5), 1573–1584. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.030.

Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells*, 8(7), 727. doi: 10.3390/cells8070727.

Eitan, E., Suire, C., Zhang, S., & Mattson, M. P. (2016). Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and

release. *Ageing research reviews*, 32, 65–74.
<https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.05.001>

Elsherbini, A., & Bieberich, E. (2018). Ceramide and exosomes: A novel target in cancer biology and therapy. *Advances in Cancer Research*, 140, 121–154.

Escola, J.M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O., & Geuze, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20121–20127. doi: 10.1074/jbc.273.32.20121.

Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 11, 108.

Fendl, B., Eichhorn, T., Weiss, R., Tripisciano, C., Spittler, A., Fischer, M. B., & Weber, V. (2018). Differential interaction of platelet-derived extracellular vesicles with circulating immune cells: Roles of TAM receptors, CD11b, and phosphatidylserine. *Frontiers in Immunology*, 9, 2797. doi: 10.3389/fimmu.2018.02797.

Feng, D., Zhao, W. L., Ye, Y. Y., Bai, X. C., Liu, R. Q., Chang, L. F., Zhou, Q., & Sui, S. F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(5), 675–687.

Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, 123, 4195–4200. doi: 10.1242/jcs.023820.

French, K. C., Antonyak, M. A., & Cerione, R. A. (2017). Extracellular vesicle docking at the cellular port: Extracellular vesicle binding and uptake. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 67, 48–55.

Gerlach, J. Q., & Griffin, M. D. (2016). Getting to know the extracellular vesicle glycome. *Molecular BioSystems*, 12(4), 1071–1081.

Ghazarian, H., Idoni, B., & Oppenheimer, S. B. (2011). A glycobiology review: Carbohydrates, lectins, and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, 113, 236–247.

Gonda, A., Kabagwira, J., Senthil, G. N., & Wall, N. R. (2019). Internalization of exosomes through receptor-mediated endocytosis. *Molecular Cancer Research*, 17(2), 337–347. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-0891.

Graham, D. K., DeRyckere, D., Davies, K. D., & Earp, H. S. (2014). The TAM family: Phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 14(12), 769–785.

Grant, B. D., & Donaldson, J. G. (2009). Pathways and mechanisms of endocytic recycling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(9), 597–608. doi: 10.1038/nrm2755.

Gurung, S., Perocheau, D., Touramanidou, L., & Baruteau, J. (2021). The exosome journey: From biogenesis to uptake and intracellular signaling. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 47. doi: 10.1186/s12964-021-00730-1.

Han, M., Zhang, M., Qi, M., Zhou, Y., Li, F., & Fang, S. (2023). Regulatory mechanism and promising clinical application of exosomal circular RNA in gastric cancer. *Frontiers in Oncology*, 13, 1236679. doi: 10.3389/fonc.2023.1236679.

Hanson PI, Shim S & Merrill SA. (2009). Cell biology of the ESCRT machinery. *Curr Opin Cell Biol*, 21, 568–574.

Harding, C., Heuser, J., & Stahl, P. (1984). Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: Demonstration of a pathway for receptor shedding. *European Journal of Cell Biology*, 35(2), 256–263.

Harmati, M., Gyukity-Sebestyen, E., Dobra, G., Janovak, L., Dekany, I., Saydam, O., Hunyadi-Gulyas, E., Nagy, I., Farkas, A., Pankotai, T., Ujfaludi, Z., Horvath, P., Piccinini, F., Kovacs, M., Biro, T., & Buzas, K. (2019). Small extracellular vesicles convey the stress-induced adaptive responses of melanoma cells. *Scientific Reports*, 9, 15329.

Hassanpour, M., Rezaie, J., Darabi, M., Hiradfar, A., Rahbarghazi, R., & Nouri, M. (2020). Autophagy modulation altered differentiation capacity of CD146+ cells toward endothelial cells, pericytes, and cardiomyocytes. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 139.

Hauser, P., Wang, S., & Didenko, V.V. (2017). Apoptotic bodies: Selective detection in extracellular vesicles. *Methods in Molecular Biology*, 1554, 193–200.

He, M., Kubo, H., Morimoto, K., Fujino, N., Suzuki, T., Takahashi, T., Yamada, M., Yamaya, M., Maekawa, T., Yamamoto, Y., & Yamamoto, H. (2011). Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Reports*, 12(4), 358–364. doi: 10.1038/embor.2011.28.

Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., & Sixma, J. J. (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: Microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*, 94, 3791–3799.

Ho, J., Chaiswing, L., & St. Clair, D.K. (2022). Extracellular Vesicles and Cancer Therapy: Insights into the Role of Oxidative Stress. *Antioxidants* **2022**, 11, 1194. <https://doi.org/10.3390/antiox11061194>

Hoffmann, C., Ohlsen, K., & Hauck, C. R. (2011). Integrin-mediated uptake of fibronectin-binding bacteria. *European Journal of Cell Biology*, 90(11), 891–896.

Hood, J., San, R.S., & Wickline, S.A. (2011). Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer Res*, 71, 3792–3801.

Horibe, S., Tanahashi, T., Kawauchi, S., Murakami, Y., & Rikitake, Y. (2018). Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake. *BMC Cancer*, 18(1), 47. doi: 10.1186/s12885-017-3958-1.

Hurley J. H. (2010). The ESCRT complexes. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 45(6), 463–487. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.502516>

Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, 42, 11–55.

Jankovičová J, Sečová P, Michalková K, & Antalíková J. (2020). Tetraspanins, More than Markers of Extracellular Vesicles in Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7568. doi: 10.3390/ijms21207568.

Jeppesen, D. K., Fenix, A. M., Franklin, J. L., Higginbotham, J. N., Zhang, Q., Zimmerman, L. J., Liebler, D. C., Ping, J., Liu, Q., Evans, R., Fissell, W. H., Patton, J. G., Rome, L. H., Burnette, D. T., & Coffey, R. J. (2019). Reassessment of exosome composition. *Cell*, 177(2), 428–445.e18.

Jin, Y., Ma, L., Zhang, W., Yang, W., Feng, Q., & Wang, H. (2022). Extracellular signals regulate the biogenesis of extracellular vesicles. *Biological Research*, 55(1), 35.

Johannes L, Wunder C, & Shafaq-Zadah M. (2016). Glycolipids and lectins in endocytic uptake processes. *Journal of Molecular Biology*, 428(24, Part A), 4792–4818.

Kamerkar, S., LeBleu, V. S., Sugimoto, H., Yang, S., Ruivo, C. F., Melo, S. A., Lee, J. J., & Kalluri, R. (2017). Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. *Nature*, 546(7659), 498–503. doi: 10.1038/nature22341.

Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F. J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., & Sadoul, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 46(2), 409–418.

Laulagnier, K., Javalet, C., Hemming, F. J., Chivet, M., Lachenal, G., Blot, B., Chatellard, C., & Sadoul, R. (2018). Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 75(4), 757–773.

Lenzini S, Bargi R, Chung G, & Shin JW. (2020). Matrix mechanics and water permeation regulate extracellular vesicle transport. *Nature Nanotechnology*, 15(3), 217–223.

Liangsupree, T., Multia, E., Forssén, P., Fornstedt, T., & Riekkola, M. L. (2022). Kinetics and interaction studies of anti-tetraspanin antibodies and ICAM-1 with extracellular vesicle subpopulations using continuous flow quartz crystal microbalance biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 206, 114151.

Liu, YJ., & Wang, C. (2023). A review of the regulatory mechanisms of extracellular vesicles-mediated intercellular communication. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 77. doi: 10.1186/s12964-023-01103-6.

Luan, X., Sansanaphongpricha, K., Myers, I., Chen, H., Yuan, H., & Sun, D. (2017). Engineering exosomes as refined biological nanoplatfroms for drug delivery. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(6), 754–763.

Mathieu, M., Martin-Jaular, L., Lavieue, G., & Théry, C. (2019). Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1), 9–17.

Morello, M., Minciacchi, V. R., de Candia, P., Yang, J., Posadas, E., Kim, H., Griffiths, D., Bhowmick, N., Chung, L. W.,

Gandellini, P., Freeman, M. R., Demichelis, F., & Di Vizio, D. (2013). Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(22), 3526–3536. doi: 10.4161/cc.26539

Möbius, W., Ohno-Iwashita, Y., Van Donselaar, E.G., Oorschot, V.M., Shimada, Y., Fujimoto, T., Heijnen, H.F., Geuze, H.J., & Slot, J.W. (2002). Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 50, 43–55.

Mulcahy, L.A., Pink, R.C., & Carter, D.R.F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 24641.

Nishida-Aoki, N., Tominaga, N., Kosaka, N., Ochiya, T. (2020). Altered biodistribution of deglycosylated extracellular vesicles through enhanced cellular uptake. *Journal of Extracellular Vesicles*, 9(1), 1713527.

Ohtsubo, K., & Marth, J.D. (2006). Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126, 855–867.

Ostergaard, O., Nielsen, C.T., Iversen, L.V., Jacobsen, S., Tanassi, J.T., Heegaard, N.H.H. (2012). Quantitative proteome profiling of normal human circulating microparticles. *Journal of Proteome Research*, 11, 2154–2163. doi: 10.1021/pr200901p.

Pan, B.T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., & Johnstone, R.M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *Journal of Cell Biology*, 101(3), 942–948.

Park, S. Y., Jung, M. Y., Kim, H. J., Lee, S. J., Kim, S. Y., Lee, B. H., Kwon, T. H., Park, R. W., & Kim, I.S. (2008). Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death and Differentiation*, 15(1), 192–201.

Peinado, H., Aleckovic, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., ... & Lyden, D. (2016). Melanoma

exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a prometastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6), 883–891.

Pols, M. S., & Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research*, 315(9), 1584–1592. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020

Rak, J. (2010). Microparticles in Cancer. *Semin. Thromb. Hemos*, 36, 888–906.

Rana, S., Yue, S., Stadel, D., & Zöller, M. (2012). Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(9), 1574–1584.

Raposo G., & Stoorvogel W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200, 373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138.

Record, M., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Wakelam, M. J. O. (2018). Extracellular vesicles: lipids as key components of their biogenesis and functions. *Journal of Lipid Research*, 59(8), 1316–1324.

Shah, R., Patel, T., & Freedman, J.E. (2018). Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *New England Journal of Medicine*, 379, 2180–2181.

Shao, H., Chung, J., Balaj, L., Charest, A., Bigner, D.D., Carter, B.S., Hochberg, F.H., Breakefield, X.O., Weissleder, R., & Lee, H. (2012). Protein typing of circulating microvesicles allows real-time monitoring of glioblastoma therapy. *Nature Medicine*, 18(12), 1835–1840.

Sharif, S., Ghahremani, M., & Soleimani, M. (2018). Delivery of exogenous miR-124 to glioblastoma multiform cells by Wharton's jelly mesenchymal stem cells decreases cell proliferation and migration, and confers chemosensitivity. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(2), 236–246.

Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., & Breakefield, X.O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12), 1470–1476.

Skotland, T., Sagini, K., Sandvig, K., & Llorente, A. (2020). An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159, 308–321.

Sonoda, H., Yokota-Ikeda, N., Oshikawa, S., Kanno, Y., Yoshinaga, K., Uchida, K., Ueda, Y., Kimiya, K., Uezono, S., Ueda, A., Ito, K., & Ikeda, M. (2009). Decreased abundance of urinary exosomal aquaporin-1 in renal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 297(4), F1006–F1016. doi: 10.1152/ajprenal.00200.2009.

Stranford, D.M., Hung, M.E., Gargus, E.S., Shah, R.N., & Leonard, J.N. (2017). A systematic evaluation of factors affecting extracellular vesicle uptake by breast cancer cells. *Tissue Engineering Part A*, 23(21-22), 1274–1282. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0158.

Takahashi, Y., Nishikawa, M., Shinotsuka, H., Matsui, Y., Ohara, S., Imai, T., & Takakura, Y. (2013). Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *Journal of Biotechnology*, 165(2), 77–84. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.03.013.

Théry C., Zitvogel L., & Amigorena S. (2002). Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology*, 2, 569–579. doi: 10.1038/nri855.

Thery, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8), 581–593.

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... & Zuba-Surma, E. K.

(2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.

Trajkovic, K., Hsu, C., Chiantia, S., Rajendran, L., Wenzel, D., Wieland, F., Schwille, P., Brügger, B., & Simons, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1244–1247. doi: 10.1126/science.1153124.

Tricarico, C., Clancy, J., & D'Souza-Schorey, C. (2017). Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases*, 8(4), 220–232.

Vader, P., Mol, E. A., Pasterkamp, G., & Schiffelers, R. M. (2016). Extracellular vesicles for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106(Pt A), 148–156. doi: 10.1016/j.addr.2016.02.006.

Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., & Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9, 654–659. doi: 10.1038/ncb1596.

van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19, 213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.

Wei, X., Liu, C., Wang, H., Wang, L., Xiao, F., Guo, Z., & Zhang, H. (2016). Surface Phosphatidylserine Is Responsible for the Internalization on Microvesicles Derived from Hypoxia-Induced Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Human Endothelial Cells. *PLoS One*, 11(1), e0147360. doi: 10.1371/journal.pone.0147360.

Wickman, G., Julian, L., Olson, M.F., & Olson, M. (2012). How apoptotic cells aid in the removal of their own cold dead bodies.

Cell Death and Differentiation, 19, 735–742. doi: 10.1038/cdd.2012.25.

Wiklander, O. P., Nordin, J. Z., O'Loughlin, A., Gustafsson, Y., Corso, G., Mäger, I., ... & Andaloussi, S. E. (2015). Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 26316. doi: 10.3402/jev.v4.26316.

Williams, C., Pazos, R., Royo, F., González, E., Roura-Ferrer, M., Martinez, A., ... & Falcón-Pérez, J.M. (2019). Assessing the role of surface glycans of extracellular vesicles on cellular uptake. *Scientific Reports*, 9(1), 11920. doi: 10.1038/s41598-019-48499-1.

Williams, C., Royo, F., Aizpurua-Olaizola, O., Pazos, R., Boons, G.J., Reichardt, N.C., ... & Falcon-Perez, J.M. (2018). Glycosylation of extracellular vesicles: current knowledge, tools and clinical perspectives. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1442985. doi: 10.1080/20013078.2018.1442985.

Wollert, T., & Hurley, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464(7290), 864–869. doi: 10.1038/nature08849.

Woodman, P.G., Futter, C.E. (2008) Multivesicular bodies: co-ordinated progression to maturity. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 408–414.

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., ... & De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066.

Yue, M., Hu, S., Sun, H., Tuo, B., Jia, B., Chen, C., ... & Hu, J. (2023). Extracellular vesicles remodel tumor environment for cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 22(1), 203.

Zaborowski, M.P., Balaj, L., Breakefield, X.O., & Lai, C.P.-K. (2015). Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*, 65, 783–797. doi: 10.1093/biosci/biv084.

Zoller, M. (2009). Tetraspanins: Push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nature Reviews Cancer*, 9, 40–55. doi: 10.1038/nrc2543.

BÖLÜM II

4-Hidroksi-2-Nonenal, Metabolizması ve Hastalıklarla İlişkisi

Burcu Menekşe BALKAN¹
Doğuş ÖZALKAN²

Giriş

Nefes almak, sindirim, zararlı maddelerin metabolize edilmesi, yağların enerjiye dönüştürülmesi gibi vücudumuzdaki gerçekleşen birçok doğal biyolojik süreç, serbest radikal olarak adlandırılan zararlı bileşiklerin üretilmesine neden olur (Kurutas, 2016; Sharifi-Rad & ark., 2020). Düşük ve orta miktarlarda serbest radikaller, hem homeostazisin korunmasını içeren süreçleri düzenlemede hem de çeşitli hücrel işlevlerde faydalıdır (Bhattacharyya & ark., 2014; Finkel & Holbrook, 2000; Sharifi-Rad & ark., 2020). Oluşan bu serbest radikaller genellikle vücudumuzun

¹ Doç. Dr. Burcu Menekşe BALKAN, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

² Doktora öğrencisi Doğuş ÖZALKAN, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı

doğal antioksidan mekanizmaları tarafından yok edilir. Yani oluşan serbest radikaller ve bunların ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidanlar bir denge halindedir. Ancak bu denge serbest radikallerin lehine bozulursa, serbest radikaller vücutta negatif bir zincirleme reaksiyonun oluşumunu tetikleyebilir. Meydana gelen bu reaksiyonlar özellikle hücre membranlarını tahrip eder ve enzimlerin aktivitelerinin bozar. Sonuç olarak da, yaşam için gerekli olan hücresel süreçlerin düzgün çalışmamasına neden olarak normal hücre bölünmesini engeller ve deoksiribonükleik asit (DNA) ve enerji üretimini engeller (Kurutas, 2016; Sharifi-Rad & ark., 2020).

Polisatüre yağ asitleri, peroksidasyona yatkın olup, oksidatif stres altında çeşitli bozunma ürünleri üretirler, bunların arasında ana α,β -doymamış hidroksialkenal olan 4-hidroksi-2,3-trans-nonenal (4-HNE) bulunur (Carini, Aldini & Facino, 2004). Yüksek reaktivitesi nedeniyle 4-HNE, hücrenin çeşitli makromolekülleri ile etkileşime girer ve bu genel toksisite, çeşitli patolojik durumlara katkıda bulunur. Ayrıca, artan kanıtlar, 4-HNE'nin oksidatif/elektrofilik stresin ikinci habercisi olarak elektrofilik sinyalleşmede daha spesifik bir işlevi olduğunu önermektedir (Valko & ark., 2007).

4-HNE oluşuktan sonra hücre tipine ve hücresel metabolik koşullara bağlı olarak hücrenin hayatta kalmasını veya ölümünü destekleyebilir (Ayala, Munoz & Arguelles, 2014). Bu derlemede, 4-HNE yapısı, metabolizması, 4-HNE ilişkili proteinlerin oluşumu ve 4-HNE'nin kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisindeki rolü tartışılmaktadır.

Oksidatif Stres ve Lipit peroksidasyonu

Oksidatif stres, redoks biyolojisi ve tıp alanındaki araştırmalara yönelik bir kavramdır ve normal redoks durumunu değiştiren reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimi ve bunların eliminasyonunun, ROS ve RNS'deki artışa bağlı olarak dengesizliğin olduğu anormal bir durumu temsil eder (Sies, 2015; Sies 2020; Augustine & ark., 2020).

ROS, oksijen içeren kimyasal olarak reaktif kimyasalları tanımlayan bir terimdir (D'Autréaux & Toledano, 2007). Genel olarak ROS, radikal olabilir ya da radikal olmayabilir. Biyolojik olarak önemli olan radikal ROS'lerine örnek olarak süperoksit radikalleri ($O^{\bullet 2-}$), hidroksil radikalleri ($\bullet OH$), hidroperoksil radikalleri ($HOO\bullet$), alkoksi radikalleri ($RO\bullet$) ve peroksil radikalleri ($ROO\bullet$) verilebilir (Augustine & ark., 2020). Radikal olmayanlar arasında hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3) ve nitrik oksit (NO) bulunur (Pinazo-Durán & ark., 2014).

Tüm serbest radikaller arasında $O^{\bullet 2-}$ en bol bulunanıdır ve $\bullet OH$ en zararlısıdır. Mitokondri sıklıkla solunum zinciri reaksiyonlarını gerçekleştirmesi ve hücre içi oksijenin çoğunu kullanması nedeniyle en fazla ROS kaynağıdır (Andreyev, Kushnareva & Starkov, 2005). Ayrıca endojen ROS'un diğer kaynakları arasında protoplazma (NADPH oksidazlar, hemoglobin, riboflavin), endoplazmik retikulum (Sitokromlar P450 ve b5), peroksizomlar (oksidazlar, flavoproteinler) ve lizozomlar (miyeloperoksidaz, metal iyonları) bulunur (Di Meo & ark., 2016).

Dış yörüngesinde en az bir eşleşmemiş elektron içeren serbest radikaller çok kararsız moleküllerdir. Aşırı oluşması durumunda, DNA, nükleik asitler, karbonhidratlar ve hücrel membranların önemli bir bileşeni olan çoklu doymamış yağ asitleri gibi makromoleküllerde reversibl veya irreversibl modifikasyonlara yol açar (Andreyev, Kushnareva & Starkov, 2005; Møller, Jensen, & Hansson, 2007; Yin, Xu & Porter, 2011). Reaktif oksijen türlerinin zararlı etkileri arasında, lipid peroksidasyonu, çeşitli ve çok sayıda patolojik duruma dahil olması nedeniyle daha fazla ilgi gören spesifik bir lipid oksidasyon sürecidir (Guéraud & ark., 2010). Lipid peroksidasyonu biyolojik olarak ilgili tipik bir serbest radikal zincir reaksiyonudur (Halliwell & Chirico, 1993). Diğer zincir reaksiyonları gibi lipid peroksidasyonu da başlama, yayılma ve sonlanma fazlarını içerir. Başlangıç adımında, $\bullet OH$ gibi serbest radikaller lipidlerden hidrojeni çıkarır. Hidrojen atomunun ayrılması lipidlerde bulunan metilen ($-CH_2-$) grubunda olur ve sonuçta

meydana gelen karbon merkezli bir lipid radikali ($-CH\cdot$ veya $L\cdot$)'dir (Ayala, Munoz & Arguelles, 2014; Catalá, 2006).

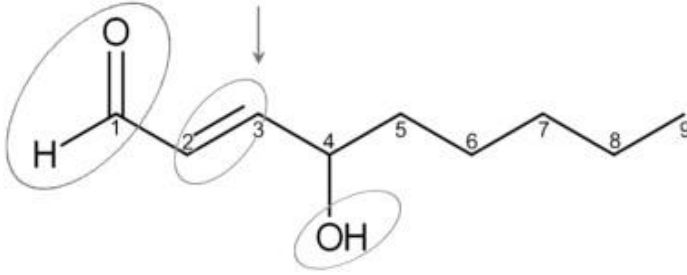
Doymamış yağ asitlerinin yapısında bulunan çift bağlar C-H bağlarının zayıflamasına neden olur ve bağların zayıflaması da hidrojenin uzaklaştırılmasını kolaylaştırır. Bu nedenle fosfolipidler, radikallere ve peroksidasyona duyarlıdır. Bunun yanında, serbest radikaller, çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) gibi karbon-karbon çift bağ(lar)ı içeren lipitlere saldırabilir ve lipit peroksidasyon ürünleri oluşturabilir (Ayala, Munoz & Arguelles 2014). Yayılma fazında, lipit radikali ($L\cdot$) oksijen oksijen ile birleşerek, oksijen merkezli bir lipitperoksil radikali ($LOO\cdot$) oluşturur. Oluşan lipit radikeli de kendisine en yakın yağ asidinden bir hidrojen atomu uzaklaştırarak, aynı döngünün sürekli devam etmesine neden olabilecek bir lipid hidroperoksit ($LOOH$) ve ikinci lipid radikalini ($L\cdot$) meydana getirir (Catalá, 2006; Forman, Zhang & Rinna, 2009). Sonlandırma fazında, antioksidanların veya lipit peroksil radikallerinin diğer radikallerle etkileşime girmesiyle stabil bir radikal olmayan madde oluşur ve zincir reaksiyon durdurulur. Meydana gelen $LOOH$, demir ve bakır gibi geçiş metallerinin etkisi ile indirgeyici bir kırılmaya uğrar ve sonuç olarak lipit alkoksil radikalini ($LO\cdot$) meydana getirir. Oldukça reaktif olan lipit alkoksil radikali de başka bir yağ asidinden bir hidrojen atomu çıkmasına neden olur. Bu şekilde giderek artan lipit peroksidasyonu da hücre membranlarının yapısının bozulmasına ve normal fonksiyon gösterememesine, hücrelerdeki organellerin bozulmasına, hücredeki diğer önemli biyolojik yapıların normal fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Lipid hidroperoksitler ($LOOH$), lipit peroksidasyonunun birincil ürünlerdir ve MDA, propanal, heksanal ve 4-HNE gibi ikincil aldehitlere dejenere olabilirler (Ayala, Munoz & Arguelles 2014). Reaktif karbonil türleri, serbest radikallerden daha stabil ancak daha toksiktir çünkü oluşum yerlerinden çok daha uzakta bulunan biyomolekül hedeflerine (proteinler, DNA ve aminofosfolipidler) saldırabilirler (Pamplona, 2011). Kısa zincirli karbonil türevleri, α , β -doymamış aldehitler, di-aldehitler ve

ketoaldehitler gibi çeşitli lipid aldehyitlerini içerir (Gianazza & ark., 2019). Bunlar arasında α , β -doymamış aldehyit 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) ve di-aldehyit malondialdehyit (MDA) en çok çalışılan ürünlerdir.

4-Hidroksi-2-Nonenal (4-HNE)

4-Hidroksi-2-nonenal bir α,β -doymamış aldehyittir. Molekül, birinci karbondan (C1) aldehyit grubu, ikinci (C2) ve üçüncü karbonları (C3) arasında çift bağ (alken) ve dördüncü karbonunda (C4) alkol olmak üzere üç fonksiyonel gruba sahiptir (Şekil 1). Karbon C1 ve C3 elektrofilik bölgelerdir ve karbon C1 aynı zamanda bir redoks merkezidir (Csala & ark., 2015).



Şekil 1. 4-Hidroksi-2,3-trans-nonenal kimyasal yapısı (Csala & ark., 2015)

4-HNE, nispeten büyük miktarlarda üretilen ve serbest radikallerin ikinci habercisi olarak hareket eden reaktif aldehyitlerden olduğu için en önemli ürünlerdendir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen verilerle lipid peroksitlerinden üretilen başlıca toksik ürünlerden biri olarak kabul edilmiştir (Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991). 4-HNE'nin yüksek toksisitesi, tiyollerle ve amino gruplarıyla hızlı reaksiyonlarıyla ilişkilidir (Sauerland & ark., 2021).

Hücre içi konsantrasyonuna bağlı olarak 4-HNE, hücre döngüsü düzenlemesini farklı şekilde etkileyebilir. 4-HNE'nin düşük konsantrasyonlarda hücrelerin çoğalmasına neden olduğu, ancak nispeten daha yüksek konsantrasyonlarda bu hücrelerde farklılaşmaya ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle

4-HNE'nin hücre içi konsantrasyonları sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. 4-HNE'nin oluşumu, hücresel redoks durumu seviyelerine bağlı kontrolsüz bir süreç olan LPO'dan kaynaklandığından, 4-HNE'nin hücre içi seviyeleri, metabolizması ve metabolitlerin hücrelerden eliminasyonu yoluyla kontrol edilmelidir (Cheng & ark., 2001)

Şimdiye kadar, proteinin yapısal doğasını ve LPO türevli aldehitler tarafından yapılan DNA modifikasyonunu belirlemeye yönelik çalışmalarda özellikle, oksidatif stresin en önemli aracısı olan, kolayca yayılabilen ve seçici bir elektrofil olan 4-HNE araştırılmıştır (Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991).

4-HNE oluşumu ve Metabolizması

4-HNE, serbest radikal saldırısına bağlı oksidasyon yoluyla (Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991) veya lipoksijenazlar tarafından enzimatik olarak araşidonik veya linoleik asitten türetilen bir α,β -doymamış aldehittir (Bilska-Wilkosz, Iciek & Górny, 2022). 4-HNE oluşumunda öne sürülen bir diğer yol, ağırlıklı olarak mitokondride bulunan linoleik asit bakımından zengin bir fosfolipit olan kardiyolipinin oksidasyonudur (Liu & ark., 2011).

Hücreler 4-HNE'yi kolayca metabolize eder. Metabolik eliminasyon hücre/doku tipine özgüdür (Schaur & ark., 2015). 4-HNE'nin detoksifikasyonu, glutatyon S-transferaz tarafından katalizlenen reaksiyon sonucu glutatyon ile konjugasyonu ve sırasıyla aldehit dehidrojenaz veya alkol dehidrojenaz tarafından oksidasyonu veya redüksiyonu sonucu gerçekleşir. Metabolik eliminasyon hücre/doku tipine özgüdür (Schaur & ark., 2015). 4-HNE'nin yaklaşık %2-8'inin proteinlerle reaksiyona girerek 4-HNE-protein eklentileri oluşturmak üzere serbest kaldığı tahmin edilmektedir (Siems ve Grune, 2003). Üç fonksiyonel grup (çift bağ, karbonil grubu ve hidroksil grubu) 4-HNE'nin elektrofilik yapısına ve yüksek reaktivitesine katkıda bulunur. Özellikle sistein (Cys), histidin (His), lizin (Lys) ve bir dereceye kadar proteinlerin arginin (Arg) kalıntıları ile hızla reaksiyona girerek Michael eklentileri veya

Schiff bazları oluşturur. Baskın reaksiyon, Cys> His >Lys>Arg reaktivite sırasına göre Michael eklentilerinin oluşumudur (Bruenner & ark., 1995; Doorn ve Petersen, 2002; Lesgards & ark., 2009). Nükleofilik amino asitlerle 4-HNE eklentilerinin oluşum hızı üzerine yapılan kinetik çalışmalar, pH bağımlılığı ve His, Lys veya tiyol kalıntıları yerine Cys tiyolat bölgelerinin tercih edildiğini göstermektedir (LoPachin, Geohagen, & Gavin, 2009). Fizyolojik koşullar altında, hücreler farklı kaynaklarda oluşan 4-HNE ile başa çıkmak zorundadır. En yaygın kaynak, lipid oksidasyonunu tetikleyen mitokondriyal elektron taşıma zinciri tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinden (ROS) gelen endojen kaynaktır. Hücreler ksenobiyotiklere maruz kaldığında, sitokrom P450 biyotransformasyon faaliyetleri de LPO'yu indükleyebilen ROS üretebilir. Bu nedenle, 4-HNE oluşumu ilaçlar veya etanol gibi çevresel kirleticilere maruz kalma ile ilişkilendirilmiştir (Poli & ark., 2008). İnflamasyonla ilişkili ROS da önemli bir 4-HNE kaynağıdır ve 4-HNE-protein eklentileri inflamatuvar hastalıklarda biyolojik belirteçlerdir (Uchida & ark., 1994).

Eksojen 4-HNE, hücrelerin maruz kaldığı başka bir yoldur. 4-HNE, gıdalarda bulunan hem demiri, diyetle alınan çoklu doymamış lipidleri oksitleyebilir (Wang & ark., 2012a). Bağırsak hücreleri de eksojen 4-HNE'nin ana hedefleridir çünkü lümenle ara yüzeydedirler ve doğrudan yüksek 4-HNE konsantrasyonlarına maruz kalabilirler. Dahası, 4-HNE bağırsak mikrobiyotası tarafından enfekte edilen makrofajlar tarafından üretilir ve bu şekilde üretilen 4-HNE kolon hücreleri için toksik olabilir (Esterbauer, Schaur, & Zollner, 1991). 4-HNE yüksek oranda yayılabilen bir molekül olduğundan, ilk üretim bölgesinin ötesine yayılabilir. Difüzyon kapasitesine dayanarak, 4-HNE'nin parakrin bir sinyal molekülü olarak hareket edebileceği öne sürülmüştür (Parola & ark., 1999).

Aerobik koşullar altında yaşamın doğasında var olan bazal ROS seviyesi nedeniyle, hücrede bazal bir 4-HNE seviyesi olmalıdır. İnsan kanı ve serumundaki 4-HNE konsantrasyonunun yaklaşık 0,05-0,15 μM olduğu tahmin edilmektedir (Smathers &

ark., 2012), ancak patolojik durumlarda ve LPO bölgelerinin çekirdeğine yakın yerlerde konsantrasyonu büyük ölçüde artabilir (100 µM'den fazla) (Grune & ark., 1997).

Memelilerde hücresel metabolizmanın 4-HNE'yi metabolize etme temel amacı, aldehitlerle oluşan lipid peroksidasyon ürünleri tarafından verilebilecek hasardan proteinleri korumaktır (Siems & Grune, 2003). HNE'nin metabolizmasında rol alan en önemli enzimler glutatyon-S transferazlar (GST), alkol dehidrojenazlar (ADH) ve aldehit dehidrojenazlardır (ALDH). Stres seviyelerine göre 4-HNE metabolizmasında bu enzimatik reaksiyonlar yoluyla üretilen HNE'nin birincil ara maddeleri, 1,4-dihidroksi-2-nonen (DHN), 4-hidroksi-2-nonenik asit (HNA) ve 4-HNE-glutatyon konjugat ürünleridir (Castro & ark., 2017).

Sinyal molekülü olarak 4-HNE

HNE'nin hücreyi, enzimlerin inaktivasyonu, hücre içi glutatyonun tükenmesi ve DNA ve protein sentezinin inhibisyonu dahil olmak üzere birçok şekilde etkilediği bildirilmektedir. HNE'nin aynı zamanda hücre içi sinyal iletim yollarını tetikleyerek biyolojik yanıtları modüle edebileceğini göstermektedir (Iles & ark., 2005).

Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (Nrf2)

4-HNE'nin ana endojen elektrofilik bileşik olarak ana hedefi Keap1-Nrf2-ARE (Kelch ECH associating protein 1-nuclear factor erythroid 2-related factor 2-antioxidant response element) yoludur (Csala & ark. 2015). Bu yol, prooksidan etkileri algılar ve oksidan veya elektrofil strese karşı hücresel tepkiyi düzenler. Stresiz koşullar altında son derece sistein açısından zengin Keap1, Nrf2'yi bağlayarak ubikitilasyon ve proteozomal bozulmaya yönlendirir. Keap1'in sistein kalıntıları elektrofilik saldırılara karşı duyarlıdır. Yüksek konsantrasyonlarda elektrofiller neredeyse tamamen sisteinil tiyollerle eklentiler oluştururken, düşük konsantrasyonlarda tiyollerin belirli bir alt kümesiyle reaksiyona girdiği belirtilmiştir

(Levonen & ark., 2014; Kobayashi & ark., 2009). Keap1'in 4-HNE de dahil, alkenalleri, NO ve Zn²⁺'yi sisteinler ve bazik amino asitlerden oluşan üç farklı sensörle doğrudan tanıdığı bildirilmiştir (McMahon & ark., 2010).

Farklı çalışmalarla Nrf2'nin 4-HNE bağımlı indüksiyonunu göstermiştir (Siems ve Grune, 2003). Fizyolojik koşullarda, Nrf2, baskılayıcı protein Keap1 tarafından sitoplazmada tutulur, ancak oksidan uyarılara yanıt olarak Nrf2 aktive olur ve nükleusa taşınarak DNA içindeki antioksidan yanıt elementi (ARE) ile bağlanarak antioksidan genlerin transkripsiyonunu sağlar (Gan & Johnson, 2014). Daha detaylı olarak, HNE gibi elektrofiller, Keap1'in tiyol gruplarıyla reaksiyona girer, bu da Cul3'ün ayrışmasına veya Nrf2'nin kısmi ayrılmasına neden olur. Her iki durumda da Nrf2, ubiquinasyondan kaçır ve ortamda birikir ve çekirdeğe doğru yer değiştirir, burada antioksidan yanıt elemanlarına (ARE'ler) bağlanır ve Nrf2 hedef genlerinin ekspresyonunu artırır. Nrf2'nin protein kinazlar tarafından fosforilasyonu aynı zamanda Keap1-Nrf2 kompleksinin ayrışmasını destekler (Csala & ark., 2015).

Nrf2-ARE yolu, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diyabet ve enfeksiyöz hastalıklar gibi farklı patolojik durumlarda önemli bir rol oynar (Ayala, Munoz & Arguelles, 2014).

Aktivasyon protein-1 (AP-1)

Aktivasyon protein-1 (AP-1), temel bölge-lösin fermuar proteinlerinden oluşan bir dimerdir. AP-1 transkripsiyon faktörleri hücre proliferasyonunu, hayatta kalma ve ölümü kontrol eder. 4-HNE'nin hücre sinyalleme sürecinde AP-1 'in dahil olduğu birçok çalışmada, 4-HNE'nin AP-1'i yukarı yönlü regüle ettiğini göstermiştir (Braithwaite, Mattie, & Freedman, 2010). AP-1'in aktivasyonu, 4-HNE tarafından indüklenen Glutasyon (GSH) içeriğinde bir artışa yol açabilir (Forman, Dickinson, & Iles, 2003).

Nükleer faktör kapaB (NF-κB)

NF-κB, bağışıklık tepkileri, inflamasyon, hücre proliferasyonu ve apoptoz gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyen bir dimerik transkripsiyon faktörüdür. NF-κB protein kompleksi, inhibe edici IκB ailesi proteinlerine sitoplazmada bağlanarak aktif olmayan bir durumda tutulur (Morgan ve Liu, 2011). Oksidatif stres gibi çeşitli hücreSEL uyarıcılar, IκB'ler fosforile edilir, bu da onları ubiquitin-proteazom sistemi tarafından parçalanmaya karşı duyarlı hale getirir. Bu, NF-κB kompleksinin nükleer translokasyonuna ve hedef genlerinin çeşitli promotör bölgelerine bağlanarak ilgili genlerin transkripsiyonunu indüklemesine yol açar. Bu genlerin çoğu, inflamasyonun düzenlenmesinde rol oynayan genlerdir (Morgan ve Liu, 2011).

Peroksizom proliferatör-aktive edici reseptör (PPAR)

Lipit metabolizması, mitokondriyal biyogenez ve antioksidan savunmanın ana transkripsiyonel düzenleyicileri olarak işlev görürler (Yang & Long, 2018). PPAR'ların 4-HNE ile etkileşimi/modülasyonu incelenmiştir (Barrera & ark., 2008). 4-HNE, adipositlerde PPAR ekspresyonunu arttırmış ve adiponektin proteininin parçalanmasını hızlandırmıştır (Wang & ark., 2012b).

Mitojen-aktivasyonlu protein kinazlar (MAPK)

Mitojenle aktifleşen protein kinazlar (MAPK), 4-HNE tarafından aktive edilen sinyal iletim yolları arasındadır. Bu nedenle MAPK yolları, 4-HNE'den etkilenen birçok hücreSEL fonksiyona aracılık etmede önemli bir rol oynayabilir. MAPK, spesifik tirozin ve treonin kalıntıları üzerindeki ikili fosforilasyonla aktive edildiği bildirilmiştir. MAPK, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar 1 ve 2'yi (ERK1/2), p38 MAP kinazları, c-Jun N-terminal kinazları (JNK) ve büyük MAPK'yı içerir. MAPK, oksidatif stres de dahil olmak üzere çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak aktive edilir. Anahtar transkripsiyon faktörlerini fosforile edip aktive ederler, böylece

birçok genin transkripsiyonunu düzenlerler (Torres & Forman, 2003).

4-HNE'nin Hastalıklardaki Rolü

Miyokardiyal hastalıklar (Mali ve Palaniyandi 2014; Nakamura & ark., 2002), kanser (Bartsch ve Nair, 2006; Chang & ark., 2005; Cheng & ark., 2001; Karihtala & ark., 2011; Marquez-Quiñones & ark., 2010; Nair, Bartsch, & Nair, 2007; Oberley, Toyokuni & Szweda, 1999; Ramana, Tammali, & Srivastava, 2010; Skrzydlewska & ark., 2001; Tammali & ark., 2006), nörodejeneratif Hastalıklar (Ando & ark., 1998; Jomova & ark., 2010; Kelly & ark., 2005; Markesbery ve Lovell, 1998; Martinez-Vicente & ark., 2008; Mattson & Chan, 2003; Morel & ark., 1998; Perluigi, Coccia, & Butterfield, 2012; Shibata & ark., 2001; Sultana, Perluigi, & Butterfield, 2013; Xiang & ark., 2013; Zarkovic K. 2003) gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

4-HNE ve Miyokardiyal Hastalıklar

Miyokarda enerji kullanımı, çoğunlukla miyokard mitokondrilerinde gerçekleşen oksidatif fosforilasyona bağlıdır. Yüksek miyokardiyal oksidatif kapasite, sürekli ROS üretimi ve ikincil 4-HNE üretimi için bir kaynaktır (Mali ve Palaniyandi 2014). Normal koşullarda, kalpteki 4-HNE, aldehit dehidrojenazlar (ALDH'ler), glutatyon S-transferazlar ve aldoz redüktaz tarafından nötralize edilir (Ayala, Munoz & Arguelles, 2014; Roede ve Jones, 2010). Ancak, miyokard iskemi reperfüzyonu, kalp yetmezliği, doksorubisin toksisitesi ve diyabet gibi çeşitli patolojik durumlarda metabolik kapasiteyi aşabilir ve artan 4-HNE oluşumuna ve sonuç olarak miyokardiyal işlev bozukluğuna yol açabilir (Mali ve Palaniyandi, 2014). Bu nedenle miyokard, 4-HNE birikimi ve toksisitesi birçok kalp hastalığıyla ilişkilendirilerek hasar görmüş insan miyokardında oksidatif stresin yükseldiği gösterilmiştir (Nakamura & ark., 2002). 4-HNE-modifiye protein seviyesi, dilate kardiyomiyopati hastalarında kontrol grubuna kıyasla 5 kat daha yüksek bulunmuş ve endojen antioksidan kapasitesi olan bir beta

bloker olan karvedilol, 4-HNE seviyelerini %40 azaltarak kalp yetmezliği semptomlarının fonksiyonel iyileşmesini sağlamıştır (Nakamura & ark., 2002).

4-HNE ve Kanser

4-HNE'nin lipid peroksidasyonu ile ilişkili olarak mutajenik ve kanserojenik etkilere katkıda bulunduğu kabul edilmektedir (Nair, Bartsch, & Nair, 2007). 4-HNE ve ilgili biyoaktif metabolitleri, DNA'ya zarar verebilir ve enflamasyon kaynaklı kanserlerde pro-mutajenik lezyonların oluşumuna yol açabilir (Bartsch ve Nair, 2006). Bazı çalışmalarda protein- 4-HNE eklentilerinin oluşumunun böbrek ve kolon kanserinin ilerlemesiyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Oberley, Toyokuni & Szweda, 1999; Skrzydlewska & ark., 2001). Ratlar ile yapılan çalışmada 4-HNE artışının hepatokarsinogenez başlangıcıyla ilişkili olduğu ve 4-HNE -protein modifikasyonunun karaciğer kanseri başlangıcına yol açabilen hücresel bozuklukların potansiyel bir mekanizması olabileceği gösterilmiştir (Marquez-Quiñones & ark., 2010; Chang & ark., 2005). Yapılan son çalışmalarda, insan kolon kanseri hücrelerinde baskılanmış Glutatyoni 4-HNE (GS-4-HNE); (ADH+Glutatyoni) GS-DHN'nin kanserojenik sinyalleri iletebileceğini göstermektedir (Tammali & ark., 2006; Ramana, Tammali, & Srivastava, 2010). Ayrıca, 4-HNE ve GS-4-HNE'yi etkili bir şekilde azaltan biyolojik etkenlerin ortadan kaldırılmasıyla, kolon kanseri büyümesini ve metastazını önlediği gösterilmiştir (Tammali & ark., 2011). 4-HNE'yi GS-4-HNE'ye konjuge eden Glutatyoni S- Transferaz (GST)' lerin aşırı ekspresyonunun, K562 lösemi hücrelerinde UV kaynaklı sitotoksisteden hücreleri koruduğu gösterilmiştir (Cheng & ark., 2001).

4-HNE ve Nörodejeneratif Hastalıklar

Yaşayan dokunun oksidatif strese karşı duyarlılığı, büyük ölçüde lipit peroksidasyona duyarlılığına bağlıdır ve bu da büyük ölçüde PUFA seviyelerine bağlıdır. Düşük PUFA seviyeleri kanser hücrelerinde olduğu gibi oksidatif strese karşı artan bir direnç

sağlayabilir. Ancak nöronlar gibi belirli hücre tipleri, 4-HNE öncü maddesi omega-6 yağ asitlerinin yüksek seviyelerini içeren PUFA zengini membran bölgelere sahiptir. Redoks geçişlerine katılan metal iyonlarının yoğunluğu ve yoğun oksijen tüketimiyle birleştiğinde, beyin dokusu serbest radikallerin ve 4-HNE ile ilişkili dejeneratif bozuklukların ana hedefi haline gelir (Perluigi, Coccia, & Butterfield, 2012; Sultana, Perluigi, & Butterfield, 2013).

Alzheimer Hastalığı

Alzheimer Hastalığı (AD), beynin sinir dokusunun parçalandığı bir nörodejeneratif durumdur ve bu durum zamanla öğrenme, düşünme ve hafızayı azaltır (Finkel, 2000). Son çalışmalar, oksidatif stresle oluşan toksik aldehitler ile AD'nin olası nedenleri arasındaki ilişkiyi belirlemiştir (Hayashi & ark., 2007; Gonfloni & ark., 2012). 4-HNE'nin nörotoksik olduğu bulunmuş, çünkü yüksek 4-HNE seviyeleri AD hastalarının beyin dokularında ve ventriküler sıvısında rapor edilmiş ve artmış nöronal apoptozis ile ilişkilendirilmiştir (Markesbery ve Lovell, 1998; Ando & ark., 1998). Ayrıca, beta-amiloid ve 4-HNE arasında pozitif ilişki olduğu ve değişikliklerinin amiloid birikimlerine bağlı toksisiteye katkıda bulunabileceği bulunmuştur (Jomova & ark., 2010). 4-HNE histidin'e karşı antikorların nörofibriller demetler ve yaşlı plakların beta-amiloid çekirdeğiyle tepkili olduğu saptanmıştır (Shibata & ark., 2001). 10 μ M'den az konsantrasyonlarda 4-HNE'nin Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesini bozduğu, glikoz taşıyıcısı GLUT3'ün kovalent modifikasyonunu bozarak glikoz taşımamasını engellediği, nöronal savunmasızlığın arttığı, ekzitotoksisiteye yol açtığı ve AD hastalarının nöron ve sinaptosomlarında mitokondriyal fonksiyonu bozduğu gösterilmiştir (Lu & ark., 2001; Mattson & Chan, 2003). Ayrıca, 4-HNE'nin doğrudan GTP bağlayıcı protein Gq11'e bağlanarak kortikal nöron kültürlerinde muskarinik kolinerjik reseptörlerin Gq11'e bağlanmasını bozduğu gösterilmiştir ve bu durum AD ile önemli bir ilişkiye sahiptir (Kelly & ark., 2005).

Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PD), en yaygın olarak bradikinezi ve dinlenme tremorları belirtileriyle bilinir ve ikinci en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. PD, beyindeki putamen ve substantia nigra bölgesinde bulunan Lewy cisimlerinin hastalığın histolojik belirteçleri olarak ortaya çıkmasıyla kendini gösterir. Lewy cisimlerinin önemli bir bileşeni mitokondriyal ve sinaptik vezikül oluşumuyla ilişkili protein olan α -sinükleindir (α -sin). α -sin'in oksidasyonu ve nitratlanması, 4-HNE'nin oluşum kapasitesini etkilediği gösterilmiştir (Xiang & ark., 2013). ROS tarafından oluşturulan oksidatif modifikasyonlar da otofajik mekanizmayı bozarak α -sin yıkımını azaltır (Martinez-Vicente & ark., 2008). Buna ek olarak lipid peroksidasyonunda α -sin türevlerinin ortaya çıkmasına yol açar. 4-HNE- α -sin, büyük ölçüde oligomerleşme potansiyeline sahiptir. Bu nedenle bu kompleksin agregasyonu tetiklediği düşünülmektedir (Xiang & ark., 2013). Bu sürecin patolojik ilerlemesindeki rolü, Lewy cisimlerinin 4-HNE ile pozitif boyandığının gösterilmesiyle güçlendirilmiştir (Zarkovic K. 2003). Doğrudan α -sin ilişkisinin yanı sıra, 4-HNE'nin dopamin taşımasıyla da ilişkili olduğu bulunmuştur. Dopamin taşıyıcıya bağlanma ve dopamin alımını inhibe etme, dopamin bağımlı ve dopamin salgılayan nöronların kaybına katkıda bulunur (Morel & ark., 1998). Bu da PD'nin ilerlemesine yol açar.

KAYNAKÇA

1. Ando, Y., Brännström, T., Uchida, K., Nyhlin, N., Näsman, B., Suhr, O., Yamashita, T., Olsson, T., El Salhy, M., Uchino, M., & Ando, M., (1998) Histochemical detection of 4-hydroxynonenal protein in Alzheimer amyloid. *Journal of the neurological sciences*, 156(2), 172–176.
2. Andreyev, AY., Kushnareva, YE., & Starkov, AA., (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70:200–14.
3. Augustine, J., Troendle, EP., Barabas, P., McAleese, CA., Friedel, T., & Stitt, AW., et al., (2020) The role of lipoxidation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Front Endocrinol*, 11:621938.
4. Ayala, A., Munoz, MF., & Arguelles, S., (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 360438.
5. Barrera, G., Toaldo, C., Pizzimenti, S., Cerbone, A., Pettazzoni, P., Dianzani, M., U., & Ferretti, C., (2008) The Role of PPAR Ligands in Controlling Growth-Related Gene Expression and their Interaction with Lipoperoxidation Products. *PPAR research*, 524671.
6. Bartsch, H., & Nair, J., (2006) Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck's archives of surgery*, 391(5), 499–510.
7. Bhattacharyya, A., Chattopadhyay, R., Mitra, S., & Crowe, S., E., (2014) Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews*, 94(2), 329–354.

8. Bilska-Wilkosz, A., Iciek, M., & Górný, M., (2022) Chemistry and Biochemistry Aspects of the 4-Hydroxy-2,3-transnonenal. *Biomolecules*, 12(1), 145.
9. Braithwaite, E., K., Mattie, M., D., & Freedman, J., H., (2010) Activation of metallothionein transcription by 4-hydroxynonenal. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 24(5), 330–334.
10. Bruenner, B.A., Jones, A.D., & German, J.B., (1995) Direct characterization of protein adducts of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal using electrospray mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol*, 8, 552–559.
11. Carini M., Aldini, G., & Facino, R.M., (2004) Mass spectrometry for detection of 4- hydroxy-trans-2- onenal (HNE) adducts with peptides and proteins., *Mass Spectrom Rev.*, 23:281–305
12. Castro, J., P., Jung, T., Grune, T., & Siems, W., (2017) 4-Hydroxynonenal (4-HNE) modified proteins in metabolic diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 309-315.
13. Catalá A., (2006) An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 38(9), 1482-1495.
14. Chang, B., Nishikawa, M., Nishiguchi, S., & Inoue, M., (2005) L-carnitine inhibits hepatocarcinogenesis via protection of mitochondria. *International journal of cancer*, 113(5), 719–729.
15. Cheng, J.Z., Sharma, R., Yang, Y., Singhal, S. ., Sharma, A., Saini, M., Singh, S.V., Zimniak, P., Awasthi, S., & Awasthi, Y.C. (2001). Accelerated metabolism and exclusion of 4-hydroxynonenal through induction of RLIP76 and hGST5.8 Is an early adaptive response of cells to heat and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41213-41223.

16. Csala, M., Kardon, T., Legeza, B., Lizák, B., Mandl, J., Margittai, É., Puskás, F., Száraz, P., Szelényi, P., & Bánhegyi, G., (2015). On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1852(5), 826–838.
17. D'Autréaux, B., & Toledano, M.B., (2007) ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 813–24.
18. Di Meo, S., Reed, T.,T., Venditti, P., & Victor, V.,M., (2016) Role of ROS and RNS sources in physiological and pathological conditions. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 1245049.
19. Doorn, J.A., & Petersen, D.R., (2002) Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chem. Res. Toxicol*, 15, 1445–1450.
20. Esterbauer, H., Schaur, R.,J., & Zollner, H., (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine*, 11(1), 81–128.
21. Finkel L.H., (2000) Neuroengineering models of brain disease. *Annual review of biomedical engineering*, 2, 577–606.
22. Finkel, T., & Holbrook, N.J., (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing., *Nature*, 408, 239–247.
23. Forman, H.J., Dickinson, D.A., & Iles, K.E., (2003) 4-HNE-signaling pathways leading to its elimination. *Molecular aspects of medicine*, 24(4-5), 189–194.
24. Forman, H.J., Zhang, H., & Rinna, A., (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Asp Med*, 30:1–12.
25. Gan, L., & Johnson, J., A., (2014) Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(8), 1208–1218.

26. Gianazza, E., Brioschi, M., Fernandez, A.,M., & Banfi, C., (2019) Lipoxidation in cardiovascular diseases. *Redox Biol*, 23:101119.
27. Gonfloni, S., Maiani, E., Di Bartolomeo, C., Diederich, M., & Cesareni, G., (2012) Oxidative Stress, DNA Damage, and c-Abl Signaling: At the Crossroad in Neurodegenerative Diseases?. *International journal of cell biology*, 683097.
28. Grune, T., Michel, P., Sitte, N., Eggert, W., Albrecht-Nebe, H., Esterbauer, H., & Siems, W., (1997) Increased levels of 4-hydroxynonenal modified proteins in plasma of children with autoimmune diseases. *Free radical biology & medicine*, 23(3), 357–360.
29. Guéraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, PM., & Huc, L., et al., (2010) Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*, 44,1098–124.
30. Halliwell, B., & Chirico, S., (1993) Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, 57, 715S–24S.
31. Halliwell, B., & J., Gutteridge, M.,C., (1999) Free Radicals in Biology and Medicine. In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Eds., *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, 1-25.
32. Hayashi, T., Shishido, N., Nakayama, K., Nunomura, A., Smith, M., A., Perry, G., & Nakamura, M., (2007) Lipid peroxidation and 4-hydroxy-2-nonenal formation by copper ion bound to amyloid- β peptide. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(11), 1552-1559.
33. Iles, K.E., Dickinson, D.A., Wigley, A.F., Welty, N.E., Blank, V., & Forman, H. J. (2005). HNE increases HO-1 through activation of the ERK pathway in pulmonary epithelial cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 39(3), 355.

34. Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M., & Valko, M., (2010) Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Molecular and cellular biochemistry*, 345(1-2), 91–104.
35. Karihtala, P., Kauppila, S., Puistola, U., & Jukkola-Vuorinen, A., (2011) Divergent behaviour of oxidative stress markers 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) in breast carcinogenesis. *Histopathology*, 58, 854–862.
36. Kelly, J., F., Storie, K., Skamra, C., Bienias, J., Beck, T., & Bennett, D., A., (2005) Relationship between Alzheimer's disease clinical stage and Gq/11 in subcellular fractions of frontal cortex. *Journal of neural transmission*, 112, 1049-1056.
37. Kobayashi, M., Li, L., Iwamoto, N., Nakajima-Takagi, Y., Kaneko, H., Nakayama, Y., Eguchi, M., Wada, Y., Kumagai, Y., & Yamamoto, M. (2009) The antioxidant defense system Keap1-Nrf2 comprises a multiple sensing mechanism for responding to a wide range of chemical compounds. *Molecular and cellular biology*, 29(2), 493–502.
38. Kurutas, E., B., (2016) The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*, 15(1), 71.
39. Lesgards, J. F., Frayne, I. R., Comte, B., Busseuil, D., Rhéaume, É., Tardif, J. C., & Des Rosiers, C. (2009) Differential distribution of 4-hydroxynonenal adducts to sulfur and nitrogen residues in blood proteins as revealed using Raney nickel and gas chromatography–mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(10), 1375-1385.
40. Levonen, A.L., Hill, B.G., Kansanen, E., Zhang, J., & Darley-Usmar, V.M., (2014) Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: implications for electrophile therapeutics. *Free Radic. Biol. Med.*, 71, 196-207.

41. Liu, W., Porter, N.A., Sc4-HNEider, C., Brash, A.,R., & Yin, H., (2011) Formation of 4-hydroxynonenal from cardiolipin oxidation: Intramolecular peroxy radical addition and decomposition. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(1):166-78.
42. LoPachin, R.,M., Geohagen, B.,C., & Gavin, T., (2009) Synaptosomal Toxicity and Nucleophilic Targets of 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Toxicological Science*, 107(1), 171–181.
43. Mali, V.,R., & Palaniyandi, S.,S., (2014) Regulation and therapeutic strategies of 4-hydroxy-2-nonenal metabolism in heart disease. *Free radical research*, 48(3), 251–263.
44. Markesbery, W.,R., & Lovell, M.,A., (1998) Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 19(1), 33–36.
45. Marquez-Quiñones, A., Cipak, A., Zarkovic, K., Fattel-Fazenda, S., Villa-Treviño, S., Waeg, G., Zarkovic, N., & Guéraud, F., (2010) 4-HNE-protein adducts formation in different pre-carcinogenic stages of hepatitis in LEC rats. *Free radical research*, 44(2), 119–127.
46. Martinez-Vicente, M., Tallozy, Z., Kaushik, S., Massey, A., C., Mazzulli, J., Mosharov, E., V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D., C., Follenzi, A., Dauer, W., Przedborski, S., Ischiropoulos, H., Lansbury, P., T., Sulzer, D., & Cuervo, A., M., (2008) Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *The Journal of clinical investigation*, 118(2), 777–788.
47. Mattson, M.,P., & Chan, S.,L., (2003) Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease. *Cell calcium*, 34(4-5), 385–397.
48. McMahan, M., Lamont, D.J., Beattie, K.A., & Hayes, J.D., (2010) Keap1 perceives stress via three sensors for the

endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107, 18838-18843.

49. Møller, I., M., Jensen, P., E., & Hansson, A., (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual review of plant biology*, 58, 459–481.
50. Morel, P., Tallineau, C., Pontcharraud, R., Piriou, A., & Huguet, F., (1998) Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochemistry international*, 33(6), 531–540.
51. Morgan, M.,J., & Liu, Z.,G., (2011) Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling. *Cell research*, 21(1), 103–115.
52. Nair, U., Bartsch, H., & Nair, J., (2007) Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free radical biology & medicine*, 43(8), 1109–1120.
53. Nakamura, K., Kusano, K., Nakamura, Y., Kakishita, M., Ohta, K., Nagase, S., .& Ohe, T., (2002) Carvedilol decreases elevated oxidative stress in human failing myocardium. *Circulation*, 105(24), 2867-2871.
54. Oberley, T., D., Toyokuni, S., & Szweda, L.I., (1999) Localization of hydroxynonenal protein adducts in normal human kidney and selected human kidney cancers. *Free radical biology & medicine*, 27(5-6), 695–703.
55. Pamplona, R., (2011) Advanced lipoxidation end-products. *Chem-Biol Interact*, 192:14–20.
56. Parola, M., Bellomo, G., Robino, G., Barrera, G., & Dianzani, M.,U., (1999) 4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications. *Antioxidants & redox signaling*, 1(3), 255–284.

57. Perluigi, M., Coccia, R., & Butterfield, D.,A., (2012) 4-Hydroxy-2-nonenal, a reactive product of lipid peroxidation, and neurodegenerative diseases: a toxic combination illuminated by redox proteomics studies. *Antioxidants & redox signaling*, 17(11), 1590–1609.
58. Pinazo-Durán, MD., Gallego-Pinazo, R., García-Medina, JJ., Zanón-Moreno, V., Nucci, C., & Dolz-Marco, R., et al., (2014) Oxidative stress and its downstream signaling in aging eyes. *Clin Interv Aging*, 9:637–52.
59. Poli, G., Schaur, R.,J., Siems, W.,G., & Leonarduzzi, G., (2008) 4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest. *Medicinal research reviews*, 28(4), 569–631.
60. Ramana, K.,V., Tammali, R., & Srivastava, S.,K., (2010) Inhibition of aldose reductase prevents growth factor-induced G1-S phase transition through the AKT/phosphoinositide 3-kinase/E2F-1 pathway in human colon cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 9(4), 813–824.
61. Roede, J.,R., & Jones, D.,P., (2010) Reactive species and mitochondrial dysfunction: mechanistic significance of 4-hydroxynonenal. *Environmental and molecular mutagenesis*, 51(5), 380–390.
62. Sauerland, M., Mertes, R., Morozzi, C., Eggler, A.,L., Gamon, L.,F., & Davies, M.,J., (2021) Kinetic assessment of Michael addition reactions of alpha, beta-unsaturated carbonyl compounds to amino acid and protein thiols. *Free Radic. Biol Med*, 169, 1–11.
63. Schaur, R.,J., Siems, W., Bresgen, N., & Eckl, P.,M., (2015) 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules*, 5, 2247–2337.
64. Sharifi-Rad, M., Anil Kumar, N., V., Zucca, P., Varoni, E., M., Dini, L., Panzarini, E., Rajkovic, J., Tsouh Fokou, P., V., Azzini, E., Peluso, I., Prakash Mishra, A., Nigam, M., El

- Rayess, Y., Beyrouthy, M., E., Polito, L., Iriti, M., Martins, N., Martorell, M., Docea, A., O., Setzer, W., N., & ... Sharifi-Rad, J., (2020) Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in physiology*, 11, 694.
65. Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S., & Kobayashi, M., (2001) Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Brain research*, 917(1), 97–104.
66. Siems, W., & Grune, T., (2003) Intracellular metabolism of 4 hydroxynonenal. *Molecular aspects of medicine*, 24(4-5), 167-175.
67. Sies, H., (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 4:180–3.
68. Sies, H., (2020) Oxidative stress: concept and some practical aspects. *Antioxidants (Basel)*, 9:852.
69. Skrzydlewska, E., Stankiewicz, A., Sulkowska, M., Sulkowski, S., & Kasacka, I., (2001) Antioxidant status and lipid peroxidation in colorectal cancer. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 64(3), 213–222.
70. Smathers, R.,L., Fritz, K.,S., Galligan, J.,J., Shearn, C.,T., Reigan, P., Marks, M.,J., & Petersen, D.,R., (2012) Characterization of 4-HNE modified L-FABP reveals alterations in structural and functional Dynamics. *PLoS One*, 7(6), e38459.
71. Sultana, R., Perluigi, M., & Butterfield, D., A., (2013) Lipid peroxidation triggers neurodegeneration: a redox proteomics view into the Alzheimer disease brain. *Free radical biology & medicine*, 62, 157–169.

72. Tammali, R., Ramana, K., V., Singhal, S., S., Awasthi, S., & Srivastava, S., K., (2006) Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer research*, 66(19), 9705–9713.
73. Tammali, R., Reddy, A.,B., Srivastava, S.,K., & Ramana, K.,V., (2011) Inhibition of aldose reductase prevents angiogenesis in vitro and in vivo. *Angiogenesis*, 14(2), 209–221.
74. Torres M., & Forman H.J., (2003) Redox signaling and the MAP kinase pathways. *BioFactors*. 17:287–296.
75. Uchida, K., Toyokuni, S., Nishikawa, K., Kawakishi, S., Oda, H., Hiai, H., & Stadtman, E.,R., (1994) Michael addition type 4-hydroxy-2-nonenal adducts in modified low-density lipoproteins: markers for atherosclerosis. *Biochemistry*, 33, 12487–12494.
76. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.,T., Mazur, M., & Telser, J., (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 9:44–84.
77. Wang, X., Yang Y., Moore, D.,R., Nimmo, S.,L., Lightfoot, S.,A., & Huycke, M.,M., (2012a) 4-hydroxy-2-nonenal mediates genotoxicity and bystander effects caused by *Enterococcus faecalis*-infected macrophages. *Gastroenterology*, 142, 543–551.
78. Wang, Z., Dou, X., Gu, D., Shen, C., Yao, T., Nguyen, V., Braunschweig, C., & Song, Z., (2012b) 4-Hydroxynonenal differentially regulates adiponectin gene expression and secretion via activating PPAR γ and accelerating ubiquitin-proteasome degradation. *Molecular and cellular endocrinology*, 349(2), 222–231.
79. Xiang, W., Schlachetzki, J., C., Helling, S., Bussmann, J., C., Berlinghof, M., Schäffer, T., E., Marcus, K., Winkler, J.,

- Klucken, J., & Becker, C., M., (2013) Oxidative stress-induced posttranslational modifications of alpha-synuclein: specific modification of alpha-synuclein by 4-hydroxy-2-nonenal increases dopaminergic toxicity. *Molecular and cellular neurosciences*, 54, 71–83.
80. Yang, Q., & Long, Q., (2018) PPAR δ , a Potential Therapeutic Target for Heart Disease. *Nuclear receptor research*, 5, 101375.
81. Yin, H., Xu, L., & Porter, N.,A., (2011) Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*, 111:5944–72.
82. Zarkovic, K., (2003) 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Molecular aspects of medicine*, 24(4-5), 293–303.

BÖLÜM III

Polifenollerin Anti-Kanser Etkisi

Dilek Nur BESTİL¹
Hamdi UYSAL²

Giriş

Kanser, önde gelen ölüm nedenleri arasında yer almaktadır. Kanser, somatik hücre mutasyonu ve anormal hücre büyümesi ile karakterize bir hastalık grubudur. Neoplastik hücreler, metastaz yapma ve vücuttaki diğer dokuları istila etme potansiyeline sahiptir. Kanser oluşumuna ve kansere bağlı ölümlere neden olan yaşam tarzı faktörleri arasında; sağlıksız beslenme, obezite (%30-35), enfeksiyonlar (%15-20), radyasyon (%10) ve fiziksel aktivite eksikliği yer almaktadır (Anand & ark., 2008).

¹ Doktora Öğrencisi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası, dileknurbestil@gmail.com

² Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, huyosal@veterinary.ankara.edu.tr

Kanser oluşumu, normal bir hücrenin kötü huylu bir neoplastik hücreye dönüşmesiyle sonuçlanan hücresel ve moleküler olayları içeren çoklu aşamadan oluşan bir süreçtir. Kanser oluşumunun erken olayları, normal bir hücrenin neoplastik duruma transferinin moleküler, hücresel ve patolojik özelliklerine dayalı olarak iyi tanımlanmış üç aşamaya ayrılmakta ve bu üç aşama başlangıç, gelişim ve ilerleme aşamaları olarak tanımlanmaktadır. Başlangıç, dönüşüm sürecinin ilk adımıdır ve normal bir hücre genomik DNA mutasyonunu sürdürdüğünde gerçekleşmektedir. Başlangıçta bir hücrenin oluşumu, fiziksel kanserojenlerin (UV ışığı ve radyasyon) yanı sıra kimyasal kanserojenlerin genomik DNA ile etkileşimi yoluyla meydana gelebilmektedir. Ek olarak, hasarlı DNA'nın yanlış onarımı yoluyla kendiliğinden oluşan mutasyonlar da kanser oluşturma potansiyeli taşıyan hücreler üretebilmektedir. Oksidatif stres (OS) ve ortaya çıkan onarılmamış DNA, spontan mutasyonların ana kaynağı gibi görünmektedir. Başlangıç evresindeki hücrelerin oluşumunun ardından, fizyolojik endojen faktörlerin yanı sıra kimyasallara maruz kalma, tümörün ilerlemesi süreci yoluyla hücrenin seçici klonal büyümesine neden olmaktadır (Klaunig,2018).

Gelişim aşaması, DNA hasarı içermeyen epigenetik bir süreçtir. Gelişim aşamasının ayırt edici özelliği, hücre bölünmesi yoluyla preneoplastik hücre sayılarında artışa veya hücre ölümünde (apoptoz) azalmaya neden olan gen ifadesinin modifikasyonudur. Kanser başlanması ve ilerlemesi, yalnızca edinilmiş genetik değişiklikler tarafından değil, aynı zamanda gen ekspresyonunun epigenetik modifikasyonları tarafından da yönlendirilmektedir (Choi & ark.,2013). Çoklu hücre bölünmesini takiben, bazı preneoplastik hücrelerdeki ek genomik değişiklikler, iyi huylu veya kötü huylu neoplazmaların oluşmasına neden olmakta ve bu son aşama, ilerleme aşaması olarak adlandırılmaktadır (Klaunig,2018).

Kanser tedavisinde kullanılan çeşitli kemoterapötik ajan vardır. Bunlar; platin bileşikleri, sisplatin, oksaliplatin ve karboplatin gibi ilaçlardır. Taksanlar (paklitaksel, docetaxel, cabacitaxel ve nab-paclitaxel), çeşitli tümörleri tedavi etmek için

kullanılan antimikrotübül ajanlardır. Vinkristin, vinka alkaloidleri arasında en nörotoksik olanıdır. Bortezomib, carfilzomib ve ixazomib, lenfoid tümörlerin ve multipl miyelomun tedavisinde kullanılan ve periferik nöropati ile ilişkili olan proteozom inhibitörleridir (Milkovic & ark., 2014). Çoğu kemoterapötik ajan, nöronal mitokondrilerde hasar oluşturarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) artışına bağlı olarak oksidatif stresi arttırmaktadır. ROS üretimindeki patolojik artış, enzim, protein ve lipid molekülleri gibi hücre içi biyomoleküllerde hasara neden olabilir, bu da demiyelinizasyona ve periferik sinirlerin hücre iskeletinin bozulmasına neden olmakta ve ayrıca sinyal iletim süreçlerini hassaslaştırmaktadır. ROS, apoptotik yolları aktive ederek proinflamatuvar mediatörleri yükseltmektedir. Bu süreçler, ROS üretimini ve oksidatif stresin patolojik süreçlerini artırarak mitokondride daha fazla hasara neden olabilmektedir (Starobova & ark.,2017).

Normal ve kanser hücrelerinin farklı redoks durumu, bu parametrenin redoks sinyalinin düzenlenmesine dayalı yeni umut verici terapötik stratejilerin tasarımı için kullanılmasına izin vermekte ve geleneksel terapötik strateji, ROS oluşumunu artıran ve kanser hücrelerinde apoptotik hasara neden olan ilaçlara dayanmaktadır. Ancak bu terapötik yaklaşımın normal dokularda çeşitli toksik yan etkilerin gelişmesi gibi ciddi bir dezavantajı vardır (Jelic & ark.,2021). Kemorezistans mekanizması tam olarak bilinmemekte ancak kanser hücrelerinde artan Glutatyon (GSH) seviyelerinin neden olduğu düşünülmektedir. Özellikle, indirgenmiş glutatyonun elektrofilik konjugasyonunu katalize eden enzimler olan glutatyon S-transferazların (GST) ve ayrıca akış pompalarının aşırı ekspresyonu, çeşitli anti-kanser ilaçların reaktivitesini azaltabilir (Reuter & ark.,2010).

Akdeniz diyeti ile beslenmenin kanseri önleyici etkisi bulunmaktadır. Diyetin yararlı etkileri, hem hayvan modellerinde hem de insanlarda antitümör aktiviteleri olan polifenoller ile ilişkilendirilebilir. Son birkaç yılda doğal polifenollere artan ilgi, bu bileşiklerin kimyasal ve biyolojik fonksiyonları ve insan- hayvan

sağlığı üzerindeki yararlı etkileri açısından anlaşılmasına katkıda bulunmuştur (Mileo & ark.,2016). Flavonoidler, farlı kimyasal gruplara sahip fenolik yapılu bir grup doğal bileşikler olmakla birlikte sadece bitkilerde sentezlenmektedir. Flavonoidlerin biyolojik/farmakolojik aktivitesi ilk olarak 1936'da ortaya çıkmıştır. Askorbik asidin, normal damar geçirgenliğini geri kazandıran Macar kırmızı biberi veya limon suyu özleri ile birlikte kullanılmadığı sürece purpura tedavisinde etkili olmadığı gösterilmiştir. Araştırmacılar ekstreleri parçalara ayırmış ve aktif molekülü vasküler geçirgenlik üzerindeki etkisinden dolayı P maddesi olarak tanımlamışlardır. Daha sonra P maddesine sitrin adı verilmiş ve bir flavonoid olan hesperidin ana bileşeni olduğu gösterilmiştir (Cataneo & ark., 2021).

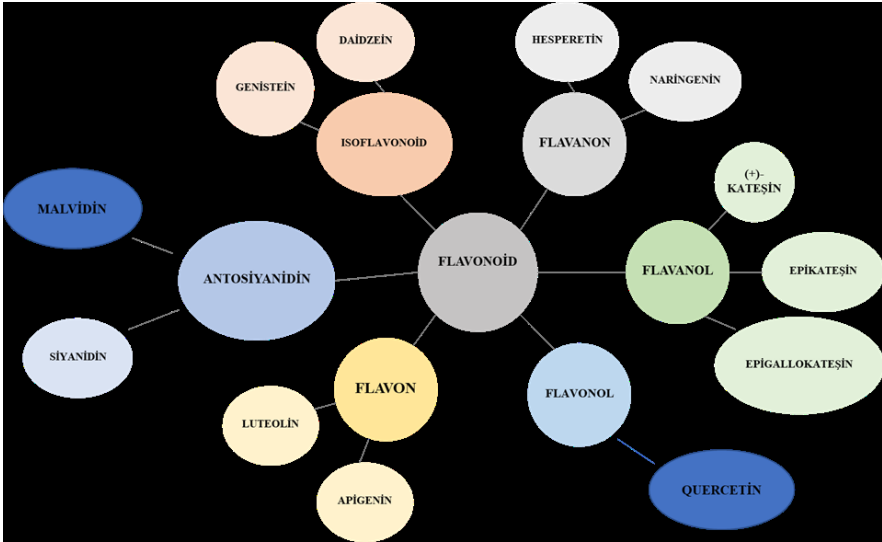
Temel flavonoid kaynakları sebze ve meyvelerin çeşitli bölümlerinde, kakao tozu, siyah-yeşil çay ve kırmızı şarapta bol miktarda bulunmaktadır. Polifenoller, dejeneratif hastalıklar, bulaşıcı, kardiyovasküler, kanser ve diğer yaşa bağlı hastalıklarda antitümör, antibakteriyel, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, antiinflamatuvar ve antiviral aktiviteler gibi etkileyici biyokimyasal aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir (Bestil & Uysal, 2023).

Polifenollerin Sınıflandırılması ve Kimyasal Yapısı

Meyve ve sebzelerde antioksidan, antiinflamatuvar, anti-kanserojen, antiviral ve antialerjik özelliklere sahip binlerce fitokimyasal bulunmakta; bunlar karotenoidler, vitaminler, alkaloidler, azot içeren, organosülfürik ve fenolik bileşikler olarak sınıflandırılmaktadır (Bhosale & ark., 2020). Flavonoidlerin kimyasal özelliği, hidrosilasyon derecesine, yapısal sınıflarına, konjugasyonlarına ve polimerizasyon derecesine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Yapısından kaynaklanan bu değişiklikler faaliyetlerini de etkilemektedir. Flavonoidlerde yer alan fonksiyonel hidroksil grupları, serbest radikaller veya metal iyonlarını şelatlayarak antioksidan etkinliğini gösterir. Metallerin şelasyonu, hedef biyomoleküllere zarar veren radikal oluşumunun önlenmesinde önemlidir (Kumar & ark., 2013; Dalia & ark., 2020).

Bağlayıcı zincir doymamışlığı ve oksidasyon derecesine göre flavonoidler Şekil-1’de görüldüğü üzere 6 ana grupta incelenir. Bunlar: izoflavonoidler, flavanonlar, flavanoller, flavonoller, flavonlar ve antosiyanidinlerdir. Kimyasal olarak flavonoidler, bir heterosiklik piran halkası (C) bulundurur ve bağlı iki aromatik halka (A ve B) yapısını içeren, 15 karbonlu bir fenilpropanoid zincirli (C6-C3-C6) temel flavan iskeletine sahiptir (Bestil & Uysal, 2023).

Flavonoidlerin çözünürlüğü terapötik etkinliği ve biyoyararlanımı için önemlidir ve düşük çözünürlüğünden dolayı tıbbi uygulamalarda sorun oluşturmaktadır. Flavonoid aglikonlarının sudaki düşük çözünürlüğü, bağırsakta emilimi ve kalma süresinden dolayı düşük emilimi ile birleştiğinde, insan ve hayvanların flavonoid tüketiminden kaynaklanan akut toksik etkilere maruz kalmasına izin vermez. Düşük çözünürlüğünden dolayı etkinliğini artırmak için hidroksetilrutozitler ve inositol-2 fosfat kersetin gibi yarı sentetik suda çözünür flavonoidlerin geliştirilmesi ile, çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Dias & ark., 2022).



ŞEKİL-1: Flavonoidlerin Sınıflandırılması (Bestil & Uysal, 2023).

Flavonoidlerde C2'de veya izoflavonoidlerde C3'te bir B halkasına bir kroman halkası (A ve C) eklenir . Ana izoflavonoidler genistein ve daidzeindir. Doymuş, oksitlenmiş bir C halkası, dihidroflavonlar olarak da tanımlanan flavanonlarda bulunur. Ana flavanonlar hesperetin ve naringenindir. C3'te bir hidroksil grubuna sahip doymuş, oksitlenmemiş bir C halkası, yeşil çay kateşinleri olarak da bilinen flavanoller için yaygındır. En yaygın kateşin stereoizomerleri moleküldeki C2 ve C3 pozisyonuna göre cis ((-)-epikateşin) veya trans ((+)-kateşindir. Flavanoller, galat gruplarıyla esterleşme sırasında gallik asit konjugatları epikateşin gallat, epigallokateşin ve epigallokateşin gallat oluşturabilir. Flavanoller, C2-C3 pozisyonunda genellikle hidroksillenmiş olan doymamış bir C halkasına sahip olup, C3 ve C4'te oksitlenmektedir. Ana flavanoller kuersetin, kaempferol ve mirisetindir. İsorhamnetin, fisetin ve galangin daha az miktarda bulunmaktadır. Flavonollerdeki –OH grubu biyolojik aktivitelerinden sorumludur. Flavonlarda C2–C3'te doymamış bir C halkası, hidroksillenmemiş C3 ve C4 pozisyonunda bir ketonik grup bulunmaktadır. Ana flavonlar arasında apigenin, luteolin, tangeritin, chrysin yer alır. Antosiyanidinler suda çözünür, oksitlenmemiş, doymamış flavonoidler olup esas olarak pH'a bağlı bitki pigmentleri olarak bulunmaktadır. Antosiyanidinler, 2-fenil-benzopirilyum kromofor-flavilyum iyonunun temel yapısına dayanmaktadır. Molekülün B halkasında C3 konumunda ve 3, 4 ve 5 numaralı karbon atomlarında hidroksillenirler ve ana antosiyanidinler arasında siyanidin, delphinidin, pelargonidin, peonidin, petunidin ve malvidin bulunmaktadır (Kopustinskiene & ark., 2020; Cháirez-Ramírez & ark., 2021).

Anti-Kanser Ajanı Olarak Polifenoller

Hücre sel, moleküler deney sistemlerinin ve transgenik/nakavt fare modellerinin ortaya çıkmasıyla birlikte, polifenollerin eyleminde yer alan mekanizmaların anlaşılmasında önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Doğal polifenollerin yararlı etkileri, endojen olarak üretilen radyasyon ve ksenobiyotiklerce serbest

radikallerin temizlenmesinden kaynaklanmaktadır. Polifenoller aynı zamanda, reaktif oksijen türleri aracılı hücre DNA kırılmasını ve hücre ölümünü başlatmak için prooksidanlar gibi davranmaktadır. Polifenollerin kanser tedavisindeki yararlı etkileri, gen ekspresyonu aktivasyonuna veya susturulmasına yol açan tümörjenezde yer alan epigenetik mekanizmaları tersine çevrilebilir bir şekilde modüle etme yetenekleriyle bağlantılıdır. Birçok polifenolün nükleer faktör kapp B (NF-κB) ekspresyonunu ve kromatinin yeniden modellediği görülmüştür (Mileo & ark., 2016).

Polifenoller, elektron verme yetenekleri ile prooksidatif etkilidir. Örneğin, salisilik asit ve antosiyanidinler, tümör hücresi koruyucu katalazını ve böylece reaktif apoptozu indükleyen tümör hücrelerinin hücreler arası ROS sinyalinin ve apoptozun mitokondriyal yolunu etkisiz hale getirmektedir (Obrador & ark., 2019). Karsinogenez ve kanser tedavilerinde yer alan oksidatif stresin çeşitli mekanizmaları hakkında çok fazla çalışma olmasına rağmen, mevcut anlayış hala kanseri yenmek için yeterli değildir. Örneğin, ROS'un kanser hücrelerinin çoğalmasını uyardığı ve adaptif yanıtlarını artırarak onları koruyabildiği, böylece kanserin ilerlemesine ve hatta metastatik hastalığa yol açtığı bilinmektedir (Milkovic & ark., 2014).

Oksidatif Stresi ve Tümör Mikroçevresini (TME) Modüle Ettiği Bilinen Bitki Türevli İlaçlar

Kanser hücrelerinde ROS seviyesini yükselten başka bir ajan ile birlikte yapılan kombinasyonlu kemoterapinin kullanılması umut vadeden bir terapötik yaklaşımdır. Ayrıca, metastatik kanserlerde TME'yi hedefleyen tıbbi stratejiler, stromal bağışıklık hücrelerinin kanser hücrelerine karşı sağladığı koruyucu etkiyi azaltmayı ve kanser hücrelerinin duyarlılığını artırmayı amaçlamaktadır. Klinik denemelerde ölçülen OS ve TME'yi modüle ederek anti-kanser aktiviteleri açısından yoğun bir şekilde çalışılan çeşitli bitki bileşikleri veya bitki özleri özetlenmiştir (Cheng & ark., 2016).

Kurkumin

Zerdeçalın yapısında bulunmaktadır. ROS ve OS'nin, diğerlerinin yanı sıra, çoklu hücre sinyal proteinleri ile etkileşime girerek veya proapoptotik molekülleri veya TME ile ilgili diğer molekülleri modüle ederek, kutanöz T-hücreli lenfomalar, multipl miyelom gibi farklı kanser türlerini inhibe ettiği bulunmuştur (James & ark., 2015). HT-29 (insan kolon kanseri hücre hattı) hücrelerinde mitokondriyal hücre ölüm yoluyla proliferasyonu baskılayıp apoptozu indüklemiştir. Kurkumin, Bcl-xL/Bad, Bcl-2/Bax oranlarını azaltırken, caspase-3 aktivasyonu ile öncülük ettiği gözlenmiştir (Bhosale & ark., 2020).

Paklitaksel (Taksol)

Taxus brevifolia'dan (pasifik porsuğu) izole edilen bir diterpen ester olan paklitaksel, çeşitli tümör tedavileri için bir anti-kanser ilacı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Paklitaksel sitotoksitesi ve kanser hücrelerinde mikrotubulin stabilizasyonuna neden olan antitümör aktivitesi ile bilinir. Paklitaksel, insan meme kanseri hücrelerinde, hidrojen peroksit, süperoksit, oksidatif DNA eklentileri ve G2/M tutuklamasını önemli ölçüde indükleyebilir. Doksorubisin ile kombinasyon halinde paklitakselin yarı sentetik bir analogu olan paklitaksel veya docetaxel (Taxotere) ile tedavinin, süperoksit dismutaz aktivitesini ve tiyobarbitürik asit reaktif maddelerini (TBARS) artırarak sıçan karaciğerinde OS'nin önemli ölçüde uyarılmasına neden olabileceğini göstermiştir (Peng & ark., 2015; Wen & ark., 2016).

Piperine ve türevleri

Piperin yaygın olarak kullanılan baharatlar olan karabiber ve pul biberde bulunur ve bu tür baharatlara keskinlik veren bileşiktir. Piperine, ROS tabanlı bir mekanizma yoluyla akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri ve kolon kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde anti kanser aktiviteleri için incelenmiştir. Piperine, insan rektal kanser hücrelerinde ROS'a bağlı hücre ölümünü sağlamıştır.

Piperlongumin ile tedavi edilen insan pankreas kanseri hücrelerinde OS ile ilişkili sinyalleşme, endoplazmik retikulum (ER) stresi ve katlanmamış protein tepkisindeki düzensiz yolların zenginleştiğini transkriptomik analizle göstermiştir. OS destekleyici bir ajan olarak piperinin, fare kolon kanseri hücrelerinde ve melanom hücrelerinde ROS üretimindeki artışa neden olmuştur (Lopus & ark., 2015).

Ökse otu özü

Yaygın olarak ökse otu olarak bilinen *Viscum album L.*, Avrupa ve Asya'da tanımlanan meşe ve diğer ağaçlarda yetişen yarı asalak bir bitkidir. Ökse otu, Avrupa'da kanser, iltihaplanma ve AIDS dahil olmak üzere çeşitli insan hastalıklarını tedavi etmek için bitkisel bir ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Bar-Sela & ark., 2013). Ayrıca, ökse otu ekstresi ile muamele edilmiş lösemi hücrelerinde hücresel antioksidan glutatyonun azalması ve ER stresinin indüklenmesi görülmüş ve bu yüzden, ekstrakt etkisinin kanser hücrelerinde redoks sinyalini uyardığı düşünülmektedir. Sikloheksamid, doksorubisin, paklitaksel ve sisplatin dahil olmak üzere yaygın olarak kullanılan kemoterapilerle kombinasyon halinde ökse otu özü, çeşitli kanser hücresi ölümünü indüklemeye tedavi etkinliğini artırabilir (Srdic-Rajic & ark., 2016).

Antioksidanlar ve Sınırlı Kullanımı

Flavonoidlerin biyoyararlanımı sınıflarına göre değişkenlik göstermektedir ancak genel olarak çok düşüktür. Ayrıca, diyetteki diğer doğal bileşenlerle etkileşimleri, etkinliklerini sınırlandırır. Belirli biyolojik hedeflere yönelik olarak tasarlanmış birkaç polifenolün diğer doğal ajanlarla kombinasyonlarının, bu karışımların bileşenlerinin metabolik etkilerini kontrol edilebilir ve tekrarlanabilir bir şekilde genişletmeye yönelik olarak kullanılması önemlidir (Bhosale & ark., 2020; Bestil & ark., 2023). Antioksidanların uygunsuz kullanımı zararlı olabilir çünkü antioksidan kullanımı tüm hücresel ROS'un tamamen ortadan kaldırılmasına yol açabilir. Öte yandan, aşırı ROS üretimi hücre hasarına, yaşlanmaya ve çeşitli hastalıklara yol açar. (Borrelli,

2018). Bu biyobelirteçlerin korelasyon seviyelerine ve hastalığın ilerlemesine odaklanan daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Jelic & ark., 2021).

Antioksidanların rolü ile ilgili iki çelişkili görüş vardır. Birincisi, antioksidanların radyoterapi ve kemoterapinin etkinliğini azaltabileceğini düşünürken, ikincisi ise antioksidanların malign hücrelerin büyümesini önleyebileceğini ve hastaları tedavinin toksik yan etkilerinden koruyabileceğini savunuyor. Bu nedenlerle antioksidanların kanser tedavisinde kullanılıp kullanılmaması gerektiği konusunda basit bir cevap yoktur (Milkovic & ark., 2014). Spesifik fitobileşiğin aracılık ettiği anti-kanser aktivitesinde yer alan spesifik ROS türü analiz edilmeli ve gelecekteki ilaç geliştirme ve uygulamasına yardımcı olabilecek fitobileşiğin, ilaç etkinliğinin daha derinlemesine mekanizmalarını ve etkisini sağlamak için açıklığa kavuşturulmalıdır. Antitümör immün tepkilerini desteklemek ve kanser hücrelerinde ve bunlarla ilişkili mikroçevrede belirli bir OS seviyesini korumak için kritik yolların belirlenmesi terapötik etkinliği ve sonuçları iyileştirebilir. Uzun vadeli hastanın refahını etkileyebilir (Cheng & ark., 2016).

Sonuç

Tıbbi bitkilerin yapısında bulunan flavonoidler, fenolik maddeler ve alkaloidler antioksidan ve serbest radikal temizleme yeteneklerinin yanı sıra antiinflamatuvar, antiviral ve anti-kanser özelliklere sahip olmalarından dolayı insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır. Ancak, bu bulgular doğal ürünlerin hastalık riskini azaltma veya yaşam kalitesini artırma potansiyeline işaret etse de, ilaçların yerini almaz. Alternatif ve tamamlayıcı tıbbın kabul edilmesiyle, gelecekte geleneksel ve modern tıbbın birleştirilmesi önem kazanmaktadır. Geleneksel tıbbın değerleri, son teknoloji biyomedikal araştırmalarla moleküler düzeyde değerlendirilmelidir. Doğal ürünlerin bilimsel temellere dayanmayan kullanımı, kişinin risk altında olabileceği etkileşimler ve başka bir tedavi ile etkileşime girdiğinde ciddi etkilerle sonuçlanabilir. Kanser günümüzde insan ve hayvan sağlığını etkileyerek canlılığın refah seviyesini

düşürmektedir. Bu sebepten dolayı en çok araştırma yapılan hastalıklardan bir tanesidir. Uygulanan çeşitli kemoterapilerin yan etkileri ve kemoresistanstan dolayı kanser hastalarının refah seviyelerini en üst düzeye çıkartacak yeni tedavisel yaklaşımları, etkili ajan, kişiye özel tedavi yaklaşımını bilimsel çalışmaları zorunlu kılmıştır.

Oksidatif stres sırasında oluşan reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyon ürünleri sadece sitotoksik değil, aynı zamanda stres altındaki bireylere benzer şekilde davranan hücrelerde sinyal iletimini modüle edebilir. Buna göre, pro-oksidanlar ve antioksidanlar, spesifik hücresel redoks sinyalinin değiştiricileri olarak düşünülebilir. Bu nedenle, sağlıklı kişilerde ve özellikle kanser hastalarında tedavi sırasında antioksidan takviyelerinin potansiyel faydalarının değerlendirilmesine ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Sundaram, C., Harikumar, K. B., Tharakan, S. T., Lai, O. S., Sung, B., & Aggarwal, B. B. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*, 25(9), 2097–2116. Doi:10.1007/s11095-008-9661-9

Bar-Sela, G., Wollner, M., Hammer, L., Agbarya, A., Dudnik, E., & Haim, N. (2013). Mistletoe as complementary treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with carboplatin-based combinations: a randomised phase II study. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(5), 1058–1064. Doi:10.1016/j.ejca.2012.11.007

Bestil, D. N., & Uysal, H. (2023). Flavonoidler ve Biyolojik Aktiviteleri. *Antakya Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2(1), 49-55.

Bhosale, P. B., Ha, S. E., Vetrivel, P., Kim, H. H., Kim, S. M., & Kim, G. S. (2020). Functions of polyphenols and its anticancer properties in biomedical research: a narrative review. *Translational cancer research*, 9(12), 7619–7631. Doi:10.21037/tcr-20-2359

Borrelli, A., Bonelli, P., Tuccillo, F. M., Goldfine, I. D., Evans, J. L., Buonaguro, F. M., & Mancini, A. (2018). Role of gut microbiota and oxidative stress in the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocarcinoma: Current and innovative therapeutic approaches. *Redox biology*, 15, 467–479. Doi:10.1016/j.redox.2018.01.009

Cataneo, A., Ávila, E., Mendes, E., Oliveira, V., Ferraz, C., Almeida, M., Frabasile, S., Santos, C., Jr, W., Bordignon, J., & Wovk, R. (2021). Flavonoids as Molecules With Anti-Zika virus Activity. *Front. Microbiol.* 12:710359. doi: 10.3389/fmicb.2021.710359

Cháirez-Ramírez, M. H., de la Cruz-López, K. G., & García-Carrancá, A. (2021). Polyphenols as Antitumor Agents Targeting

Key Players in Cancer-Driving Signaling Pathways. *Frontiers in pharmacology*, 12, 710304. Doi:10.3389/fphar.2021.710304

Cheng, Y. T., Yang, C. C., & Shyur, L. F. (2016). Phytomedicine-Modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy. *Pharmacological research*, 114, 128–143. Doi:10.1016/j.phrs.2016.10.022

Choi, J. D., & Lee, J. S. (2013). Interplay between Epigenetics and Genetics in Cancer. *Genomics & informatics*, 11(4), 164–173. Doi:10.5808/GI.2013.11.4.164

Dalia, M., Kopustinskiene, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*. 12, 457; doi:10.3390/nu12020457

Dias, M., Diana, C., Pinto, G., & Silva, A. (2021). Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules* 2021, 26, 5377. Doi:10.3390/molecules26175377

James, M. I., Iwuji, C., Irving, G., Karmokar, A., Higgins, J. A., Griffin-Teal, N., Thomas, A., Greaves, P., Cai, H., Patel, S. R., Morgan, B., Dennison, A., Metcalfe, M., Garcea, G., Lloyd, D. M., Berry, D. P., Steward, W. P., Howells, L. M., & Brown, K. (2015). Curcumin inhibits cancer stem cell phenotypes in ex vivo models of colorectal liver metastases, and is clinically safe and tolerable in combination with FOLFOX chemotherapy. *Cancer letters*, 364(2), 135–141. Doi:10.1016/j.canlet.2015.05.005

Jelic, M. D., Mandic, A. D., Maricic, S. M., & Srdjenovic, B. U. (2021). Oxidative stress and its role in cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*, 17(1), 22–28. Doi:10.4103/jcrt.JCRT_862_16

Kopustinskiene, D., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. (2020). Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients* 2020, 12, 457; doi:10.3390/nu12020457

Klaunig J. E. (2018). Oxidative Stress and Cancer. *Current pharmaceutical design*, 24(40), 4771–4778. Doi:10.2174/1381612825666190215121712

Kumar, S., & Pandey, A. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. Hindawi Publishing Corporation *The ScientificWorld Journal Article*, ID 162750, Doi:10.1155/2013/162750

Lopus, M., & Naik, P. K. (2015). Taking aim at a dynamic target: Noscabinoids as microtubule-targeted cancer therapeutics. *Pharmacological reports* : PR, 67(1), 56–62. Doi:10.1016/j.pharep.2014.09.003

Mileo, A. M., & Miccadei, S. (2016). Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016, 6475624. Doi:10.1155/2016/6475624

Milkovic, L., Siems, W., Siems, R., & Zarkovic, N. (2014). Oxidative stress and antioxidants in carcinogenesis and integrative therapy of cancer. *Current pharmaceutical design*, 20(42), 6529–6542. Doi:10.2174/1381612820666140826152822

Obrador, E., Liu-Smith, F., Dellinger, R. W., Salvador, R., Meyskens, F. L., & Estrela, J. M. (2019). Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. *Biological chemistry*, 400(5), 589–612. Doi:10.1515/hsz-2018-0327

Peng, J., Hamanishi, J., Matsumura, N., Abiko, K., Murat, K., Baba, T., Yamaguchi, K., Horikawa, N., Hosoe, Y., Murphy, S. K., Konishi, I., & Mandai, M. (2015). Chemotherapy Induces Programmed Cell Death-Ligand 1 Overexpression via the Nuclear Factor- κ B to Foster an Immunosuppressive Tumor Microenvironment in Ovarian Cancer. *Cancer research*, 75(23), 5034–5045. Doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-3098

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical biology & medicine*, 49(11), 1603–1616. Doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006

Srdic-Rajic, T., Tisma-Miletic, N., Cavic, M., Kanjer, K., Savikin, K., Galun, D., Konic-Ristic, A., & Zoranovic, T. (2016). Sensitization of K562 Leukemia Cells to Doxorubicin by the *Viscum album* Extract. *Phytotherapy research : PTR*, 30(3), 485–495. Doi:10.1002/ptr.5554

Starobova, H., & Vetter, I. (2017). Pathophysiology of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 174. Doi:10.3389/fnmol.2017.00174

Wen, G., Qu, X. X., Wang, D., Chen, X. X., Tian, X. C., Gao, F., & Zhou, X. L. (2016). Recent advances in design, synthesis and bioactivity of paclitaxel-mimics. *Fitoterapia*, 110, 26–37. Doi:10.1016/j.fitote.2016.02.010

BÖLÜM IV

İnflamasyon ve Kanser

Recep BOZKURT¹
Görkem KISMALI²

Giriş

İnflamasyonun karsinogenezde önemli bir rol oynadığı kabul edilmektedir. Aslında bu ilişki, Virchow'un tümör dokularında lökositler olduğunu bulduğu ve tümör ile inflamasyon arasında potansiyel bir ilişki önerdiği 19. yüzyıldan beri araştırılmaktadır. Kanser vakalarının yaklaşık dörtte biri enfeksiyon ve kronik inflamasyona bağlı olabilir. Bununla birlikte, yıllar içerisinde yapılan epidemiyolojik çalışmalar, kronik inflamatuvar hastalıkların sıklıkla artmış kanser riski ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. İnflamasyon ve kanserler arasındaki ilişkiyi bulmayı amaçlayan bir

¹ Doktora Öğrencisi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası, recep.435@hotmail.com

² Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, gorkemkismali@yahoo.com

araştırmada inflamatuvar hücreler tarafından üretilen nitrojen türlerinin ve reaktif oksijenin mutajenik saldırılara neden olup olmayacağının ve tümör başlangıcıyla sonuçlanıp sonuçlanamayacağının belirlenmesine yol açtı. Günümüzde inflamasyondan kanser gelişiminin, inflamatuvar hücrelerin yanı sıra sitokinler, kemokinler ve enzimler de dahil olmak üzere, hep birlikte inflamatuvar bir mikro ortam oluşturan çeşitli araçlar tarafından yönlendirilen bir süreç olabileceği anlaşılmıştır. Bu konak tepkisi tümörleri baskılayabilse de çoklu sinyal yolu ile kanser gelişimine de sebep olabilir (Grivennikov & ark., 2010; Murata, 2018).

İnflamasyon

İnflamasyon vücuda girmiş patojenlere karşı savunma oluşturan, onarım mekanizmalarını uyararak ve daha fazla doku hasarını sınırlandıran hızlı bir savunma mekanizması olarak hizmet eden bir yanıttır. İnflamasyon sistemi, patojenleri veya travmaları tespit ederek hücreyel yanıtı tetikler ve kimyasal habercilere sinyaller gönderir (Chen & ark., 2018; Munn, 2017). İnflamasyon bu sebeple sağlık için hayati önem taşıyan bir savunma mekanizmasıdır (Nathan & Ding, 2010).

İnflamasyon akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılır:

1. Akut İnflamasyon: Travma, mikrobiyal istila veya zararlı bileşenlere bağlı doku hasarı akut inflamasyonu tetikleyebilir. Hızlı bir şekilde başlar ve kısa sürede şiddetlenir. Semptomlar birkaç gün devam eder. Subakut inflamasyon akut ve kronik inflamasyon arasındaki dönemdir ve 2 ila 6 hafta sürebilir.

2. Kronik İnflamasyon: Kronik inflamasyon birkaç ay veya yıllarca sürebilen, yavaş bir şekilde gelişen inflamasyon çeşitidir. Genellikle kronik inflamasyonun etkileri, vücudun hasarı onarması üstesinden gelme yeteneğine ve yaralanmanın nedenine göre değişir (Pahwa & ark., 2021).

Tarihçesi

İnflamasyon mekanizmasının keşfi ve anlaşılması, eski Mısırlılara ve Yunanlılara kadar dayanmaktadır. İnflamasyonun ilk tanımını, dört temel inflamatuar belirti (kızarıklık, şişlik, sıcaklık ve ağrı) üzerinde çalışmalar yapan Aulus Cornelius Celsus yapmıştır. MS 2. yüzyılda Romalı bir cerrah olan Galen inflamatuarı, yaralı dokularda iyileşme sürecinin olumlu bir etkeni olarak tanımlamıştır. Bazı araştırmacılar işlev kaybını inflamasyonun beşinci belirtisi olduğunu öne sürmüştür (Kołaczowska, 2007; Korniluk & ark., 2017). Bununla birlikte çoğu bilim insanına göre fonksiyon kaybı 1871'de Virchow tarafından tanımlanmıştır (Kołaczowska, 2007). Zaman içerisinde bilim insanları inflamasyonun mekanizmasını daha iyi anlamak için deneysel çalışmalara başladılar. Mikroskobun icadı bu deneysel çalışmalar için bir dönüm noktası olmuştur. Mikroskop dokulardaki mikro dolaşım değişikliklerini gözlemlemeyi mümkün kılıyordu (Scott & ark., 2004). İlerleyen zamanlarda inflamasyona yönelik yeni gelişmeler sağlandı. Örneğin, Gaubius 1794 yılında kanın pıhtılaşma eğilimini keşfetti ve anjyogenez tanımladı. 1824'te Dutrochet, lökositlerin kan içerisinde göç etme yeteneğini keşfetti ve 15 yıl sonra Weyner lökositlerin endotel üzerinde yuvarlanma sürecini tanımladı (Granger & Senchenkova, 2010; Grant, 1973). 18. yüzyılda Virchow, tüm bu araştırmaları inflamasyon çerçevesinde topladı ve Galen'in aksine inflamatuar durumu, hasarlı kan damarlarına aşırı hücre göçünün ve çoğalmasına ilişkin patolojik bir durumdan kaynaklandığını açıkladı (Korniluk & ark., 2017). İnflamatuar bir tepkiyi hücresel açıdan gözlemleyen ilk kişi Virchow'dur. Ayrıca lökositlerin inflamasyona dahil olduğunu vurgulamıştır. Fakat bu hücrelerin enfeksiyona ve doku hasarına neden olduğuna ilişkin hatalı bir sonuca vardı. Virchow'un öğrencisi olan Cohnheim (1867), kan damarlarının artan gözenekliliğinin ekstravasküler boşluğa sıvı kaçıışı ile ilişkili olduğunu öne sürdü. Mikroskobik olarak inflamatuar bir durum sırasında ortaya çıkan olayları tanımlayan ilk kişi Cohnheim'dir. Ancak öğretmeni gibi lökositlerin inflamasyondaki fonksiyonlarını yanlış tanımlamıştır (Ley, 2001).

Rus bilim insanı Miecznikow bu teorileri çürütmüştür. Ona göre hücrelerin enfekte bölgeye göçüne, fagozitoza ve patojenlerin zarar görmesine neden olan şeyin vücuda girmiş olan patojenlerdir. Sonraki yıllarda inflamatuvar hücrelerin rolü açıklanırken, Rocha e Silva tarafından yapılan bir çalışmada inflamatuvar yanıtta “kimyasal mediatörlerin” etkisinin olduğu gösterildi (Kofaczkowska, 2007).

Son yıllarda doku hasarının konağın bağışıklık sistemini başlatan, hasar veren bir ajanı ortadan kaldırabilen ve dokuları onarabilen sinyalleri aktive ettiği bilinmektedir (Grivennikov & ark., 2010). Patojenlerin saldırısı inflamasyon bölgesine; inflamatuvar hücreleri, makrofajları, sitokinleri (TNF- α , IL-1b, IL-6 gibi) ve proinflamatuvar kemokinleri (IL-8, MCP-1, MIP-1a) üreten mast hücrelerini çekmektedir (Dmitrieva & ark., 2016).

19. yüzyılda Rudolf Virchow tarafından tümörlerde gözlemlenen lökositlerin varlığının, inflamasyon ve kanser arasındaki olası bağlantının ilk bulgusudur. Ayrıca Virchow kanserin kökeninin kronik inflamasyon bölgelerinde olduğunu varsaydı. Yine de inflamasyonun tümör oluşumundaki kritik rol oynadığına dair net kanıtlar son on yılda elde edildi ve altta yatan bazı moleküler mekanizmalar aydınlatıldı (Grivennikov & ark., 2010; Karin, 2006).

İnflamasyonun Oluşumu

İnflamasyonun kanser oluşumundaki rolünü anlamak için inflamasyon sürecinin nasıl oluştuğunu anlamak önemlidir (Coussens & Werb, 2002). İnflamasyon mikrobiyal patojen enfeksiyonundan, kimyasal tahriş veya yaralanmadan kaynaklanan doku hasarına yanıt olarak verilen fizyolojik bir süreçtir (Tablo 1’de) (Abdel-Maksoud & ark., 2018; Lu & ark., 2006). Genellikle akut inflamatuvar tepkiler sırasında hücresel ve moleküler gelişen olaylar enfeksiyonu veya yaralanmayı en aza indirmeye çalışır. Bu hafifletme süreci doku homeostazının yenilenmesine ve akut inflamasyonun iyileşmesine fayda sağlar. Bununla birlikte kontrol altına alınmayan akut inflamasyon kronikleşebilir ve çeşitli kronik

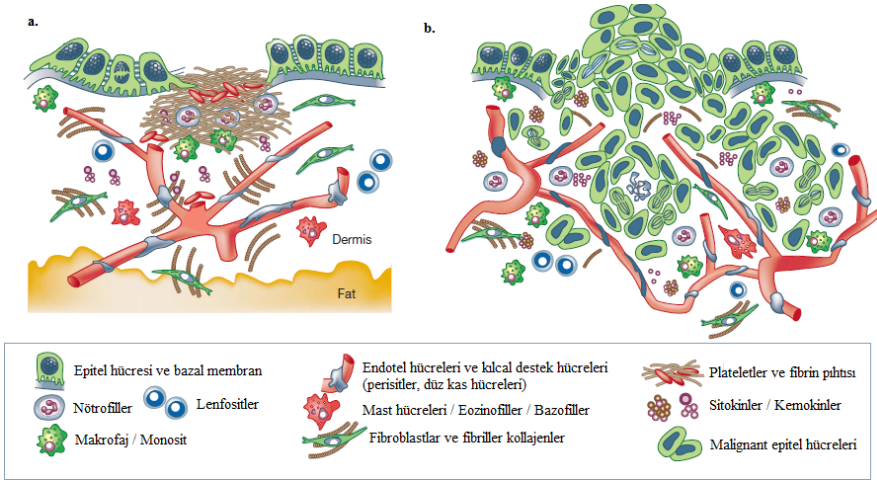
inflatuar hastalıkların oluşumuna sebep olabilir (Zhou & ark., 2016).

Tablo 1. İnflamasyonun Nedenleri

Enfeksiyöz Olmayan Faktörler	Enfeksiyöz Faktörler
Fiziksel: Yanık, donma, fiziksel yaralanma, yabancı cisimler, travma, iyonlaştırıcı radyasyon	Bakteriler, virüsler ve Diğer mikroorganizmalar
Kimyasal: Glikoz, yağ asitleri, toksinler, alkol, kimyasal tahriş edici maddeler (florür, nikel vb)	
Biyolojik: Hasarlı hücreler	
Psikolojik: Heyecan	

Doku hasarına cevap olarak geniş faktörlü bir kimyasal sinir ağı, etkilenen dokuyu iyileştirmek için vücutta yanıt başlatır (Şekil 1'de) (Coussens & Werb, 2002). İnflamasyon bölgesine ilk göç edenler nötrofillerdir (Castanheira & Kubes, 2019). Bu göçleri makrofajlar ve mast hücreleri tarafından üretilen moleküllerin etkisi altında olmaktadır (Nathan, 2002). Bir enfeksiyon veya doku hasarı sırasında, patojenle ilişkili moleküler modeller veya hasarla ilişkili moleküler modeller (DAMP) model tanıma reseptörleri tarafından algılanır. Bu sayede nötrofiller aktif hale getirilir. DAMP'ın yanı sıra nötrofiller üzerinde bulunan G-protein bağlı reseptörlere bağlanabilen CXCL1 ve CXCL 2 gibi kemokinler de nötrofilleri aktive edebilir (Castanheira & Kubes, 2019; Kolaczowska & Kubes, 2013). Nötrofiller patojenlere karşı koymak için fagositozun ve reaktif oksijen türlerinin (ROS), proteazların ve nötrofil hücre dışı tuzaklarının (NET) önemli rolü vardır (Carl Nathan, 2006). İnflamasyon ilerledikçe çeşitli tipte lökositler, lenfositler ve diğer inflamatuvar hücreler aktive edilir. Bunlara ilaveten çok sayıda büyüme faktörü sitokin ve kemokin içeren bir sinyal ağı vasıtasıyla

inflamasyonun olduğu bölgeye çekilir (Coussens & Werb, 2002; Carl Nathan, 2002).



Şekil 1. İnvaziv Tümör Büyümesine Karşı Yara İyileşmesi

İnflamasyonun Fizyopatolojisi

Akut inflamasyonda kan damarlarının genişlemesi (vazodilatasyon), kan akış hızında artış, kılcal damarlarda geçirgenliğin artması ve nötrofillerin kapiller duvardan enfekte dokuya göçü (diapedez) görülmektedir. Bu durum inflamasyonun kronikleşmesine kadar devam eder (Pahwa & ark., 2021). İnflamasyonun kronikleşmeye başlamasıyla, kısa ömürleri bulunan nötrofillerin yerini makrofajlar ve lenfositler almaya başlar (Brostjan & Oehler, 2020; Pahwa & ark., 2021). Bu nedenle kronik inflamasyonun ayırt edici özellikleri içerisinde: Makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleri gibi birincil inflamatuvar hücrelerin ilgili doku bölgesine sızması; inflamatuvar sitokinlerin büyüme faktörleri ve enzimler üretmesi, dolayısıyla doku hasarının ilerlemesi, fibrozis veya granülom vb yapıların oluşumudur (Cutolo & ark., 2019; Milenkovic, Stanton & ark., 2019; Needham & ark., 2019; Pahwa & ark., 2021; Yousuf & ark., 2019).

Makrofajlar ve dendritik hücreler gibi doku bağışıklık hücreleri IL-1 ve TNF- α gibi sitokinleri serbest bırakır (Arango Duque & Descoteaux, 2014; Pahwa & ark., 2021). Bu sitokinler dolaşımdaki lökositlerin kemotaksisini ve diyapedezini uyararak selettinleri ve integrinleri serbest bırakmak için inflamasyonun bulunduğu bölgedeki endotel hücrelerini indükler. Bunlara ilaveten doku makrofajları ve dendritik hücreler antijenin fagositoz yoluyla temizlenmesinde, sitokinlerin salınmasında ve lenfositlere antijen sunulmasında görev yapmaktadır (Pahwa & ark., 2021). Nötrofiller inflamasyonun olduğu bölgeye geldiğinde makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından salgılanan sitokinler ve kemokinler tarafından aktive edilirler (Diker, 2005). İnflamasyon bölgesine ilk göç eden ve akut fazda en baskın olan hücreler nötrofillerdir (Brostjan & Oehler, 2020). Bu hücreler lizozim, matriks metaloproteinaz ve miyeloperoksidaz açısından zengin granüller bulundururlar (Faurischou & Borregaard, 2003). T lenfositleri ve B lenfositleri içeren lenfositler, diğer bir savunma hattıdır. Bu hücreler sitokinlerin salgılanması, antikörlerin ve immün komplekslerin üretimi dahil olmak üzere inflamasyonda önemli rol oynar (Abbas & ark., 2019; Pahwa & ark., 2021). Ayrıca dolaşım sisteminde bulunan trombositler trombosit agregasyonu ve trombüs oluşumu gibi görevler yaparak inflamasyonda rol oynar (Pahwa & ark., 2021).

İnflamatuar Yanıt Mekanizmaları

İnflamatuar yanıt, doku hücrelerinde ve kanda bulunan inflammatuar hücrelerin mediatör seviyelerini düzenleyen sinyal yollarının aktivasyonu ile oluşur (Chen & ark., 2018; Lawrence, 2009). İnflamasyonun genel olarak mekanizması şu şekilde özetlenebilir: 1) Hücre yüzey modeli reseptörleri zararlı uyarınları tanıyarak 2) İnflamatuar yolları aktive edilir 3) İnflamatuar hücreler görevlerine başlar.

1. Model Tanıma Reseptörü Aktivasyonu

Patojenle ilişkili moleküler modeller (PAMP) olarak bilinen mikrobiyal yapılar model tanıma reseptörlerinin (PRR) aktivasyonu

yoluyla inflamatuvar yanıtı başlatabilir (Brusselle & Bracke, 2014; Gudkov & Komarova, 2016). Bazı PPR'lar ayrıca tehlike ile ilişkili moleküler modeller (DAMP'ler) olarak bilinir ve doku veya hücre hasarı sırasında aktive edilen çeşitli endojen sinyalleri tanır. DAMP'ler enfeksiyöz olmayan bir inflamatuvar yanıtı başlatabilen ve sürdürebilen konakçı biyomoleküllerdir (Chen & ark., 2018).

PPR'ın alt aileleri arasında C tipi lektin reseptörleri (CLR'ler), Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), retinoik asitle indüklenebilir gen (RIG) benzeri reseptörler (RLR'ler) ve NOD benzeri reseptörler (NLR'ler) bulunur (Takeuchi & Akira, 2010). TLR ailesinin ondan fazla üyesi tanımlanmış ve TLR'ler PPR'ler arasında en iyi çalışanlardır (Chen & ark., 2018). PAMP'lerin ve DAMP'lerin iletimine, TLR'lerle birlikte miyeloid farklılaşma faktörü-88 (MyD88) aracılık eder (Czerkies & Kwiatkowska, 2014). TLR'ler yoluyla sinyalleşme nükleer faktör kappa-B (NF- κ B), aktivatör protein-1 (AP-1), veya interferon düzenleyici faktör 3 (IRF3) gibi transkripsiyon faktörlerinin nükleer translokasyonuna yol açan bir intrasellüler sinyalleri aktive eder (Chen & ark., 2018). DAMP'ler ve PAMP'ler, TLR4 gibi reseptörleri ortak olarak bulundurdıklarından, enfeksiyöz veya enfeksiyöz olmayan inflamatuvar yanıtlarında benzerlikler olabileceğini akıllara getirir (Adib-Conquy & Cavaillon, 2007; Rubartelli & Lotze, 2007).

2. İnflamatuvar Yolların Aktivasyonu

İnflamatuvar uyaranlar, inflamatuvar mediatörlerin üretimini başlatmak için hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Mikrobiyal ürünler ve sitokinler (IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi) dahil olmak üzere birincil inflamatuvar uyaranlar, TLR, IL-1 reseptörü, IL-6 reseptörü ve TNF- α reseptörüyle etkileşime girerek inflamasyonu uyarır (Chen & ark., 2018; Kaminska, 2005). Reseptör aktivasyonu mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK), Janus kinaz (JAK)-sinyal dönüştürücü, nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) yolları dahil olmak üzere önemli intrasellüler sinyal yollarını tetikler (Hendrayani & ark., 2016; Henríquez-Olguín & ark., 2015; Kyriakis & Avruch, 2001).

Hücre Yüzeyi Reseptörleri ve Adezyon Molekülleri

Adezyon molekülleri, inflamatuvar yanıt esnasında lökositler ile endotel hücreleri arasındaki etkileşimi kontrol eder (Kelly & ark, 2007). İnflamatuvar hücreler yaralanma bölgesine ulaştıktan sonra endotel hücreler, diğer parankim hücreler, immun hücreler ve hücre dışı matriks proteinleri ile daha fazla etkileşim halinde bulunarak kronik inflamasyona sebep olur. İntegrinler, selektinler, vasküler adresler ve lenfosit homing reseptörleri dahil olmak üzere birkaç adezyon molekülü ailesi bu olaylara katılmaktadır (Angiari, 2015; Germolec & ark., 2018).

1. Selektinler

Selektinle lökositler (L-selektin), endotelial hücreler (P-selektin, E-selektin) ve trombositler (P-selektin) üzerinden eksprese edilen hücre yüzeyi molekülleridir (Kelly & ark., 2007). Selektinler çoğunlukla benzer yapıdadır ve hücre yüzeyinde yer alan sialil-Lewis X (sLE_x) tetrasakarit molekülüne bağlanır. Burada yer alan baskın seçici ligand P-selekti glikoprotein ligand-1'dir (PSGL-1). L-selektin, vasküler endotel üzerinde adresler adı verilen müsin benzeri moleküllere bağlanırlar. Bu bağlanmadan sonra lökositler ve endotel hücreleri arasındaki etkileşimi başlatırlar. Bu reseptör lenfositler için bir yuva reseptörü olarak işlev görür. P-selektin endotel hücrelerde zara bağlı halde bulunan granüllerde ve trombositlerdeki alfa granüllerde yerleşim gösterir. P-selektin mast hücre degranülasyonunun ardından hızla eksprese edilir. P-selektin PMN'ler, trombositler ve endotel hücreleri arasındaki etkileşimi kolaylaştırır ve pıhtının hem oluşmasında hem de bozunmasında önemli rol oynar. E-selektin ekspresyonu lökositlerin inflamasyon bölgelerine bağlanmasını kolaylaştırır. Ayrıca inflamatuvar yanıtın akut fazında sitokinler ve lipopolisakkkarit (LPS) gibi bakteriyel hücre duvarı ürünleri tarafından artırılır (Germolec & ark., 2018).

Dokuya özgü bir şekilde hareket eden selektinler, immun hücrelerin damar duvarı endoteline bağlanmasına katkıda bulunur. Bu olayı takiben inflamasyon bölgesine yuvarlanmayı

kolaylaştırmak için selektinler ve hücre yüzeyi reseptörleri arasında koordineli bir bağlanma ve salınma dizisi izlemektedir (Germolec & ark., 2018). Selektinler ve ligandları birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta (örneğin sedef hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı (IBD), romatoid artrit (RA) ve sistemik lupus eritematozus (SLE) vb) upregüle edilir (Angiari, 2015). Selektin ligandları ayrıca birçok kanserde, özellikle tümör metastazı ve kötü prognoza sahip karsinomlarda yukarı doğru düzenlenir (Läubli & Borsig, 2010).

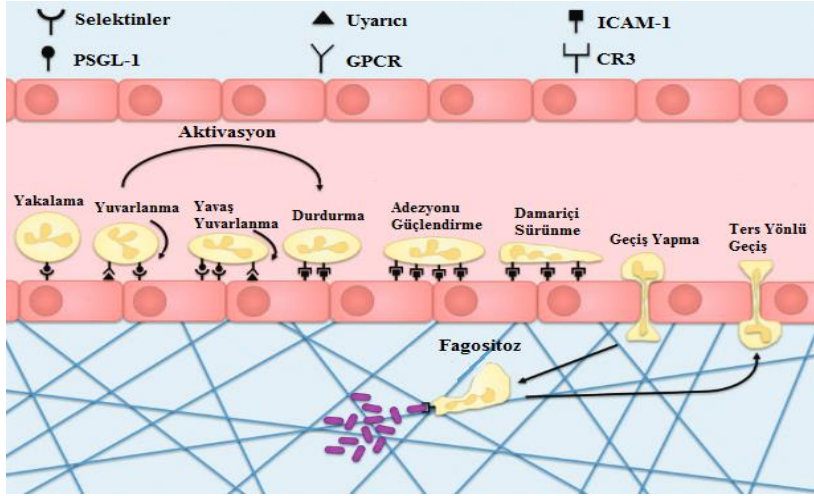
2. İntegrinler

İntegrinler hücre-hücre etkileşimine ve hücreler ile hücre dışı matriks arasındaki etkileşimlere aracılık eden, lökositlerin damarlar yoluyla yaralanma veya inflamasyon bölgelerine göçünü kolaylaştıran molekül ailesidir. İntegrinler hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi diğer hücre adezyon moleküllerini veya fibrinojen ve LPS gibi adeziv ligandları tutan hücre dışı bir alana ve hücre içindeki proteinlerle etkileşime giren bir sitoplazmik alana sahiptir. İntegrinler, farklı konformasyonel durumlar arasında geçiş yapma yetenekleri ve sinyalleri hücre zarları boyunca çift yönlü olarak iletme yetenekleri ile ayırt edilirler (Germolec & ark., 2018; Mousa, 2008). Hem selektin hem de sitokin/kemokin aracılı yollar integrin aktivasyonunu başlatabilir. İntegrinler tamamen aktif hale geçtiklerinde, bağışıklık hücrelerinin endotel üzerindeki reseptörlere sıkı bir biçimde bağlanmasına aracılık eder (Langereis, 2013).

Lökosit integrin (lenfosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1, LFA1), endotelial hücrelerde ICAM-1'e bağlanır ve inflamasyon esnasında lenfositleri hedef dokulara yönlendirir. Ayrıca lökosit integrinler doğal katil hücre (NK) veya sitotoksik T lenfosit (CTL) aracılı sitotoksikite esnasında hücre-hücre etkileşimini destekler. Benzer şekilde integrine makrofaj-1 antijeni (Mac-1) bağlanması, monositlerin endotelial hücrelere yapışmasında önemlidir ve bakterilerin fagozitozunu arttırmak için integrinler bir kompleman reseptörü görevi görür.

Çok geç aktivasyon antijenleri (VLA) inflamasyon sırasında bağışıklık hücrelerini fibronektin, kollagen ve laminin gibi hücre dışı matriks (ECM) proteinlerine bağlamakla sorumlu integrinlerdir. Bunların yanında fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi ECM yapımında yer alan immun dışı hücreleri de inflamasyon bölgesine çekmekle de sorumludurlar (Germolec & ark., 2018). İnflamatuar sitokinler ICAM-1, ICAM-2 integrinleri ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) için ligand görevi yapan hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Bu sayede inflamatuvar hücreler inflamasyonun çeşitli aşamalarında seçilerek bölgeye toplanır. Endotel üzerindeki reseptörlere sıkı bir şekilde bağlanmayı takiben inflamatuvar hücreler kan damarlarından dokuya ya paraselüler (bir endotel kavşağından) ya da transselüler (doğrudan endotel hücresi yoluyla) yoldan geçiş yapar. Bu geçişi tam olarak kontrol eden mekanizma henüz tanımlanamamıştır (Şekil 2’de) (Germolec & ark., 2018; Langereis, 2013).

Hücreler üzerindeki selektinlerin ve integrinlerin ekspresyonu akut faz düzeldikçe veya kronikliğe doğru kaydıka değişir. Bunların ligandları immunohistokimya, akış sitometrisi, geleneksel mikroskopi teknikleri veya intravital mikroskopi gibi antikor bazlı etiketleme teknikleri kullanılarak nicelendirilebilir. Selektinlerin çözünür formları serumda bulunmaktadır ve ELISA ile veya diğerk immunoanalizlerle ölçülür. Bunlara ilaveten integrin aracılı hücre sinyalleşmesini ve hücreye tutunma etkinliğini değerlendirmek için araştırma araçları olarak kullanılmış olarak kullanılan bir dizi antikor ve ligand bazlı fonksiyonel deneyler vardır (Germolec & ark., 2018).



Şekil 2. Selektinlerin ve integrinlerin nötrofil yuvarlanma, adezyon ve damardan dokulara göçe olan rolünün şematik gösterimi (Langereis, 2013).

İnflamatuar Mediatörler

1. Sitokinler

Sitokinler inflammatuar yanıtların amplifikasyonu ve düzenlenmesinde yer alan, farklı hücre tipleri arasındaki etkileşimi sağlayan, bunların kontrolünü koordine etmek için görev alan moleküler habercilerdir. Tek bir sitokin bir dizi farklı hücre tipini veya hedefi tetikleyebilir. Hedefe bağlı olarak hem otokrin hem de parakrin sinyalleşme etkilerine sahip olabilir (Turner & ark., 2014). Doğuştan gelen bağışıklık yanıtlarında sitokinler öncelikle fagositik hücreler ve NK hücreleri tarafından salgılanır. Ancak adaptif bağışıklık yanıtlarında esas olarak antijen sunan hücreler (APC'ler) ve lenfositler tarafından salgılanırlar (Germolec & ark., 2018).

Birçok sitokin ve kemokin yaralanma bölgesine lökosit kemotaksisini kolaylaştırmak, immün hücre fonksiyonunu modüle etmek ve immün yanıtta yer alan çeşitli hücre tiplerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarmak için birçok mekanizma

yoluyla enflamasyona katkıda bulunur. Enflamatuar yanıtları uyarmak ve sürdürmek için en çok bilinen sitokinler: IL-6, IL-1, IL-2, TNF- α , IFN- γ ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β ' dir (Germolec & ark., 2018; Turner & ark., 2014).

2. Kemokinler

Kemokinler, sitokinler gibi işlevlerine göre değil, aminoasit bileşimlerine, özellikle korunmuş bir tetra-sistein motifinin varlığına göre tanımlanır. İlk iki konsensüs sisteininin (korunmamış bir amino asitle ayrılmış veya yan yana) görelî konumu, kemokinlerin sırasıyla CXC ve CC kemokinler olmak üzere iki ana alt sınıfa ayrılmasını sağlar (Bachmann & ark., 2006). Genel olarak CC kemokinleri; monositler (RANTES, monosit kemoatraktan proteinler (MCP 1-5)), eozinofiller (eotaksinler 1-3), bazofiller (MCP 4-5) ve lenfositler (makrofaj inflamatuvar protein (MIP-1 α ve β) için kemoatraktan görevi görür. IL-8, trombosit faktörü 4 (PF4) ve büyüme ile düzenlenen onkojen (Gro) α ve β içeren CXC ailesinin üyeleri PMN'leri çeker, anjiyogenezi ve yara iyileşmesini modüle eder. Birkaç homolog molekül de kemokinler olarak kabul edilir. Bunlar, ilk iki sistein arasında araya giren üç aminoaside sahip olan CX3C (fraktalkin veya nörotaksin) ve yalnızca tek bir terminal sisteine sahip olan C kemokin ailesinden XCL1 ve XCL2 ile karakterize olur.

İnflamatuar kemokinler enfeksiyon, inflamasyon, doku yaralanması ve tümörlerde efektör lökositlerin toplanmasında görev alır. İnflamatuar sürecin bir parçası olarak kemokinler hücrelî göçü yönlendirir, makrofajları ve PMN'leri aktive eder, anjiyogenezi teşvik eder ve fibrozisi uyarıp yara iyileşmesini modüle eder (Germolec & ark., 2018; Sell & ark., 2001). Buna ilaveten kemokinler, akut doku hasarını takiben bir uyarı işareti olarak hizmet eden nosiseptif ağrı sinyallerinin iletimini destekler, merkezi sinir sistemindeki yaralanma bölgelerine astrositlerin göçünü ve bu bölgelerde mikrogliyal hücre proliferasyonunu indükler (Germolec & ark., 2018). Hücre göçü veya kemotaksis, genellikle kemokin gradyanları boyunca meydana gelir, lökositlerin ve endotelial

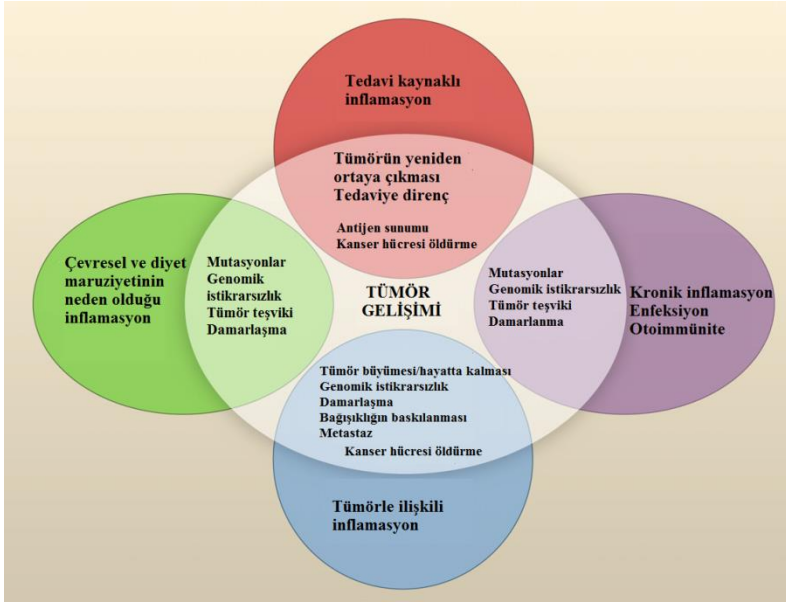
hücrelerin üzerindeki kemokin reseptör seviyelerinde değişikliklere yol açarak lökositlerin iltihaplanma bölgelerine lokalizasyonunu düzenler (Bachmann & ark., 2006). Aktive edilmiş efektör veya hafıza T hücreleri, çoklu inflamatuvar kemokinlerin kaynağıdır ve efektör T-hücresi ile makrofaj alımını sürdürür (Moser & ark., 2004). Bu enflamatuvar kemokinler daha sonra pro-inflamatuvar sitokinlerin yerel üretimini kontrol edebilir. Bu sebeple yerel olarak üretilen kemokinler, hastalığın ilerlemesini ve patogenezi etkileyebilir. Artan kemokin seviyeleri hem akut hem de kronik inflamatuvar durumlarla ve ateroskleroz, glomerülo nefrit gibi bir dizi kronik inflamatuvar hastalık ile ilişkilendirilmiştir. İnflamasyonda kemokinlerin ve reseptörlerinin rolünü ve işlevini değerlendirmek için çok sayıda yöntem mevcuttur. Bu yöntemlerden en sık kullanılanı ilgili doku bölümlerinin immunohistokimyasal (IHC) boyamasıdır. Ayrıca kemokinlerin ve reseptörlerinin karakterizasyonu ve ölçümü için kullanılabilen çok sayıda monoklonal antikor mevcuttur (Germolec & ark., 2018).

İnflamasyon ve Kanser

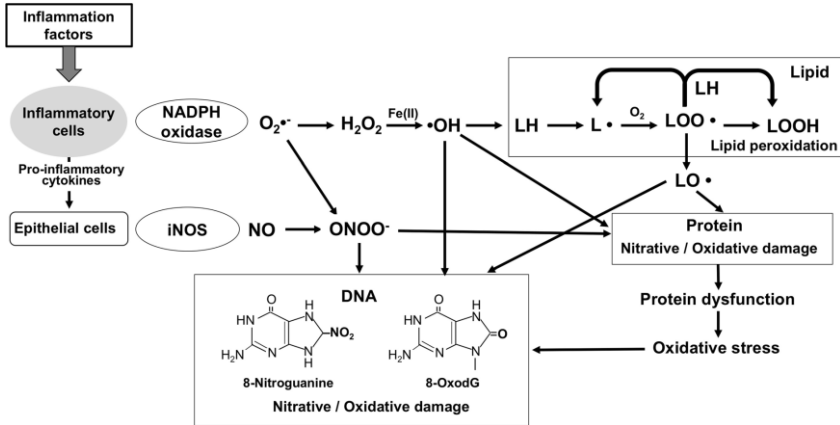
İnflamasyon ve kanser arasındaki ilişki, 19. yüzyılda Virchow'un tümör dokularında lökositlerin bulunduğunu ve inflamasyon ile kanser arasında ilişki olabileceğini öne sürmesinden beri araştırılmaktadır (Ravindranathan & ark., 2021). Özellikle kronik inflamasyonun kanser gelişimini destekleyebileceğini ve tümör kaynaklı inflamasyonun bir kartopu etkisi yaratarak tümörün ilerlemesini sürdürdüğünü gösteren çok sayıda kanıt vardır (Munn, 2017). Son yıllarda yapılan çalışmalara göre kansere neden olan faktörlerin yaklaşık %25'ini bulaşıcı hastalıkların ve kronik inflamasyonun oluşturduğu tahmin edilmektedir (Şekil 3'te) (Murata, 2018). Kronik inflamasyonun etkisiyle reaktif oksijen/nitrojen türleri (ROS/RNS) inflamatuvar hücrelerden üretilebilmektedir. ROS/RNS, inflamasyonun bulunduğu organlarda DNA hasarına neden olarak kanser gelişimine yol açar (Şekil 4'te) (Ohnishi & ark., 2013).

Kronik inflamasyonda makrofaj hücreler bulunmaktadır (Coussens & Werb, 2002). Enfeksiyonla mücadele etmek için makrofajlar, diğer lökositlerle birlikte yüksek seviyelerde reaktif oksijen ve nitrojen türleri üretir. Enfeksiyonla mücadele eden bu ajanların daimi olarak doku hasarı ve hücresele proliferasyon bölgelerinde bulunması zararlıdır. Epitel ve stroma hücreleri DNA ile reaksiyona girip perosinitrit gibi mutajenik maddeleri üretebilirler ve mutasyona neden olurlar. Makrofajlar ve T lenfositleri, DNA hasarının artmasına sebep olan TNF- α ve makrofaj göçünü inhibe edici faktörü serbest bırakabilir. Migrasyon inhibe edici faktör, p53'e bağılı koruyucu yanıtları bozarak onkojenik mutasyonların artmasına sebep olur. Makrofaj göçünü inhibe edici faktör aynı zamanda Rb-E2F yolağına müdahale ederek kanser oluşumunu arttırır (Lu & ark., 2006). İleokolit ile bağılantılı bir fare kanseri modelinde, hidroperoksit indirgeyici enzim eksikliği olan farelerde inflamasyona ve kansere karşı yüksek duyarlılık, hücre içi hidroperoksitlerin de kanserin başlamasına sebep olabileceğı ileri sürülmüştür (Chu & ark., 2004).

İnsan papilloma virüsü veya hepatit B ve C virüsüne bağılı enfeksiyonlardaki kronikleşme, sırasıyla servikal ve hepatoselüler karsinoma neden olur. Ayrıca sigara dumanına, asbeste ve silikaya uzun süre maruz kalmak gibi kronik hasar meydana gelir. Bunu takiben inflamasyonlar ilişkili durumlar kanser oluşumuna ortam hazırlar (Rakoff-Nahoum, 2006).



Şekil 3. Tümör oluşumunda inflamasyon tiplerinin etkileri (Grivennikov & ark., 2010).



Şekil 4. İnflamasyona bağlı biyomakromolekül hasarı (Murata, 2018).

İnflamasyonun Kanser Üzerine Etkisi

Daha önceden belirtildiği gibi, özellikle kronik inflamasyon durumları kansere zemin hazırlamaktadır (Murata, 2018). Mikrobiyal bir enfeksiyonda konağın bu enfeksiyonla savaştığı efektör mekanizmayı reaktif oksijen aracılı (ROI) hidroksil radikali (OH•) ve süperoksit radikali (O^{2-•}) ile reaktif nitrojen ara ürünleri (RNI) olan nitrik oksit (NO•) ve peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturmaktadır. Anti-mikrobiyal olduğu düşünülen bu moleküller miyeloperoksidaz ve NADPH oksidaz gibi inflamatuvar sinyal yollarıyla düzenlenen konakçı enzimlerin aktivitelerinden dolayı oluşur. ROI ve RNI, DNA mutasyonları riskini arttıran DNA bazlarının oksidatif hasarına ve nitrasyonuna yol açar (Hayes & ark., 2020; Rakoff-Nahoum, 2006).

Hücreler düzensiz proliferasyonu ve DNA mutasyonlarının artmasını engelleyici mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalar DNA onarımına, hücre döngüsü durmasına, apoptoz ve yaşlanmaya aracılık eden tümör baskılayıcı yolları içerir. DNA hasarı karşısında hücreler ya DNA'larını onaracak ve mutasyonları önleyecek ya da hasarı başlatan hücreler hücre ölümüne uğrayacaktır. Tümör oluşumu ile konak savunması ve doku onarımı arasındaki bağlantıya dair kanıtlar bazı gözlemler sonucunda ortaya çıkmıştır. Örneğin tavuklara Rous sarkoma virüsünün (RSV) enjeksiyonu, enjeksiyon bölgesinde bir sarkomun büyümesine yol açar. Bissell laboratuvarı tarafından uzun yıllar boyunca yapılan çalışmalar, tavuğun diğer bölgelerinde yaralanma olması durumunda sarkomların oluşabileceğini göstermiştir. Bir başka çalışmada bir B16 melanom adaptif transfer deneyinde, yara sıvısında TGF-β ve bFGF gibi parakrin faktörlerin indüklenmesiyle yaralı uzuvlarda tümör büyümesin arttırdığı gözlemlenmiştir (Rakoff-Nahoum, 2006). Diğer bir çalışmada ise kanserojen dietilnitrozaminin (DEN) indüklediği, DNA hasarının nekrotik hücre ölümüne katkıda bulunduğu ve tümör gelişimini destekleyen bir inflamatuvar reaksiyonla sonuçlanan hepatoselüler karsinom modelidir (Maeda & ark., 2005).

İnflamasyonun tümör başlangıcını arttırabilecek başka bir mekanizma ise inflamasyonda üretilen büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin kök hücre üzerine etkisidir. Büyüme faktörleri ve sitokinler tümör progenitörleri üzerinde kök hücre benzeri bir fenotip sağlar veya kök hücre genişlemesini uyarır. Bu durum çevresel mutajenler tarafından hedeflenen hücre havuzunun genişlemesine yol açar (Grivennikov & ark., 2010).

İnflamasyon ayrıca obeziteye bağlı gelişen kanserlerde de rol oynar. Dünyada obezite prevalansının artmasıyla birlikte, aşırı kilolu bireylerde ve obez hastalarda artan kanser riskini anlamaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalara göre obezitede yeni adipoz dokular oluştuğunda, anjiyogenez dokuyu beslemek için ek kan damarları oluşturur. Obezitede yağ genişlemesiyle gelişen anjiyogenez, obezitede gözlenen kronik inflamasyonda rol oynar. Obez farelerde yapılan pankreatik duktal adenokarsinom çalışmalarında obezitenin makrofajları ve nötrofilleri toplayarak, pankreatik stellat hücreleri aktive ederek desmoplaziyi teşvik etmiştir. Bu desmoplazi tümör büyümesini kolaylaştırıcı etki göstermektedir (Munn, 2017).

Genellikle DNA'daki tek bir değişiklik kanser oluşumu için yetersizdir. Ancak 4-5 mutasyon, hücreleri neoplastik dönüşüm yoluna yönlendirebilir. Aktif lökositler, DNA hasarına ve genom kararsızlığına neden olabilen reaktif oksijen türlerini (ROS) ve reaktif nitrojen ara ürünlerini (RNI) serbest bırakır (Korniluk & ark., 2017). İnflamasyonun mutajenezdeki ana rolü, sodyum sülfatın (DSS) etkisiyle indüklenen kolorektal adenokarsinom gelişimi ile örneklenebilir (Meira & ark., 2008). DSS'nin kendisi zayıf bir kanserojen etki gösterir, ancak inflamatuvar durum etkisini oldukça artırır. Ayrıca sitokin üreten inflamatuvar hücreler, sistidin deaminazın (aktivasyon kaynaklı sitidin deaminaz-AID) aşırı ekspresyonunu indükleyebilir. AID, çift sarmallı DNA'nın anormal bağlanması sırasında, yani TP53, c-myc ve Bcl-6 gibi onkogenез açısından kritik genlerde mutasyonlar oluştuğunda, genom kararsızlığına neden olur ve mutasyon olasılığını artırır. AID tutulumunun lenfomaların oluşumunda, mide ve karaciğer

kanserlerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bunlara ilaveten birçok onkoprotein (RAS, Myc, RET), inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin (IL-6, IL-8, IL-1b, CCL2, CCL20) üretimini artıran sinyal yollarını da aktive edebilir (Korniluk & ark., 2017).

Tablo 2. Anti-tümör Bağışıklığında ve Tümörü Teşvik Eden İnflamasyonda Farklı İmmun ve İnflamatuvar Hücre Alt Tiplerinin Rollerini (Grivennikov & ark., 2010).

Hücre Tipleri	Anti-tümör etkisi	Tümörü teşvik edici özelliği
Makrofajlar, dendritik hücreler, miyeloid kaynaklı baskılayıcı hücreler	Antijen sunumu, sitokin üretimi (IL-12 ve tip I IFN)	Bağışıklık bastırma; sitokinlerin, kemokinlerin, proteazların, büyüme faktörlerinin ve anjiyojenik faktörlerin üretimi
Mast hücreleri B hücreleri	Tümöre özgü antikorların üretimi	Sitokin üretimi Sitokin ve antikor üretimi, mast hücrelerinin aktivasyonu, bağışıklığın baskılanması
CD8 ⁺ T hücreleri	Kanser hücrelerinin doğrudan parçalanması, sitotoksik sitokinlerin üretimi	Sitokin üretimi
CD4 ⁺ Th2 hücreleri		Makrofajların eğitimi, sitokin üretimi, B hücresi aktivasyonu
CD4 ⁺ Th1 hücreleri	Tümör reddinde sitotoksik T lenfositlere (CTL'ler) yardımcı olmak, sitokin üretimi (IFN γ)	Sitokin üretimi
CD4 ⁺ Th17 hücreleri	CTL'lerin etkinleştirilmesi	Sitokin üretimi

CD4 ⁺ Treg hücreleri	İnflamasyonun baskılanması (sitokinler ve diğer baskılayıcı mekanizmalar)	Bağışıklık bastırma; sitokin üretimi
Doğal katil hücreleri	Kanser hücrelerine yönelik doğrudan sitotoksiste, sitotoksik sitokinlerin üretimi	
Doğal katil T hücreleri	Kanser hücrelerine yönelik doğrudan sitotoksiste; sitotoksik sitokinlerin üretimi	
Nötrofiller	Doğrudan sitotoksiste, CTL yanıtlarının düzenlenmesi	Sitokinlerin, proteazların ve ROS'ların üretimi

Sonuç

Sonuç olarak inflamasyonun tedavi edilmediği ve kronikleştiği durumlarda kansere yol açabileceği görülmüştür. İnflamasyon sonucunda üretilen sitokinler, büyüme faktörü gibi maddelerin uzun süreli salınımları oksidatif stresin artmasına ve buna bağlı olarak hücrelerde DNA hasarına yol açabilmektedir. Bunun sonucunda hücrelerde kanser oluşumu meydana gelir. “İnflamasyonun Kanser Üzerine Etkisi” başlığı altında yer verilen çalışmalar göstermiştir ki inflamasyonun şiddeti ve sıklığına bağlı olarak kanser gelişimi gözlenmektedir. İnflamasyon durumunda tepki olarak immün sistem tarafından salgılanan nötrofil, makrofajlar gibi immün sistem hücrelerinin kanser gelişiminde rol oynayabileceği geçmiş çalışmalarda ifade edilmiştir. Genel çaplı değerlendirildiğinde inflamasyonun kanser gelişimine neden olabileceği durum inflamasyonun kronikleştiği safhadır. Bu nedenle inflamasyon durumlarında tedavinin erkenden yapılması ilerleyen zamanlarda inflamasyona bağlı oluşabilecek kanser riskini ortadan kaldırır.

KAYNAKÇA

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*, 6e: Sae-E-Book: Elsevier India.

Abdel-Maksoud, M. S., El-Gamal, M. I., Gamal El-Din, M. M., Choi, Y., Choi, J., Shin, J-S., Knag, S-Y., Yoo, H. K., Lee, K-T., Baek, D., & Oh, C. H. (2018). Synthesis of new triarylpyrazole derivatives possessing terminal sulfonamide moiety and their inhibitory effects on PGE2 and nitric oxide productions in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Molecules*, 23(10): 2556.

Adib-Conquy, M., & Cavaillon, J. M. (2007). Stress molecules in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *FEBS Lett*, 581(19): 3723-3733. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.074

Angiari, S. (2015). Selectin-mediated leukocyte trafficking during the development of autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 14(11): 984-995.

Arango Duque, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in immunology*, 5, 491.

Bachmann, M. F., Kopf, M., & Marsland, B. J. (2006). Chemokines: more than just road signs. *Nature reviews immunology*, 6(2): 159-164.

Brostjan C., & Oehler, R. (2020). The role of neutrophil death in chronic inflammation and cancer. *Cell Death Discovery*, 6(1): 26.

Brusselle, G., & Bracke, K. (2014). Targeting immune pathways for therapy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Am Thorac Soc*, 11 Suppl 5, S322-328.

Castanheira F. V., & Kubes, P. (2019). Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood*, The

Journal of the American Society of Hematology, 133(20): 2178-2185.

Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6): 7204.

Chu F-F., Esworthy, R. S., Chu, P. G., Longmate, J. A., Huycke, M. M., Wilczynski, S., & Doroshow, J. H. (2004). Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer research*, 64(3): 962-968.

Coussens, L. M., & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, 420(6917): 860-867.

Cutolo, M., Soldano, S., & Smith, V. (2019). Pathophysiology of systemic sclerosis: current understanding and new insights. *Expert Rev Clin Immunol*, 15(7): 753-764.

Czerkies, M., & Kwiatkowska, K. (2014). Toll-like receptors and their contribution to innate immunity: focus on TLR4 activation by lipopolysaccharide. *Medical Journal of Cell Biology*, 4(1): 1-23.

Diker, K. S. (2005). *İmmunoloji*. Medisan Yayınevi, Ankara.

Dmitrieva, O. S., Shilovskiy, I. P., Khaitov, M. R., & Grivennikov, S. I. (2016). Interleukins 1 and 6 as Main Mediators of Inflammation and Cancer. *Biochemistry (Mosc)*, 81(2): 80-90.

Faurschou, M., & Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection*, 5(14): 1317-1327.

Germolec, D. R., Shipkowski, K. A., Frawley, R. P., & Evans, E. (2018). Markers of inflammation. *Immunotoxicity Testing*, 57-79.

Granger, D. N. & Senchenkova, E. (2010). Inflammation and the Microcirculation. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function*, 2(1): 1-87.

Grant, L. (1973). The sticking and emigration of white blood cells in inflammation. In *The inflammatory process* (pp. 205-249): Elsevier.

Grivennikov, S. I., Greten F. R., & Karin M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6): 883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.

Gudkov, A. V., & Komarova, E. A. (2016). p53 and the Carcinogenicity of Chronic Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(11). doi:10.1101/cshperspect.a026161

Hayes, J. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Tew, K. D. (2020). Oxidative stress in cancer. *Cancer cell*, 38(2): 167-197.

Hendrayani, S. F., Al-Harbi, B., Al-Ansari, M. M., Silva, G., & Aboussekhra, A. (2016). The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF- κ B positive feedback loop includes AUF1 and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget*, 7(27): 41974-41985.

Henríquez-Olguín, C., Altamirano, F., Valladares, D., López, J. R., Allen, P. D., & Jaimovich, E. (2015). Altered ROS production, NF- κ B activation and interleukin-6 gene expression induced by electrical stimulation in dystrophic mdx skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1852(7): 1410-1419.

Kaminska, B. (2005). MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*, 1754(1-2): 253-262.

Karin, M. (2006). Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092): 431-436.

Kelly, M., Hwang, J. M., & Kubes, P. (2007). Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(1): 3-10.

Kończowska, E. (2007). Acute inflammation as a beneficial process—history and recent developments. *Kosmos*, 56: 27-38.

Kończowska, E., & Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13(3): 159-175.

Korniluk, A., Koper, O., Kemon, H., & Dymicka-Piekarska, V. (2017). From inflammation to cancer. *Irish Journal of Medical Science (1971-)*, 186(1): 57-62.

Kyriakis J. M., & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*, 81(2): 807-869.

Langereis, J. D. (2013). Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell adhesion & migration*, 7(6): 486-491.

Läubli, H., & Borsig, L. (2010). Selectins promote tumor metastasis. Paper presented at the Seminars in cancer biology.

Lawrence, T. (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6): a001651. doi:10.1101/cshperspect.a001651

Ley, K. (2001). History of Inflammation Research. In K. Ley (Ed.), *Physiology of Inflammation* (pp. 1-10). New York, NY: Springer New York.

Lu, H., Ouyang, W., & Huang, C. (2006). Inflammation, a key event in cancer development. *Molecular cancer research*, 4(4): 221-233.

Lydyard, P., Whelan, A., & Fanger, M. (2011). *BIOS Instant notes in immunology*: Taylor & Francis.

Maeda, S., Kamata, H., Luo, J. L., Leffert, H., & Karin, M. (2005). IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven

compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis. *Cell*, 121(7): 977-990.

Meira, L. B., Bugni J. M., Green, S. L., Lee, C-W., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B. H., Rogers, A. B., Moroski-Erkul, C. A., Mcfaline, J. L., Schauer, D. B., Dedon, P. C., Fox, J. G., & Samson, L. D. (2008). DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(7): 2516-2525.

Milenkovic, V. M., Stanton, E. H., Nothdurfter, C., Rupprecht, R., & Wetzel, C. H. (2019). The Role of Chemokines in the Pathophysiology of Major Depressive Disorder. *Int J Mol Sci*, 20(9).

Moser, B., Wolf, M., Walz, A., & Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*, 25(2): 75-84.

Mousa, S. A. (2008). Cell adhesion molecules: potential therapeutic & diagnostic implications. *Molecular biotechnology*, 38(1): 33-40.

Munn, L. L. (2017). Cancer and inflammation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 9(2): e1370.

Murata, M. (2018). Inflammation and cancer. *Environmental health and preventive medicine*, 23(1): 1-8.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*, 420(6917): 846-852.

Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature reviews immunology*, 6(3): 173-182.

Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, 140(6): 871-882.

Needham, E. J., Helmy, A., Zanier, E. R., Jones, J. L., Coles, A. J., & Menon, D. K. (2019). The immunological response to traumatic brain injury. *J Neuroimmunol*, 332: 112-125.

Ohnishi, S., Ma, N., Thanan, R., Pinlaor, S., Hammam, O., Murata, M., & Kawanishi, S. (2013). DNA damage in inflammation-related carcinogenesis and cancer stem cells. *Oxidative Med Cell Longev* 387014: 1–9. In.

Pahwa, R., Goyal, A., & Jialal, I. (2022). Chronic Inflammation. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>

Rakoff-Nahoum, S. (2006). Cancer issue: why cancer and inflammation? *The Yale journal of biology and medicine*, 79(3-4): 123.

Ravindranathan, D., Master, V. A., & Bilen M. A. (2021). Inflammatory markers in cancer immunotherapy. *Biology*, 10(4): 325.

Rubartelli, A., & Lotze, M. T. (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol*, 28(10): 429-436.

Scott, A., Khan, K., Cook, J., & Duronio V (2004). What is “inflammation”? Are we ready to move beyond Celsus? *British journal of sports medicine*, 38(3): 248-249.

Sell, S., Max, E. E., & Berkower, I. (2001). *Immunology, immunopathology and immunity*: ASM press Washington, DC.

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140(6): 805-820.

Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(11): 2563-2582.

Yousuf, A., Ibrahim, W., Greening, N. J., & Brightling, C. E. (2019). T2 Biologics for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 7(5): 1405-1416.

Zhou, Y., Hong, Y., & Huang, H. (2016). Triptolide Attenuates Inflammatory Response in Membranous Glomerulonephritis Rat via Downregulation of NF- κ B Signaling Pathway. *Kidney Blood Press Res*, 41(6): 901-910.

BÖLÜM V

Köpek ve Kedilerde İdrar Analizi

Efe KURTDEDE¹

Giriş

Veteriner hekimlikte klinik muayenede sistematik muayene yapmak çok önemlidir. Bunun için kliniğe getirilen hasta hayvanların sahiplerinden öncelikle hastası hakkındaki şikâyeti sorulur. Daha sonra hastanın yaşı, ırkı, cinsiyeti, barındırıldığı yerin fiziksel özellikleri, beslenmesi, günlük aktivitesi hakkında bilgiler edinilir. Ayrıca varsa karneleri incelenerek ya da hayvan sahibine sorularak hastaya bugüne kadar yapılan aşı uygulamaları ve iç-dış parazitler etkenlerle mücadele için yapılan uygulamalar sorulur. Hastanın son günlerde, haftalarda veya aylarda temasta bulunduğu hayvanlar, varsa yaşam şartlarında olan değişiklikler ve tükettiği gıdadaki ve içtiği suyun kaynağındaki değişiklikler, olduysa

¹ Araş. Gör. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, efekurtdede@gmail.com

hastanın yakın veya uzak yörelere seyahatleri, seyahat ettiği yörede temas ettiği hayvanlar ve çevre ile oralarda tükettiği gıdaların ve içtiği suyun kaynağı sorulur. Hastanın uzak ve yakın geçmişi ile ilgili bu bilgilerin ışığında hâlihazırda hasta sahibinin şikâyetine konu olan hastalık bulgusu arasında bir korelasyon kurularak hastalık bulgusunun olası nedeni hakkında çağrışım yapmaya çalışılır.

Klinik muayenede ikinci aşama hastaya dışarıdan bakılarak hastadaki mevcut bozukluğun hastanın canlılığında, çevreden gelen uyarımlara karşı ilgisinde bir değişikliğe yol açıp açmadığı değerlendirilir ve bu durumu ortaya koyacak temel nörolojik muayeneler ve değerlendirmeler yapılır. Bu muayene sonucunda veteriner hekim hastadaki durumun aciliyetini anlamış olur. Veteriner hekim hastadaki bozukluğun acil olduğuna karar verirse, hastanın solunum, dolaşım, üriner ve sinir sistemi ile ilgili organlarının fonksiyonlarını hızla kontrol ederek, bozukluk saptadığı fonksiyonları, hastanın yaşamını tehdit edecek düzeye gelmeden düzeltmek için gereken medikal müdahaleleri yapar. Bu uygulamalarla klinik bulguları itibariyle hastanın hayati tehlikesi ortadan kaldırılmış ve hasta stabil hale getirilmiş olur.

Kliniklere hasta şikâyeti ile getirilen ve durumu stabil olan hastalarda veya genel muayene amacıyla getirilen hastalarda hasta sahibinden hastanın geçmiş dönemleri ve hâlihazırdaki yaşam ve beslenmesi ve varsa geçirdiği hastalıklar hakkında ve hastaya geçmişte verilen veya varsa halen verilmekte olan ilaçlar hakkında bilgi alınır.

Bu aşamada veteriner hekim hastasında tüm vücut sistemlerini kapsayan sistematik fiziksel muayene gerçekleştirir. Bu amaçla fiziksel muayeneye beden sıcaklığını ölçme, mukozaların muayenesi, lenf yumrularının muayenesi ve deri ve kıl örtüsünün muayenesi ile başlanır. Bu esnada hastanın ayakta duruşu, başını tutuşu, vücuduna dokunma ve sesle yapılan dış uyarımlara karşı reaksiyonları ve reflekslerini kapsayan nörolojik fonksiyon değerlendirmesi gerçekleştirilmiş olur. Daha sonra sindirim,

solunum, dolaşım ve őriner sistem fonksiyonları anamnez bilgileri ve klinik bulgular dikkate alınarak değerlendirilir.

Kliniklere getirilen hastaların fiziksel muayenesi sonucunda yapılan değerlendirmeler sonrası, bazı organların temel fonksiyonlarının değerlendirilebilmesi amacıyla öncelikle hastalardan kan serum elde etmek için antikoagölantsız tüplere ve tam kan elde etmek için antikoagölantlı tüplere parametrelerin ölçümüne yetecek miktarlarda kan örnekleri vena sefalika antebraiki'nin ramus dorsalisinden veya vena safena parva'dan tekniğine uygun olarak alınır. Ayrıca tüm vücut sıvılarının ultrafiltratı olarak değerlendirilen, kan dolaşımının, böbreğin ve endokrin fonksiyonların bileşkesi olarak böbreklerde oluşturularak idrar kesesinde biriktirilen ve/veya idrar kesesinin nöroendokrin fonksiyonuyla uretradan dışarı atılan idrardan örnekler toplanır. İdrar örnekleri, gönüllü őrinasyon, manuel ekspresyon, sistosentez veya uretral sonda uygulaması yapılarak toplanır.

Hastalardan alınan kan serumu örneklerinde çeşitli biyokimyasal yöntemlerle vücuttaki reaktif durumdan kaynaklanan ve kan serumuna yansıyan biyolojik parametrelerin düzeyleri ölçölerek değerlendirilir. Tam kan örneklerinde kan hücrelerinin sayısal durumu ve birbirlerine oranları belirlenerek kan hücrelerinin őrütimi, kan dolaşımına salınımı, vücuttaki dağılımları ve vücut reaksiyonlarına göre sayısal ve morfolojik değişimleri ve vücuttan uzaklaştırılma durumları değerlendirilerek hastanın vücudundaki reaktif durum hakkında ipuçları elde edilmeye çalışılır.

Hastalardan toplanan idrar örneklerinde fiziksel, kimyasal ve mikroskopik yöntemleri kapsayan biyokimyasal analizler gerçekteştirilerek öncelikle böbrek, ureter, idrar kesesi ve uretranın dokusal bütünlüğü olmak üzere, bu dokulardaki inflamasyonun, nefrolitlerin ve urolitlerin varlığının ve bu organlardaki her türlü patolojik oluşumların neden olacağı deformasyonların ipuçları olabilecek bulgular araştırılır. Ayrıca vücuttaki her türlü biyolojik reaksiyonların ve patolojik reaksiyonların sonucu ortaya çıkan ve böbreklerden süzölerek idrara geçen solut maddelerin,

elektrolitlerin, hormonların ve enzimlerin düzeylerinin de çeşitli biyokimyasal yöntemlerle belirlenmesiyle vücudun genel sağlık durumu ve çeşitli organlara ait fonksiyonel bozukluklar hakkında ipuçları yakalanmaya çalışılır.

Kliniklere getirilen hasta hayvanların sahiplerinden alınan anamnez bilgisi, hastanın dışarıdan değerlendirilmesi, fiziksel muayenenin yapılması ve kan ve idrar örneklerinin toplanmasından sonra, bu ana kadarki klinik muayene sonuçlarının değerlendirilmesi sonrası daha ayrıntılı olarak değerlendirilmesine karar verilen organların morfolojilerinin değerlendirilebilmesi için çeşitli aydınlatma cihazları, endoskopik görüntüleme cihazları, radyografik görüntüleme cihazları, ultrasonografik görüntüleme cihazları ve bilgisayarlı tomografik görüntüleme cihazları kullanılır.

Üriner sistem kandaki artık ürünlerin uzaklaştırılması ve idrar şeklinde atılmasında görevlidir. Üriner sistem idrarın olduğu böbrekler, idrarın idrar kesesine taşındığı üreterler, idrarın toplandığı idrar kesesi ve idrarın dışarı atılmasında görev yapan uretradan oluşur. İdrar kesesinin çıkışında bulunan ve üretrayı saran bir bez olan prostat bezi de bu sistem içinde düşünülmelidir.

Böbrekler glomeruluslar, tubuluslar ve renal pelvis kısımlarından oluşur. Glomeruluslar bowman kapsülü ve içinde bulunan kan damarları yumağından oluşur. Kandaki solut maddelerin (glikoz, yağ) konsantrasyonunun oluşturduğu onkotik basınç ve kandaki elektrolitik maddelerin konsantrasyonunun oluşturduğu ozmotik basınç ve kanın volümünün kan damarlarına yaptığı basınç olan hidrostatik basınç sonucu kan içindeki sıvı, elektrolit ve küçük çapta olan solutlar bowman kapsülünün bazal membranındaki hücreler arasındaki seçici bariyer özelliğini taşıyan porlardan geçer.

Kanın ultrafiltratı olarak isimlendirilen bu filtrat tubuluslara geçer ve burada içindeki suyun ve elektrolitlerin büyük kısmı ve albüminin tamamı geri emilerek kana verilir. Ultrafiltrattaki fazla miktardaki solut maddeler idrarla atılır. Elektrolitler kan konsantrasyonlarının durumuna göre tubuluslarda ya kana geri

verilir veya idrarla atılır. Su kanın hidrostatik basıncının durumuna göre ya geri emilir veya idrarla birlikte atılır. Bu şekilde kanın ultrafiltratı olan sıvının sıvı ve elektrolit konsantrasyonu ve solut içeriği tubuluslarda kesinleşmiş olur ve idrarın pH'ı ve idrar spesifik graviditesi şekillenir. Sonuçta tubuluslardan geçen sıvı idrar olarak renal pelvise geçer. İdrar renal pelvisten ureterler aracılığıyla idrar kesesine taşınır ve oradan da uretra aracılığıyla dışarıya atılır.

Böbreklerde oluşup uretrayla dışarı atılan idrarın analizi, öncelikle üriner sistem organlarını direkt olarak etkileyen bozukluklar ve bunun yanısıra üriner sistemi sekonder olarak etkileyen diğer organ bozuklukları veya metabolik-endokrin bozukluklar hakkında ipuçlarının elde edilmesini sağlar.

Evcil hayvanlarda oluşan günlük idrar miktarı hayvanların fizyolojik durumuna, vücut ağırlığına, yaşına, cinsiyetine, tüketilen kuru madde miktarına ve günlük alınan su hacmine göre değişir (Zhanghi 2017). Gıdalar ile alınan su, içme suretiyle alınan su ve vücuttaki metabolik süreçler sonucu ortaya çıkan su hayvanların günlük su ihtiyacını karşıladığı gibi oluşturacağı idrarın spesifik graviditesi ve volümünün şekillenmesinde de önemli rol oynar. Bu nedenle hayvanların idrar analiz sonuçları değerlendirilirken yaşam ve beslenme şartları da göz önünde bulundurulur (NRC 2006, Zanghi ve Gardner 2018).

İdrarın volümünün büyük kısmı sudan oluşur. İdrar kanın glomerular ultrafiltratı olarak kabul edildiğinden plazmada bulunan maddelerin hemen hepsi idrarda da bulunabilir (Delanghe ve ark. 2014). İdrarda serbest aminoasitler yanında hippurik asit, merkaptopik asit de bulunur. Karbonhidratlar idrarda kısmen serbest halde, kısmen glikoprotein (mukopolisakkarit) ve glukuronik asit şeklinde olmak üzere fenol, steroid ve asitlere bağlı olarak bulunur (Tsamouri ve ark. 2022, Pezzali ve ark. 2020). İdrarla atılan önemli katyonlar Na^+ , Ca^+ , Mg^+ ve NH_4^+ iyonları iken başlıca anyonlar SO_4^{2-} , Cl^- ve PO_4^{3-} iyonlarıdır. İdrarda eser miktarda Fe^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , NO_3^- , HCO_3^- , F^- iyonları da bulunabilir (Glosson ve ark. 2023, Yamka ve ark. 2006).

İdrar analizinin değerlendirilmesinde idrar örneğinin alınması, idrarın fiziksel, kimyasal ve mikroskopik muayeneleri önemli yer tutmaktadır.

İdrar Örneğinin Alınması

İdrar analizleri çoğunlukla günün rastgele zamanlarında alınan taze idrar örneği ile yapılır. Bununla birlikte idrar analizinin 24 saatlik sürede toplanan idrar örneklerinde yapılması daha uygundur. Ancak idrarın 24 saatlik sürede toplanması uygulamasının hayvan sahibi ya da veteriner hekim tarafından gerçekleştirilmesi oldukça zordur.

Hayvanlardan gönüllü ürinyasyon, manuel ekspresyon, sistosentez veya uretral kataterizasyon yöntemleriyle toplanan idrar örnekleri temiz kaplara muhafaza edilir. İdrar bakteri üremesi için uygun bir ortam oluşturduğundan idrarın analizi sıklıkla örnek alımını takiben 1 saat içerisinde gerçekleştirilmelidir (Beatrice ve ark. 2010). İdrarın analizinde hızlı test çubukları kullanılacaksa örnek alımından hemen sonra test çubukları örneğin bulunduğu kabın içine batırılır ve sonuçlar hemen okunarak kaydedilir (Moore ve ark. 1991).

Eğer analiz hemen yapılamayacaksa idrar örneği +4°C'de 24 saat saklanabilmektedir (Neumann 2020). İdrarın analizinin gecikeceği durumlarda idrar örneklerine bazı koruyucu kimyasal maddeler (borik asit, tolüen, timol gibi) eklenmelidir. Bu durumda kullanılacak koruyucu maddelerin ve hayvanların idrar örneğini verdikleri dönemde kullanmakta oldukları ilaçların bazı testlerin sonuçlarını olumsuz yönde etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. İdrar analizi test stripleri kullanılarak yapılacaksa toplanan idrar örneklerine herhangi bir koruyucu maddenin katılmaması önerilir. Analiz için +4°C'de bekletilen idrar örnekleri analiz öncesi mutlaka laboratuvar sıcaklığına getirilmelidir (Yadav ve ark. 2020, Smyroglou ve ark. 2023, Farris ve ark. 2020).

İdrarın Fiziksel Muayenesi

1.Miktar

Yirmi dört saatte çıkarılan idrar miktarı öncelikle günlük olarak içilen su miktarına bağlıdır. Bununla birlikte günlük idrar miktarı gıdayla alınan sıvı miktarına, hayvanların vücut ağırlığına, metabolizmasına, dolaşım kanının volümüne ve basıncına, kandaki solut ve elektrolitlerin konsantrasyonuna ve böbreklerin filtrasyon yeteneğine bağlıdır. Ayrıca solunum, ter ve dışkı ile kaybedilen su miktarları da günlük olarak çıkarılan idrarın miktarında etkilidir (Palaseweenun ve ark. 2020, Cole ve ark. 2020).

Yetişkin hayvanların günde vücut ağırlıklarının her kilosu için 40-60 ml su aldıkları kabul edilir (Adams & Syme 2010). Alınan su miktarıyla orantılı olarak günlük olarak çıkarılan idrar miktarlarının alt ve üst sınırları arasında büyük dalgalanmalar görülebilmektedir.

Hayvanların günlük olarak çıkardıkları idrar miktarının artmasına poliüri, azalmasına oligüri, hiç idrar çıkaramama durumuna ise anüri denir.

2.Görünüm ve kıvam

İdrarın görünüm ve kıvamı içerdiği şekilli elementlere bağlı olarak değişir. İdrarda ürat kristalleri, asit idrarda ise diğer kristaller çökerek idrar örneklerinde bulanıklığa neden olur. Alkali idrar örneğinde triple fosfat (amonyum magnezyum fosfat) kristalleri de görülebilir. Ürat tuzları kuvvetli asit idrarda kırmızı veya balçık rengi bir çökelti oluşturur. Amorf ürat kristalleri özellikle soğuk havalarda toplanan idrar örneklerinde görülür ve bu durumun klinik önemi yoktur. İdrarda fosfatlar ve karbonatlardan ileri gelen bulanıklığa alkali ve nötr pH'daki idrar örneklerinde rastlanır (Tufani ve ark. 2017, Piech ve Wycislo 2019).

İdrar örneklerindeki bulanıklığın önemli bir nedeni de idrar örneklerindeki hücre yoğunluğudur. İdrar mm³'de 200'den fazla

lökosit veya 500'den fazla eritrosit içeriyorsa idrar örneği bulanık bir görünüm alır. Eritrositler idrar örneğinde kızıldan kahverengine kadar değişebilen renkte bir bulanıklık oluşturabilir. İdrar örneklerinde epitelial hücrelerin bol miktarda bulunması idrarın bulanık görülmesine neden olur. İdrar örneğinde bulunan bakteriler idrara beyazımsı mat bir görünüş verir. İdrar örneklerinde hücrelerden ileri gelen bulanıklık idrarın santrifüje edilmesinden sonra tortu şeklinde dibe çöker ve tüpün üst kısmı berraklaşır. İdrar örneklerinin içerdiği lipid nadiren idrar örneğinin bulanık veya süt renginde görülmesine neden olur (Jillings ve ark. 2019, Yudhanto ve ark. 2022).

3.Renk

Hayvanlarda idrarın rengi açık sarıdan koyu sarı renge kadar değişir. Hayvan idrarına renk veren maddelerden ürokrom protein metabolizmasından, ürobilin safra renkli maddelerin metabolizmasından köken alırlar (Bheja ve ark. 2022).

İdrarda renk oluşumuna neden olan diğer pigmentlerden olan üroeritrin melanin metabolizmasından kaynaklanırken, üroporfirinler iz miktarda riboflavin sayılır ve normalde az miktarda bulunur. İdrar analiz için bekletildiğinde içerdiği ürobilinojenin oksidasyonu sonucu idrarın rengi genellikle koyulaşır. İdrarla bilirubin atılması da idrarın renginin koyulaşması nedenlerindedir. İdrarda porfirinlerin varlığı ve homogentisik asidin anormal miktarlarında bulunması da idrar renginin koyulaşmasına neden olur ve idrar pH'ı hafif alkali ise idrar örneği hava ile temas ettiğinde bu maddeler esmer polimerlerine oksitlenir ve idrar esmer renkte görülür (McIntire ve ark. 2020).

Gıdaların içeriğindeki renkli maddeler, ilaçlar ve kimyasal maddeler de idrarın renginde değişikliklere neden olurlar.

4.Koku

İdrarın kokusu her hayvan türü için spesifiktir ve kokunun fenollerden kaynaklandığı sanılmaktadır. Köpek idrarı içerdiği

sülfitten dolayı et suyu veya sarımsak gibi kokar. Asidozis, ketozis ve ileri derecede şeker hastalığında idrar meyve esansı veya aseton benzeri bir koku yayar. Uzun süre bekleyen ya da septik şartlarda sağlanan idrar örneklerinde bir müddet sonra ürenin parçalanması sonucu amonyak kokusu alınır. İdrardaki amonyak kokusu sistit veya piyelit'te de görülür. Alınan yemler ve idrarla atılan ilaçlar da idrarın kokusunda değişikliklere neden olabilir (Jendmy ve ark. 2021, Moser ve McCulloch 2010).

5.Özgül Ağırlık (spesifik dansite)

Özgül ağırlık idrarda erimiş halde bulunan maddelerin (başlıca tuz ve üre) miktarına bağlı olup, idrar miktarı ile doğrudan ilişkilidir. İdrarın özgül ağırlığı genellikle çok idrar çıkarıldığı hallerde düşük, az idrar çıkarıldığı hallerde ise yüksek olur. İdrarın özgül ağırlığının ölçülmesinde ürinometre (dansitometre) kullanılır. Test çubukları kullanılarak yapılan dansite ölçümlerinde idrar örneğinin iyonik konsantrasyon gücü ölçülür ve bu bir renk değişikliği ile okunur. Burada indikatör madde bromtimol mavisidir (Paris ve ark. 2012, Mösch 2020).

İdrarda erimiş maddelerin konsantrasyonunun artması (çok miktarda NaCl veya glikoz) veya bu maddelerin idrardaki konsantrasyonunun normal olmasına karşı çıkarılan idrarın miktarının az olması sonucu idrarın özgül ağırlığı artar (hiperstenüri). Böbrek hastalıklarında normalde idrarla atılan maddelerin atılamaması veya fazla miktarda sıvı alımı nedenleriyle idrarın özgül ağırlığında bir azalma görülür (hipostenüri) (Lunn ve James 2007).

6.pH

İdrar pH'ı sadece beslenmeye bağlı değil, metabolik değişikliklere, çeşitli hastalık durumlarına ve kullanılan ilaçlara bağlı olarak da değişebilir. İdrar reaksiyonunun asit veya alkali olarak kabaca iki kategoride değerlendirilmesinde turnusol kâğıtları kullanılır. Bunun için mavi ve kırmızı renkli turnusol kâğıtları

kullanılır. İdrar test çubuklarının hepsi pH indikatörü içerir. Bu indikatörler genel olarak metilen kırmızısı ile brom timol mavisi olup 5 ila 9 arasındaki pH değerlerini ölçmeye yarar. Buradaki renk değişimi asit pH'ı gösteren turuncu renkten alkali renkleri gösteren yeşil ve mavi renge kadar değişir. Renk ile pH belirlemede +/- 0,5 pH ünitesi içinde ölçüm yapılabilir. Eğer idrar pH'ının daha duyarlı olarak ölçülmesi gerekiyorsa ölçüm için pH metre kullanılır. İdrar pH ölçümlerinde mutlaka taze idrar örnekleri kullanılmalıdır (Osborne ve ark. 1999, Arce ve ark. 2017).

İdrarın Kimyasal Muayenesi

İdrarın kimyasal analizi bilinen rutin kimyasal metotlarla tek tek yapılabileceği gibi, birden çok analize imkân veren test çubukları yardımıyla tek aşamada da gerçekleştirilebilir.

İdrar örneğinin geleneksel laboratuvar yöntemleri kullanılarak yapılacak kimyasal muayenesi için önce idrar örneği santrifüje edilir ve muayene santrifüj tüpünün üst tarafındaki kısmında gerçekleştirilir. Eğer santrifüj cihazı yoksa kimyasal muayene öncesi idrar örneği süzülmalıdır. İdrar örneğinin kimyasal muayenesi test çubukları kullanılarak yapılacaksa, idrar örneğinin santrifüje edilmesine veya süzülmesine gerek yoktur.

İdrar test çubuklarının üzerinde idrarda varlığı araştırılacak olan her bir parametre için ayrı ayrı reaksiyon bölgeleri bulunur. Reaksiyon bölgelerinde reaksiyonun prensiplerine uygun olarak çalışan kimyasal maddelerin yüklendiği ayıraç kağıtları ve bunların altında bir filtre kâğıdı vardır. Reaksiyon bölgeleri ince bir naylon ağ ile kapanmıştır ve aynı zamanda alt kısımdaki taşıyıcı şeride tespit edilmiştir. Böylece reaksiyon bölgeleri yırtılma ve kirlenmeden korunmuştur. Üstteki naylon ağ tabakası idrar örneğinin kısa bir sürede alt kısımdaki reaksiyon bölgelerine homojen bir şekilde geçişini ve dağılımını sağlar. İdrarın fazlası ise alt kısımdaki filtre kâğıdı tarafından emilir.

1. İdrarda şeker (glikoz) aranması

İdrarda şeker aranmasına dayalı deneylerin prensipleri genelde bakırın indirgenmesine dayanır ve bu deneyler; Trommer Testi, Fehling Testi, Benedikt Testi, Bizmutun indirgenmesi prensibine dayanan Nylander Testi olarak adlandırılır.

2. İdrarda protein aranması

İdrarda protein aranması için, kaynatma deneyi gibi koagülasyon prensibine veya Heller halka, Tanret, potasyum ferrisiyanür, sülfosalisilik asit ve Esbach gibi presipitasyon prensibine dayanan testlerden yararlanılabilir.

3. İdrarda keton maddelerin aranması

Aseton, asetoasetik asit ve beta hidroksibütirik asit sıklıkla lipid metabolizması ürünleri olması sebebiyle metabolik önemi bulunmaktadır. Ayrıca keton maddeleri olarak adlandırılır ve bunların idrarda görülmesi ketonüri olarak isimlendirilir. İdrardaki ketonlardan betahidroksibütirik asit %78, asetoasetik asitin %20,'si aseton %2 düzeylerinde bulunabilir. Asetondan asetoasetik asitten oluşabilir (dönüşümsüz reaksiyon). Bununla birlikte Betadihroksibütirik asit ve aseton arasında bir reaksiyon döngüsü vardır (dönüşümlü reaksiyon).

4. İdrarda bilirubin aranması

Fouchet metodu ile değerlendirilmektedir.

İdrarda kreatinin miktarı tayini Jaffe reaksiyonu ile yapılmaktadır.

5. İdrarda eritrosit ve hemoglobin aranması

Gum guaiac testi en sık kullanılan kimyasal metottur.

İdrarın Mikroskopik Muayenesi

Bunun için idrar örneğinden alınan 4 ml idrar santrifüj tüpüne konur ve tüp 1500 devirde 5 dakika santrifüje edilir. Daha sonra tüp içindeki idrar örneğinin üstte kalan 3.5 ml'lik kısmı atılır. Tüpün dibindeki tortu kısmından alınan örnek 0.5 ml idrar ile sulandırılıp lam üzerine lamel kullanılarak sürülür ve bu şekilde bir preparat hazırlanır. Hazırlanan preparatta mikroskopun 40'lık büyütmesi kullanılarak kırmızı kan hücreleri, epitel hücreleri,

kastlar, kristaller ve varsa bakterilerin varlığı ve yoğunluğu değerlendirilir.

Mikroskopta bol miktarda kan hücrelerinin görülmesi, üriner sistemde kanamalı bir lezyonun varlığını veya kanamaya yol açan bir bozukluğun varlığını düşündürür. Şiddetli idrar yolu enfeksiyonlarının, tümör oluşumunun, idrar yolu taşlarının ve kristallerinin ve erkek hayvanlarda prostat bezi hastalıklarının da hematüriye neden olabileceği düşünülmelidir. Yalnız burada idrar örneği toplama yöntemlerinin (kataterizasyon veya sistosentez) kanamaya yol açabileceği de dikkate alınmalıdır. Böbreklerdeki kanamalardan kaynaklanan hematüride mikroskop sahasında eritrosit kastlarına da rastlanır. Lökositler idrarda granüler yapıda sitoplazmaya sahip yuvarlak hücreler olarak görünür. Mikroskop sahasında fazla sayıda lökosit görülmesi üriner sistem enfeksiyonlarına işaret eder. Böbreklerden kaynaklanan enfeksiyonlarda mikroskop sahasında lökosit kastlarına da rastlanır. İdrar örneklerinde bol lökosite rastlanan hastalarda idrar örneklerinde boyama yapılarak mikrobiyolojik değerlendirme yapılması ve alınacak steril idrar örneklerinin bakteriyolojik kültürünün yapılması önerilir (Lippi ve ark. 2022).

İdrarda görülebilecek epitelyal hücreler, sağlıklı kedilerin idrar sedimentinde az sayıda bulunabilir. İdrar örneklerinde böbrek kökenli epitel hücresi, idrar kesesi kökenli epitel hücresi veya tümöral durumlarda anormal ve deforme hücre yapılarına rastlanır. Böbreklerden kaynaklanan epitel hücre atılımında mikroskop sahasında epitel hücre kastlarına da rastlanır (Yadav ve ark. 2020, Fromsa ve ark. 2011)

Mikroskop sahasında görülen kastlar tubulusların henle kulpunun çıkan kolunda, distal renal tubüllerin ve toplama kanallarının lumeninde biriken hücre, epitel, amiloid ve hyalin maddesi birikintilerinden oluşan uzun ve paralel duvarlı yapılardır. Kastlar renal tubüllerin kanallarını kaplayan epitel hücreleri tarafından salgılanan mukoproteinlerin tubuler kanallarda biriken maddelerin üzerini kaplamasıyla oluşur. İdrar örneklerinde gözlenen

kastlar birikintiyi oluşturan yapıya göre hiyalin kastları, amiloid kastları, granüler kastlar veya eritrositer kastlar olarak isimlendirilirler (Reppas ve Foster 2016)

Kristaller hayvanlarda rutin idrar tahlilinde yaygın olarak saptandığından, kristalrinin bir hastalık nedeni olarak değerlendirilebilmesi için ve saptanan kristalin özelliğine göre medikal tedavi ve diyet değişikliği uygulamalarının yapılabilmesi için hastadan daha sık olarak idrar rneği alıp kristal atılımının sreliği kontrol edilmelidir. İdrar rneklelerinde kristal değerlendirmesinin doğru sonuç verebilmesi için idrarın mikroskopik muayenesinin her zaman taze idrar rneklelerinde (toplamadan <1 saat sonra) yapılması gerekir. Toplandıktan sonra bir saatten fazla süre bekletilmiş idrar rneklelerinde veya +4⁰C'de bekletilmiş idrar rneklelerinde yeni kristallerin oluşumu veya var olan kristallerin çözünmesi gibi artefaktlar gelişir. İdrar rneklelerinde grlen kristallerden başlıcaları magnezyum amonyum sülfat (sitruvit), amorf fosfat, amonyum rat, amorf rat, ürik asit ve kalsiyum okzalat kristalleridir (Escolar ve ark. 1990).

Sonuç olarak alınan idrar rneklelerinde çeşitli biyokimyasal yöntemlerle vücuttaki reaktif durumdan kaynaklanan ve idrar içeriğine yansıyan biyolojik parametrelerin düzeyleri llerek değerlendirilir.

Kaynaklar

Zanghi B. Water needs and hydration for cats and dogs. In: Proceedings, Nestlé Purina Companion Animal Nutrition Summit. Vancouver, BC: (2017). p. 15–23.

Anonymous Chapter 9. Water. National Research Council. Nutrient Requirements of Dogs and Cats. Washington, DC: National Academies Press; (2006). p. 246–50. [Google Scholar].

Zanghi BM, Gardner CL. Total Water Intake and Urine Measures of Hydration in Adult Dogs Drinking Tap Water or a Nutrient-Enriched Water. *Front Vet Sci.* 2018 Dec 18;5:317. doi: 10.3389/fvets.2018.00317. PMID: 30619899; PMCID: PMC6305449.

Delanghe J, Speckaert M. Preanalytical requirements of urinalysis. *Biochem. Med.* 2014;24(1):89–104.

Kim, S.; Chen, J.; Cheng, T.; Gindulyte, A.; He, J.; He, S.; Li, Q.; Shoemaker, B.A.; Thiessen, P.A.; Yu, B.; et al. PubChem in 2021: New Data Content and Improved Web Interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2021, 49, D1388–D1395.

Tsamouri, M.M.; Durbin-Johnson, B.P.; Culp, W.T.N.; Palm, C.A.; Parikh, M.; Kent, M.S.; Ghosh, P.M. Untargeted Metabolomics Identify a Panel of Urinary Biomarkers for the Diagnosis of Urothelial Carcinoma of the Bladder, as Compared to Urolithiasis with or without Urinary Tract Infection in Dogs. *Metabolites* 2022, 12, 200. <https://doi.org/10.3390/metabo12030200>.

Julia Guazzelli Pezzali, Heather L Acuff, Will Henry, Celeste Alexander, Kelly S Swanson, Charles G Aldrich, Effects of different carbohydrate sources on taurine status in healthy Beagle dogs, *Journal of Animal Science*, Volume 98, Issue 2, February 2020, skaa010,

K.M. Glosson, X. Zhang, K.P. Zanzalari, S.S. Bascom, A.D. Rowson, Z. Wang, J.K. Drackley, Negative dietary cation-anion

difference and amount of calcium in prepartum diets: Effects on urine and serum minerals, JDS Communications, 2023 4

Yamka, Ryan M., and Scott L. Mickelsen. "The prediction of urine pH using dietary cations and anions in dogs fed dry and wet foods." *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 4.4 (2006): 355.

Moore FM, Brum SL, Brown L. Urine protein determination in dogs and cats: comparison of dipstick and sulfosalicylic acid procedures. *Vet Clin Pathol* 1991;20:95–97.

Beatrice L, Nizi F, Callegari D, Paltrinieri S, Zini E, D'Ippolito P, Zatelli A. Comparison of urine protein-to-creatinine ratio in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010 Jun 1;236(11):1221-4. doi: 10.2460/javma.236.11.1221. PMID: 20513201.

Neumann S, Fechner K, Czerny CP. Stability of canine urine samples under different storage conditions. *Can J Vet Res.* 2020 Oct;84(4):259-264. PMID: 33012974; PMCID: PMC7490999.

Yadav SN, Ahmed N, Nath AJ, Mahanta D, Kalita MK. Urinalysis in dog and cat: A review. *Vet World.* 2020 Oct;13(10):2133-2141. doi: 10.14202/vetworld.2020.2133-2141. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33281347; PMCID: PMC7704312.

Smyroglou, E.D.; Athanasiou, L.V.; Baka, R.D.; Polizopoulou, Z.S. Comparative Evaluation between Visual and Automated Dipstick Urinalyses in Dogs. *Vet. Sci.* 2023, 10, 284. <https://doi.org/10.3390/vetsci10040284>, E.D.; Athanasiou, L.V.; Baka, R.D.; Polizopoulou, Z.S. Comparative Evaluation between Visual and Automated Dipstick Urinalyses in Dogs. *Vet. Sci.* 2023, 10, 284. <https://doi.org/10.3390/vetsci10040284>.

Farris J, Camus MS, Krimer PM.. Leukocyte esterase and nitrite urine reagent strip utility under altered assay conditions in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2022; 58: 240-248 DOI: 10.5326/JAAHA-MS-7233.

Palaseweenun P, Hagen-Plantinga EA, Schonewille JT, Koop G, Butre C, Jonathan M, Wierenga PA, Hendriks WH. Urinary excretion of advanced glycation end products in dogs and cats. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2021 Jan;105(1):149-156. doi: 10.1111/jpn.13347. Epub 2020 Apr 11. PMID: 32279406; PMCID: PMC7818435.

Cole LP, Jepson R, Dawson C, Humm K. Hypertension, retinopathy, and acute kidney injury in dogs: A prospective study. *J Vet Intern Med*. 2020 Sep;34(5):1940-1947. doi: 10.1111/jvim.15839. Epub 2020 Jul 17. Erratum in: *J Vet Intern Med*. 2020 Nov;34(6):3168. PMID: 32677736; PMCID: PMC7517860.

Adams, L. G., & Syme, H. M. (2010). Canine ureteral and lower urinary tract diseases. In: S. J. Ettinger, & B. F. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine* (pp. 2086–2115). Elsevier Inc.

Tufani, N. A., Singh, J. L., Kumar, M., & Rajora, V. S. (2017). Diagnostic evaluation of renal failure in canine with special reference to urinalysis. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(6), 2354-2364.

Piech, T. L., & Wycislo, K. L. (2019). Importance of urinalysis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 49(2), 233-245.

Yudhanto, S., Hung, C. C., Maddox, C. W., & Varga, C. (2022). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from canine urine samples submitted to a Veterinary Diagnostic Laboratory, Illinois, United States. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 867784.

Bheja, A. S., Utami, T., Simarmata, Y. T., & Tophianong, T. C. (2022). The Identification of Crystalluria as an Early Picture of the Incidence of Urolithiasis in Cats in the Liliba Village. *Jurnal Veteriner Nusantara*, 5(1), 82-92.

McIntire, P. J., Kilic, I., Wojcik, E. M., Barkan, G. A., & Pambuccian, S. E. (2020). The color of urine: then and now—a comprehensive review of the literature with emphasis on intracytoplasmic pigments encountered in urinary cytology. *Journal of the American Society of Cytopathology*, 9(1), 9-19.

Jendryn, P., Twele, F., Meller, S., Osterhaus, A. D. M. E., Schalke, E., & Volk, H. A. (2021). Canine olfactory detection and its relevance to medical detection. *BMC infectious diseases*, 21, 1-15.

Moser, E., & McCulloch, M. (2010). Canine scent detection of human cancers: A review of methods and accuracy. *Journal of Veterinary Behavior*, 5(3), 145-152.

Paris, J. K., Bennett, A. D., Dodkin, S. J., & Gunn-Moore, D. A. (2012). Comparison of a digital and an optical analogue handheld refractometer for the measurement of canine urine specific gravity. *Veterinary Record*, 170(18), 463-463.

Mösch, M., Reese, S., Weber, K., Hartmann, K., & Dorsch, R. (2020). Influence of preanalytic and analytic variables in canine and feline urine specific gravity measurement by refractometer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(1), 36-43.

Lunn, K. F., & James, K. M. (2007). Normal and abnormal water balance: Polyuria and polydipsia. *COMPENDIUM ON CONTINUING EDUCATION FOR THE PRACTISING VETERINARIAN-NORTH AMERICAN EDITION-*, 29(10), 612.

Arce, M. G., Ferreira, M., & Gow, A. (2017, November). Determining the pH in canine urine: comparing visual and automated reading variability of urine dipstick analysis within a small animal teaching hospital. In *ECVIM-CA (European College of Veterinary Internal Medicine–Companion Animals) Congress*.

Osborne, C. A., Lulich, J. P., Polzin, D. J., Sanderson, S. L., Koehler, L. A., Ulrich, L. K., ... & Sudo, S. Z. (1999). Analysis of

77,000 canine uroliths: Perspectives from the Minnesota Urolith Center. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 29(1), 17-38.

Reppas G, Foster SF. Practical urinalysis in the cat: 2: Urine microscopic examination ‘tips and traps’. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2016;18(5):373-385. doi:[10.1177/1098612X16643249](https://doi.org/10.1177/1098612X16643249)

Yadav SN, Ahmed N, Nath AJ, Mahanta D, Kalita MK. Urinalysis in dog and cat: A review. *Vet World*. 2020 Oct;13(10):2133-2141. doi: 10.14202/vetworld.2020.2133-2141. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33281347; PMCID: PMC7704312.

Fromsa, A., Saini, N. S., & Rai, T. S. (2011). Diagnosis, prediction and mineral analysis of uroliths in canines. *Global Veterinaria*, 7(4), 610-617.

Lippi, I., Habermaass, V., Gori, E., Ebani, V. V., Pierini, A., & Marchetti, V. (2022). Urinary Cytology: Potential Role in Canine Urinary Tract Infections. *Veterinary Sciences*, 9(6), 304.

Escolar, E., Bellanato, J., & Medina, J. A. (1990). Structure and composition of canine urinary calculi. *Research in Veterinary Science*, 49(3), 327-333.

BÖLÜM VI

Veteriner Hekimlikte Kitosan Uygulamaları

Simge AKBULUT¹
Mert PEKCAN²

Giriş

Deniz ürünleri işletme endüstrileri tarafından yüksek miktarda yengeç ve karides kabukları çevresel atık olarak doğaya bırakılmaktadır. Günümüzde atık ürünlerin yeniden değerlendirilmesi amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmakta ve kabuklu su ürünlerinden çeşitli yöntemlerle yeni ürünler elde edilmektedir. Bu yeni ürünlere örnek olarak kitin ve kitin türevi olarak kitosan verilebilmektedir (Karaton- Kuzgun & Gürel- İnanlı, 2013). Kitin veya poli β -(1→4)-N-asetil-D-glukozamin, doğal bir polisakkarit olup birçok organizma tarafından sentezlenebilmektedir. Kitin

¹ Doktora Öğrencisi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası, smggrkk@gmail.com

² Doç. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, pekcan@ankara.edu.tr

doğada eklem bacaklıların dış iskeletinde, mantar ve mayaların hücre duvarında bulunur. Kitinin ana ticari kaynağı yengeç ve karides kabuklarıdır. Kitinin farklı derecelerde deasetilasyonundan kitosan isimli polimer ailesi elde edilmiş olur (Younes & Rinaudo, 2015). Kitosan β - (1 \rightarrow 4)-D glikozamino-N asetil-D-glikozamin yapıda ve biyolojik parçalanma sonrası çok düşük toksisiteye sahip bir polimerdir (Tuygun & Atasoy, 2016). Kitosan; doğal, katyonik ve mukozal yapışma polisakkaritidir, kitosanın bu özellikleri, özellikle farmasötik ajanların taşınmasında ve doku mühendisliğinde biyoyumlu bir polimer olarak kullanılmasına neden olmuştur (Rashki & ark., 2021). Son yıllarda kitosanın veteriner hekimlik alanında da kullanımı üzerine çeşitli araştırmalar yapılmakta ve yara iyileştirici ajan, antimikrobiyel bandaj malzemesi, ilaç ve hemostatik ajan olarak kullanımına literatürde yer verilmektedir (Şenel & McClure, 2004).

Kitin

Kitin, çok sayıda canlı organizma tarafından sentezlenir (Younes & Rinaudo, 2015). Doğada en çok bulunan biyopolimerlerden biri olan ve selülozdan sonra ikinci sırada yer alan kitin, hayvansal kökenli polisakkarittir (Mercimek- Takcı & ark., 2022). Kitinin yapı olarak selülozdan farkı; glikoz ünitesinde C-2 pozisyonunda hidroksil grubu yerine asetamid grubu içermesidir (Jang & ark., 2004).

Kitin, yeşil alg ve mantarların hücre duvarından ve kabuklular, kafadan bacaklılar ve yumuşakçaların dış iskeleti veya kabukları dahil olmak üzere çeşitli doğal kaynaklardan elde edilmiştir (Oryan & Sahvieh, 2017). Kitinin α , β ve γ olmak üzere üç polimorfik kristal yapısı vardır (Jang & ark., 2004). Doğada en fazla bulunan ve en stabil olan form α - kitindir. Fungal hücre duvarlarının temel bileşeni ise β - kitindir ve β - kitinin çözülme ve şişme halinde alfa kitine dönüştüğü bilinmektedir. Gama kitin ise nadir bulunan formu olup alfa ve beta formlarının bir karışımı veya ara formu olduğu düşünülmektedir (Üçgül, Aras & Özdemir-Küçükçapraz, 2016).

Kitin zincirleri, H- bağları aracılığıyla birleştirilir ve katı halde bulunur. Çözünürlüğü ve reaktivitesi bu içerdiği H- bağları sayesinde kontrol edilir (Younes & Rinaudo, 2015). Bu bağlar kitine baskın bir kristalin yapı kazandırmaktadır (Yıldırım, Öncül & Yıldırım, 2016). Kitin kararlı bir yapısı nedeniyle seyreltik asit ve bazik çözeltilerde, alkol ve suda çözünmez (Oğuzhan- Yıldız & Yangılar, 2014).

Kitin ağırlıkça %6,89 oranında azot içermektedir ve azot oranı ağırlıkça %7'nin üzerine çıktığında kitin yerine kitosan terimi kullanılmaktadır (Yıldırım, Öncül & Yıldırım, 2016).

Kitosan

Kitosan yapısal olarak (1→4)-2 amino-2-deoksi-β-D-glukan (D-glukozamin) ve (1→4) -2-asetamido-2-deoksi-β-D-glukan (N-asetil-D-glukozamin) olmak üzere iki monomerden oluşan lineer bir polisakarittir (Maldonado-Cabrera & ark., 2021). Bir ila dört glikozidik bağ içermektedir. Henri Braconnot tarafından 1811 yılında, kitinin, kitin deasetilaz ile enzimatik hidroliz veya alkali koşullar altında kimyasal hidroliz yoluyla kısmi deasetilasyonundan üretilmesiyle keşfedilen kitin türevidir (Oryan & Sahvieh, 2017). Kitosanın asetilasyon derecesi farklılık gösterebilmekte, bu oran %5-30 arasında olmaktadır. Kitosanların karakterizasyonunu azot içerikleri, asetilasyon derecesi ve molekül ağırlıkları belirlemektedir (Yıldırım, Öncül & Yıldırım, 2016).

Kitosan kokusuz, beyaz renkli, tatsız, yarı partikül ya da toz halinde bir maddedir. Sindirim enzimlerine dayanıklı olmasına rağmen bazı bakteriler tarafından parçalandığı bilinmektedir. Asidik çözücülerde çözünürken suda çözünmez. Organik asitlere göre inorganik asitlerde çözünme sınırlıdır (Oğuzhan- Yıldız & Yangılar, 2014). Kitin çözmek için kullanılan çözücüler toksik maddeler olabilmesine rağmen kitosanın seyreltik asetik asit içinde kolayca çözünebilmesi ve serbest amin gruplarına sahip olması kitosanın kitine göre daha avantajlı olmasını sağlamaktadır (Oğuzhan-Yıldız & Yangılar, 2014). Kitosanın kimyasal direnç, düşük toksisite,

metallerla şelatlama gibi benzersiz özellikleri vardır (Mercimek-Takcı & ark., 2022).

Kitosan, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilen, biyoaktif, toksik olmayan, maliyeti ve immünojenitesi düşük, antibakteriyel özelliğe sahip bir karbonhidrat biyopolimeridir. Bu özelliklere ek olarak diğer anyonik biyomateryaller ve moleküllerle kompleks oluşturması nedeniyle biyomedikal uygulamalarda da kullanılmaktadır (Oryan & Sahvieh, 2017).

Kitosan Hazırlanması

Kitinin değişen derecelerde deasetilasyonundan sonra elde edilen polimer ailesi kitosanı ifade etmektedir. Kitin ve kitosanın ayrımı, asetilasyon derecesidir. DA (molar yüzde olarak ifade edilir) % 50 mol'den daha düşük olduğunda kitosan olarak adlandırılır (Younes & Rinaudo, 2015).

Kitin ve kitosan elde edilmesi için genellikle iki yöntem tercih edilmektedir bunlar; kabukluların yan ürünlerinden kimyasal yöntemlerle veya biyolojik yöntemlerle elde edilmesidir (Kou, Peters & Mucalo, 2021).

Kimyasal Yöntem

Deniz kabuklularından kitosan elde edilmesi için uygulanılacak aşamalar: deproteinizasyon, demineralizasyon, dekolorasyon ve elde edilen kitinden deasetilasyon ile kitosan eldesidir (Oğuzhan- Yıldız & Yangılar, 2014).

Deproteinizasyon için sodyum hidroksit (NaOH) veya potasyum hidroksit (KOH) gibi düşük derişimdeki alkali çözeltiler, demineralizasyon için kalsiyum karbonat ya da hidroklorik asit (HCl) gibi sulu asit çözeltileri, dekolorizasyon aşaması için sodyum hipoklorit (NaClO), kloroform (CHCl₃), potasyum permanganat (KMnO₄), etil asetat (C₄H₈O₂) ya da hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılabilir. Deasetilasyon aşaması için tercih edilen; derişik NaOH çözeltisi ve yüksek sıcaklıklardır (Tokatlı &

Demirdöven, 2015). Deasetilasyon aşamasında asit çözeltiler yerine NaOH çözeltisi kullanılmasının sebebi yüksek düzeyde depolarizasyonun önüne geçmektir (Yıldırım, Öncül & Yıldırım, 2016).

İlk başta kitin elde edilecek doğal kaynak (kabuklu deniz ürünleri ve benzeri) yabancı maddelerden arındırılmak üzere yıkanır. Daha sonra deproteinizasyon işlemine geçilir. Deproteinizasyon işlemi için kabuklar %3'lük NaOH ile 30 dakika boyunca kaynatılır, kitininin protein komplekslerinin içerdiği kovalent bağların parçalanması sağlanır. Soğutulur ve alkali kalıntısı su ile uzaklaştırılır. İkinci aşama olan demineralizasyon aşaması için %3'lük HCl ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında muamele edildikten sonra suyla yıkanır. Bu deproteinizasyon ve demineralizasyon işlemleri ardından su oranı %6'nın altına düşen kabuklar preslenerek kitin elde edilir (Koç & Özkan, 2011). Dekolorizasyon aşamasında amaç renk ayırımıdır. NaClO ile pigmentlerin uzaklaştırılması sağlanır (Üçgül, Aras & Özdemir Küçükçapraz, 2016). Böylece Dekolorizasyon aşamasıyla kitinle kompleks halde bulunan astaksantini uzaklaştırılmış olur (Tokatlı & Demirdöven, 2015). Bu aşamalarla elde edilen kitin deasetilasyon aşamasında NaOH içerisinde 90 °C'lerde ısıtılır, filtre edildikten sonra yine alkali kalıntısını uzaklaştırmak için suyla yıkanır, preslenir. Pres işlemi fazla suyun uzaklaştırılması amacıyla yapılır. Nem içeriği %5'in altına düşene kadar güneş veya kurutucu yardımıyla kurumaya bırakılır. Kurutma işlemi sonrası elde edilen ürün kitosandır (Koç & Özkan, 2011).

Yapılan bir çalışmada demineralizasyon aşamasının deproteinizasyon aşamasından önce gelmesi gerektiği hipotezi öne sürülmüş fakat yapılan çalışmada anlamlı bir fark bulunamamıştır. Her ne kadar literatür açısından fark görülme bile günümüzde sürecin verimliliğinin artırılması için ıstakozdan kitosan eldesinde mineralizasyon aşamasının önce yapılması tavsiye edilmektedir. Bunun nedeni ıstakoz kabuklarının mineraller ve diğer organik bileşiklerle ağ şeklinde sıkı bir yapıya sahip olmasıdır (Kou, Peters & Mucalo, 2021).

Biyolojik Yöntem

Biyolojik yöntem enzimatik yolla veya mikrobiyal yolla gerçekleştirilebilmektedir (Tokatlı & Demirdöven, 2015).

Enzimatik yolla kitosan eldesinde proteolitik aktivite gösteren papain, proteaz ve pepsin gibi enzimler tercih edilirken; deasetilasyon aşaması kitin deasetilaz ile gerçekleştirilir (Tokatlı & Demirdöven, 2015).

Mikrobiyal yol kullanılarak kitosan elde edilmesinde demineralizasyon aşamasında laktik asit üreten *Lactobacillus plantarum* ve *Lactococcus lactis*, deproteinizasyon aşaması için proteaz aktivitesi olan *Lactobacillus plantarum* ve *Teredinobacter turnirae*, deasetilasyon aşamasında kitin deasetilaz etkisi gösteren *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* gibi mikroorganizmalar tercih edilmektedir (Tokatlı & Demirdöven, 2015).

Kitosan elde edilmesinde kimyasal methodların, biyolojik methodlara tercih edilme nedeni daha ucuz ve çoklu üretime olan uygunluğudur (Yıldırım, Öncül & Yıldırım, 2016).

Veteriner hekimlikte kitosan uygulamaları

Cilt tedavilerinde çeşitli biyomateryaller saf olarak ya da birleşim halinde kullanılabilir fakat bunlar genellikle cilt tedavilerinin uzun sürmesi nedeniyle veteriner hekimlikte hasta sahipleri için maliyetlidir. İyileşmeyi arttırmak amacıyla polimerlerin kullanılması yeni bir konudur ve kitosan bu yönde tercih edilen biyopolimerlerden biridir (Maldonado-Cabrera & ark., 2021). Hayvanlarda yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla kitin, kitosan ve türevlerini kullanılan birçok çalışma bulunmaktadır (Şenel, 2011). Son yıllarda in vitro ve in vivo yapılan çalışmalarda kitosanın inflamatuvar hücreleri uyardığı, lökosit fagositozu ve makrofaj fagositozu ve interlökin-4 (IL-4), IL-1, transforme edici büyüme faktörü- β 1 (TGF- β 1) üretimi ve fibroblast migrasyonunu arttırarak yara iyileşmesini sağladığı gösterilmiştir (Drewnowska & ark., 2013). Kitosan, birden fazla deri patojeni üzerinde ve bazı ilaç

dirençli türler üzerinde kanıtlanmış biyolojik aktiviteye (örneğin, büyüme inhibisyonu veya yapışma inhibisyonu) sahiptir. Ayrıca yara iyileşme süresini hızlandırıcı özelliklere sahiptir ve bu da deride hem antimikrobiyal hem de yara iyileştirici olarak tercih edilme nedenlerindedir (Costa & ark., 2018). Kitosan ve türevlerinin gram pozitif ve gram negatif bakteriler, maya ve mantarlar gibi hedef mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivitesi kitosanın, moleküler ağırlığına, kökenine ve etki derecesine bağlıdır (Mercimek- Takcı & ark., 2022).

Kitosanın, fibroblast ve endotel hücre hasarı ile karakterize edilen radyasyondan zarar görmüş yaralar üzerindeki etkisi araştırılmak amacıyla, pamuk lifi tipi kitosan köpeklerde röntgen ışınına maruz kalan cilt yarasına topikal olarak uygulanmıştır. Yapılan çalışmada kitosanın neovaskülarizasyonu ve granülasyon dokusu oluşumunu önemli ölçüde iyileştirdiği, radyasyon etkisine rağmen kitosanın yara iyileşme sürecini hızlandırabildiği gösterilmiştir. Ayrıca trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), TGF- β 1 ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) mRNA ekspresyonunun yukarı doğru düzenlendiği gösterilmiştir (Ueno & ark., 2007).

Dünyada özellikle son yıllarda kümes hayvan endüstrilerinin verimliliği oldukça artmıştır. Bu verimlilik artışı kümes hayvanlarının rasyonlarındaki yem katkı maddelerinin kullanımının önemini göstermiştir. Bir çalışmada etlik piliçlerde kitin ve kitosan ile beslenen gruplar büyüme performansı, karkas ve organ özellikleri etkisi bakımından karşılaştırılmıştır. Çalışmada kriketten elde edilen kitinin, piliçlerin büyüme performansını, karkas kalitesini organ özelliklerini kitosandan daha fazla ölçüde iyileştirdiği ortaya konulmuştur (Lokman & ark., 2019).

Diabetes Mellitus (DM), insülin yokluğu veya insülin direncine bağlı olarak gelişebilen kronik bir hastalıktır (Taheriazam & ark., 2023). Streptozotosin ile indüklenerek insüline bağımlı olmayan diyabetes mellitus (tip-2 DM) oluşturulmuş farelerde kitosan (%5 gıda katkısı) olarak 4 hafta boyunca uygulanmıştır. Dört

haftanın sonunda kitosanın farelerin kan şeker düzeylerini, kolesterol seviyelerini ve trigliserid seviyelerini düşürdüğü gözlenmiştir (Miura & ark., 1995). Başka bir çalışmada streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile düşük molekül ağırlıklı kitosan diyet uygulanmış glikoz ve kolesterol düzeyleri incelenmiştir. Yapılan çalışmanın sonunda yüksek molekül ağırlıklı kitosan ile beslenen grupta glikoz ve kolesterol düzeylerinde düşme, düşük molekül ağırlıklı kitosan ile beslenen grupta anlamlı bir fark gözlenememiştir. Farkın altında yatan mekanizmanın aydınlatılması, diyabetik sıçanlarda diyete verilen glikoz tepkisindeki belirgin değişkenliğin anlaşılmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Yao, Huang & Chiang, 2008).

Fosfatı bağladığı ve üre seviyelerini düşürdüğü iddia edilen kitosan bazlı bir besin takviyesi (EpakitinTM, Vétoquinol), köpeklerde ve kedilerde kronik böbrek hastalığında kullanılmak üzere ticari olarak mevcuttur (Şenel, 2011). Epakitin (Vétoquinol USA) %8 yengeç ve karides kabuğu ekstresi, %10 kalsiyum karbonat ve %82 laktoz içerir. Gastrointestinal fosfor emilimini azaltarak ve azalan protein sindirilebilirliğinin etkileri nedeniyle üre nitrojenini düşürerek kronik böbrek hastalarında etkisini göstermesi için tasarlanmıştır. Az sayıda normal ve kronik böbrek hastalıklı (KBH) kedi üzerinde yapılan bir çalışma, kitosan ve kalsiyum ile desteklenmiş normal bir bakım diyeti yiyen kedilerde, protein sindirilebilirliğinde bir azalmanın yanı sıra kan üre nitrojeni (BUN) ve serum fosfor düzeyinde düşme göstermiştir (Kidder & Chew, 2009).

Kitosan, özellikle antijenlerin mukozal iletimi ve bağışıklık tepkisinin iyileştirilmesi açısından veteriner ilaçlarında geniş çapta araştırılmaktadır. Biyobozunabilirliği, biyoyumluluğu ve düşük toksisitesi nedeniyle aşılar için hem adjuvan hem de dağıtım sistemi olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Ayrıca sulu dispersiyonlar, jeller, süngerler ve mikro/nanopartiküller gibi çok çeşitli kitosan dağıtım sistemlerinin antijenleri ve diğer adjuvanları taşıyabildiği gösterilmiştir. Halihazırda mevcut olan veya antijenler için

araştırılmakta olan diğ er dağı tım sistemleriyle karşı laştırıld ığında, kitosan bazlı dağı tım sistemleri, antijenin stabilitesinin hem hazırlama hem de depolama sırasında korunması gibi çeş itli avantajlar sunmaktadır (Ş enel, 2011). Kitosan bazlı nanotaşı yıcı ların yüksek biyoyu mlu lu ğ u nedeniyle gelecekte klinik ç alı ş malarda kullanılabil ece ğ i d ũ ş ũ n ũ lm ektedir. Son zamanlarda kitosan bazlı nanotaşı yıcı lar DM tedavisinde yaygın olarak uygulanmaktadır. İ ns ũ linin oral yoldan verilmesi kitosan nanopartik ũ llerinin DM tedavisinde en yaygın kullanımıdır ve ins ũ linin farmakolojik biyoyararlanımı nı artırır lar. Ayrıca, mukoadezif özelliklere sahip kitosan bazlı nano yapı lar, ins ũ linin oral biyoyararlanımı nı artırabilir. kitosan bazlı hidrojeller, ila ç ların s ũ rekli salını mı ve yara iyileş mesi gibi DM komplikasyonlarının tedavisi i ç in geli ş tirilmi ş tir. Ayrıca kitosan bazlı nanopartik ũ ller, DM tedavisinde fitokimyasalların ve diğ er terap ũ tik ajanların verilmesine aracılık edebilir ve bunlar, diğ erlerinin yanı sıra nefropati, n ũ ropati ve kardiyovask ũ ler hastalıklar dahil olmak ũ zere DM komplikasyonlarının tedavisi i ç in umut verici bileş ikler olarak kabul edilmektedir (Taheriazam & ark., 2023).

Antijenlere ek olarak nanoparç acık i ç eren aşı lara nanoaşı lar denilmektedir. Sucul canlı lar da ba ğ ı ş ıklık sistemini uyararak bulaş ıcı hastalıklara karşı korunma ve hastalıkların kontrol ũ i i ç in tercih edilen y ũ ntemlerden biri de aşı lamadır. Su ũ r ũ nleri aşı lamalarında nanoteknoloji uygulanmalarıyla toksisite ve kanser onik etki g ũ ster en kimyasal adjuvanların kullanımının ũ n ũ ne ge ç ilebilece ğ i d ũ ş ũ n ũ lm ektedir. Asya levreklerinde (*Lates calcarifer*) oral yolla kitosan tripoli ve kitosan fosfat nanoparç acıklarının DNA aşı sı ş eklinde kullanıld ı ğ ı bir ç alı ş mada aşı nın *Vibrio anguillarum*'a karşı ba ğ ı ş ıklık tepkilerini ind ũ kledi ğ i tespit edilmi ş tir (D ũ nmez, 2023). Ba ş ka bir ç alı ş mada C vitamini ile kitosan nanopartik ũ lleri konjuge edilmi ş tir. Vitaminin, g ũ kkuş a ğ ı alabalı ğ ına (*Oncorhynchus mykiss*) oral uygulamadan sonra 48 saate kadar salınd ı ğ ı ve balı ğ ın do ğ uş tan gelen ba ğ ı ş ıklık sistemini uyard ı ğ ı g ũ zlenmi ş tir (Shaalan & ark., 2016). Ba ş ka bir ç alı ş mada rekombinant DNA-kitosan nanopartik ũ llerinin karideslerde beyaz

nokta sendromu virüsüne (WSSV) karşı koruma etkinliği değerlendirilmiş, aşının oral uygulama sonrası karides bağışıklığını arttırdığı ve WSSV'ye karşı koruyucu etki sağladığı gözlenmiştir (Rajeshkumar & ark., 2009).

Sonuç

Deniz kabukluları artık ürünlerinden kitosan eldesi, çevreye karşı duyarlılık açısından önemli kabul edilebilir. Kitosanın kitinden kolay bir şekilde elde edilebilmesi, biyouyumlu ve düşük maliyeti yanında iritan karakterde olmaması veteriner hekimlik alanında kitosana olan ilgiyi arttırmış ve çeşitli çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. Kitosanın, antimikrobiyel, yara iyileştirici, hipoglisemik, hipolipidemik aktiviteleri yapılan çalışmalarda gösterilmesine karşın kitosanın etki mekanizması hala açıklanamamıştır. Diyabetik hayvanlarda etkileri çelişkili olup hem diyabet tipleri hem de molekül ağırlıkları üzerine daha fazla çalışma yapılmalıdır. Kitosanın aşı ve ilaç dağıtım sistemlerinde kullanımına yönelik çeşitli çalışmalarda pozitif etkileri hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalarla gösterilmiş ve ileride de benzer araştırmalara ilgi duyulacağı tahmin edilmektedir.

Kaynakça

Karaton Kuzgun, N, & Gürel İnanlı, A. (2013). Kitosan üretimi ve özellikleri ile kitosanın kullanım alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 16-21.

Younes I., & Rinaudo M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 13(3):1133-74. Doi: 10.3390/md13031133.

Tuygun, F., & Atasoy N. (2016). Diyabetik Yaraların İyileşmesinde Bazı Glikozaminoglikan Maddelerin (Kitosan ve Hyaluronan) Etkilerinin Karşılaştırılması. *Ataturk University Journal of Veterinary Sciences*, 11(2).

Rashki, S., Asgarpour, K., Tarrahimofrad, H., Hashemipour, M., Ebrahimi, M. S., Fathizadeh, H., Khorshidi, A., Khan, H., Marzhoseyni, Z., Salavati-Niasari, M., & Mirzaei, H. (2021). Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections. *Carbohydrate polymers*, 251, 117108. Doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117108.

Şenel, S., & McClure, S. J. (2004). Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 56(10), 1467–1480. Doi: 10.1016/j.addr.2004.02.007.

Oryan, A., & Sahvieh, S. (2017). Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *International journal of biological macromolecules*, 104(Pt A), 1003–1011. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.124.

Maldonado-Cabrera, B., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Osuna-Chávez, R. F., Escárcega-Galaz, A. A., Robles-Zepeda, R. E., & Sanches-Silva, A. (2021). Therapeutic effects of chitosan in veterinary dermatology: A systematic review of the literature. *Preventive veterinary medicine*, 190, 105325. Doi: 10.1016/j.prevetmed.2021.105325.

Oğuzhan Yıldız, P., & Yangılar, F. (2014). Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 30(3), 198-206.

Kou, S. G., Peters, L. M., & Mucalo, M. R. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International journal of biological macromolecules*, 169, 85-94. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005.

Drewnowska, O., Turek, B., Carstanjen, B., & Gajewski, Z. (2013). Chitosan -- a promising biomaterial in veterinary medicine. *Polish journal of veterinary sciences*, 16(4), 843-848. Doi: 10.2478/pjvs-2013-0119.

Koç, B. E., & Özkan, M. (2011). Gıda endüstrisinde kitosanın kullanımı. *Gıda/The Journal of Food*, 36(3).

Şenel, S. (2011). 33 Applications of Chitosan and Its Derivatives in Veterinary Medicine. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, 461.

Costa, E. M., Silva, S., Veiga, M., Tavoria, F. K., & Pintado, M. M. (2018). Chitosan's biological activity upon skin-related microorganisms and its potential textile applications. *World journal of microbiology & biotechnology*, 34(7), 93. Doi: 10.1007/s11274-018-2471-2.

Mercimek Takcı, H. A., Matyar, F., Yılmaz, F., Güzeldağ, G., & Çelik, H. İ. (2022). Antibacterial activity and characterization of water-soluble Chitosan compounds produced from enzymatic deacetylation. *Acta Aquatica Turcica*, 18(4), 451-460. Doi:10.22392/actaquatr.1074431.

Yıldırım, Z., Öncül, N., & Yıldırım, M. (2015). Kitosan ve antimikrobiyal özellikleri. *Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(1), 19-36.

Üçgül, İ., ARAS, S., & Küçükçapraz Özdemir, D. (2016). Farklı Hammadde Kaynaklarından Kitinin Safılaştırılması ve Tekstil

Uygulamaları. *Erzincan University Journal of Science and Technology*, 9(1), 46-56.

Tokatlı, K., & Demirdöven, A. (2015). Kitosan ve kitosan bazlı yenilebilir film uygulamaları. *Akademik Gıda*, 13(4), 348-353.

Lokman, I. H., Ibitoye, E. B., Hezmee, M. N. M., Goh, Y. M., Zuki, A. B. Z., Jimoh, A. A. (2019). Effects of chitin and chitosan from cricket and shrimp on growth and carcass performance of broiler chickens. *Trop Anim Health Prod.* 51(8):2219-2225. Doi:10.1007/s11250-019-01936-9.

Yao, H. T., Huang, S. Y., & Chiang, M. T. (2008). A comparative study on hypoglycemic and hypocholesterolemic effects of high and low molecular weight chitosan in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, 46(5), 1525-1534.

Kong C. S. & Kim S. K. (2011). Antidiabetic activity and cholesterol- lowering effect of chitin, chitosan and their derivatives. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives*, 285-291.

Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. I., Lee, C. H., & Nah, J. W. (2004). Physicochemical characterization of α -chitin, β -chitin, and γ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 42(14), 3423-3432.

Ueno, H., Ohya, T., Ito, H., Kobayashi, Y., Yamada, K., & Sato, M. (2007). Chitosan application to X-ray irradiated wound in dogs. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS*, 60(3), 304–310. Doi: 10.1016/j.bjps.2006.06.024.

Miura, T., Usami, M., Tsuura, Y., Ishida, H., & Seino, Y. (1995). Hypoglycemic and hypolipidemic effect of chitosan in normal and neonatal streptozotocin-induced diabetic mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 18: 1623–1625.

Dönmez, A. E. (2023). Su Ürünleri Aşılarında Nanoparçacıklar. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 34(1), 121-128. Doi: 10.35864/evmd.1216431.

Shaalán, M., Saleh, M., El-Mahdy, M., & El-Matbouli, M. (2016). Recent progress in applications of nanoparticles in fish medicine: a review. *Nanomed.: Nanotechnol Biol Med.* 12(3), 701-710. Doi: 10.1016/j.nano.2015.11.005.

Rajeshkumar, S., Venkatesan, C., Sarathi, M., Sarathbabu, V., Thomas, J., Anver Basha, K., & Sahul Hameed, A. S. (2009). Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & shellfish immunology*, 26(3), 429–437. Doi: 10.1016/j.fsi.2009.01.003.

Kidder, A. C., & Chew, D. (2009). Treatment options for hyperphosphatemia in feline CKD: what's out there? *Journal of feline medicine and surgery*, 11(11), 913-924.

Taheriazam, A., Entezari, M., Firouz, Z. M., Hajimazdarany, S., Hossein Heydargoy, M., Amin Moghadassi, A. H., Moghadaci, A., Sadrani, A., Motahhary, M., Harif Nashtifani, A., Zabolian, A., Tabari, T., Hashemi, M., Raesi, R., Jiang, M., Zhang, X., Salimimoghadam, S., Ertas, Y. N., & Sun, D. (2023). Eco-friendly chitosan-based nanostructures in diabetes mellitus therapy: Promising bioplatfroms with versatile therapeutic perspectives. *Environmental research*, 228, 115912. Doi: 10.1016/j.envres.2023.115912.

BÖLÜM VII

Kedi ve Köpeklerde Kanser ve Sitokinler

Yeliz KAYA KARTAL¹
Tevhide SEL²

Giriş

Kanser son yıllarda önemini gittikçe arttıran sadece genetik faktörlere bağlı değil, çevresel faktörlere de bağlı olan kronik seyirli bir hastalıktır. Hücrelerin anormal şekilde farklılaşp, bölünüp çoğalmasıyla ilgili bir hastalık olduğu için özellikle yaşlanma ile oluşma riski daha da artmaktadır. İnsanlarda oldukça önemli olan bu kronik seyirli hastalık son zamanlarda hayvanlarda da görülmeye başlanması ile önemi yanında merak uyandıran bir hastalık haline gelmiştir. Vahşi yaşamda oluşan rekabet kaynaklı hayvanların

¹ Araş. Gör. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, yelizkaya06@gmail.com

² Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, tevhidesel@gmail.com

yaşam ömürleri kısalmakta ve buna bağlı olarakta kanser oluşumuna dair bir bulguya rastlanılmamaktadır. Ancak kedi ve köpek gibi pet hayvanları günümüzde birçok hanede aile bireyleri olarak hayatımıza dahil olmakta ve böylelikle hastalıklarına ilişkin gözlem şansımızı da arttırmaktadır.

Yapılan araştırmalar göstermektedir ki balıklardan tilkilere kadar hemen hemen tüm hayvanlarda kanser görülebilmektedir. İnsanlar ile karşılaştırıldığında kanserin oluşum mekanizması farklılık gösterebilmektedir. Örneğin alkol kullanımı, tütün kullanımı veya kimyasallara maruz kalma gibi sebeplere bağlı kanser oluşumu insanlarda yaygın bir neden iken hayvanlarda böyle bir durum söz konusu olmamaktadır. Köpeklerde transmissible venereal tümör olarak bilinen ve bulaşıcı olan kanser türüne ise insanlarda rastlanılmamaktadır.

Sitokinler de en az kanser kadar günümüzde araştırılan bir başka konudur. Sitokinler sadece kanser değil hemen hemen tüm hastalıklarda hem biyobelirteç hem de terapötik ajan olarak kullanılabilen önemli biyomolekülerdir. Hem iyi hem kötü yönlerinin bulunmasından dolayı oldukça önemli bir araştırma konusu olmuştur. Özellikle yangısal oluşumlarda görev alan bazı proinflamatuvar sitokinlerin kronik seyirli hastalıkların ilerlemesinde başlıca rol aldıkları yapılan araştırmalarla desteklenmektedir. Kronik seyirli hastalıklarda yer alan kanser içinde bu nedenle oldukça önem teşkil etmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında Kanser, sitokinler ve kedi ve köpeklerde sıklıkla karşılaşılan kanser türleri ele alınarak sitokinlerin burada ele alınan kanserdeki rolleri ve etkileri yapılan çalışmalar doğrultusunda derlenecektir.

Kanser nedir?

Kanserin daha iyi anlaşılabilmesi için öncelikle tümörlerin tanımlanması gerekmektedir. Eskiden tümör denildiğinde vücudun herhangi bir bölgesinde meydana gelen bir şişlik anlaşılmaktaydı

ancak bugün neoplazma veya kontrolsüz hücre üremesi anlamında da kullanılmaktadır. Tümörler, köken aldıkları hücelere benzerlik gösteren ancak kontrolsüz olarak çoğalan ve doku ya da organa hiçbir faydası olmayan hücrelerin tamamıdır. Tümörleri iyi (benign) veya kötü (malign) huylu tümörler olarak ayırabilmekteyiz. Kötü huylu tümörler genelde köken aldıkları dokulardan benzerlik bakımından daha da uzaklaşır ve tanınmaz bir hale gelirler. Bu tür tümörlere ise kanser denilmektedir (Erer & Kıran, 2009; Köküslü, 1996).

Normal bir hücre belli durumlarda aldığı uyarılara yanıt olarak bölünme gerçekleştirir ve çoğalır. Aynı şekilde yaşlanıp görevini yerine getiren normal bir hücre aldığı uyarılar ile apoptoz denilen hücre ölümünü gerçekleştirir ve ortamdan uzaklaştırılır. Yani sağlıklı bir hücre DNA'da meydana gelen bir hatayı tespit ederek düzeltir veya yok eder (Akbulut & Akbulut, 2005; Fıfşkın, 2002). Bu dengenin bozulması ve hatalı DNA'ların artarak kontrolsüz hücre çoğalması kansere işaretir. Kanserde meydana gelen sürece karsinogenez denmekte ve bir kanser gelişiminin var olabilmesi için hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalabilmesi gerekmektedir. Bu kontrolsüz çoğalmaya eşlik eden en önemli özellikler ise hücrelerin ölümsüzlük kazanması yani apoptozun baskılanması ve metastaz yeteneği geliştirmesidir (Evan & Vousden, 2001; Fıfşkın, 2002). Dünya Sağlık Örgütü'nün tanımlamasına göre kanser, her yaştan ve cinsiyetten insanı etkileyebilen ve tüm doku veya organlardan köken alabilen yayılmacı özelliği olan ve normal sınırların dışına taşan anormal hücrelerdir (WHO, 2022).

Apoptoz; yaşlanan veya işlevini yitirmiş hücrelerin ortadan kaldırılmasına ve yerine yeni ve genç hücrelerin yapılmasında rol oynayan hücre döngüsünün sağlıklı şekilde devamını sağlayan en önemli olaylardan biridir. Daha kısa bir ifade ile apoptoz programlanmış hücre ölümüdür. Apoptoz daha fetusun rahme tutunması olayından başlar ve ölüme kadar devam eder. Apoptozun baskılanması sonucunda tümör büyüme eğiliminde olmaktadır (Hikim & ark., 1995; Tomatır, 2003). Apoptozu tanımlamak için önemli biyobelirteçler mevcut olmakla birlikte bu moleküller

kaspazlar, tümör nekroz faktörü reseptörleri ve B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) protein ailesi gibi apoptotik markerlardır (Strasser, 2000). Kaspazlar özellikle apoptozun sağlanmasında önemli enzimler olmakla birlikte p53 inhibitörü olan MDM2'nin parçalanmasını sağlayarak inaktive etmektedir (Nicholson & Thornberry, 1997).

Apoptozun baskılanması ne kadar kanserle ilişkiliyse inflamasyonda o kadar kanserle alakalı bir süreçtir. Kanser kronik bir hastalık olarak ele alınmasındaki en önemli neden kronik inflamasyonun kanser riskini artırıcı etkisidir. Bu durumda kronik inflamasyon zamanla kansere yol açabilirken, kanser oluşumunda inflamasyon artışı ile karakterizedir (Chen & ark., 2018; Reuter & ark., 2010). Kanser ve inflamasyonun yakın ilişki içinde olmasını bulan ilk kişi 19. yüzyılda kanser hücrelerindeki lenfosit varlığını ortaya koyan Rudolf Virchow olmuştur.

İnsanlarda kanser gelişimine neden olan önemli faktörler;

- Ultraviyole (UV) ışınları
- Radyasyon maruziyeti
- Tütün ve alkol kullanımı
- İyonlaştırıcı ajanlar
- Obezite
- Bazı mikroorganizmalar (Virüs, parazit, bakteri)
- Kimyasallara maruziyet
- Endüstri
- Stres
- İnflamasyon

(Erdem & ark., 2017; Yokuş & Çakır, 2002)

Bu faktörler göz önüne alındığında kanser oluşumu 4 alt grupta toplanabilmektedir. Bunlar;

- Kalıtım (Çevresel faktörler yanında etkisi oldukça düşüktür)
- Çevresel (Endüstri, Mikroroganizmalar, Kimyasallar vb)
- Davranışsal (Obezite, Tütün ve alkol vb)
- Biyolojik faktörlerdir.

Hangi durumla karşılaşılırsa karşılaşılınsın, her durumda sonuç olarak DNA hasarı ve gen mutasyonları şekillenmektedir. Dolayısıyla kanser gen mutasyonları ile karakterize olmakla birlikte yalnızca tek bir gen mutasyonu değil birçok gende oluşan hasarlarla meydana gelmektedir (Yokuş & Çakır, 2012).

Dünya çapında insan ölümünün önde gelen bir nedeni olmanın ötesinde, kanser esasen yaklaşık 1 milyar yıl önce metazoan yaşamına geçiş sırasında ortaya çıkan çok hücreli organizmaların patolojisidir (Aktipis & Nesse, 2013). Cnidarians'tan balinalara kadar neredeyse tüm hayvan krallığında görülür (Leroi, Koufopanou & Burt, 2003).

Sitokinlerin yapısı ve özellikleri

Sitokinler, 30 kDa'dan düşük olan küçük glikoproteinler olup makrofaj, lenfosit, granülosit, endotelial hücreler, fibroblast ve mast hücrelerinden üretilmektedir. İnflamasyon ve bağışıklık üzerinde karmaşık bir düzenleyici etkiye sahiptir. Sitokinler hormonlara benzeyen hücre içi haberciler olmakla birlikte hem otokrin hem parakrin hem de endokrin etkiye sahiptir (Deverman & Petterson, 2009; Owen, Punt & Stranford, 2007). Sitokinler üretildikten sonra hedef hücrelerin reseptörlerine bağlanarak gen aktivasyonuna neden olur ve biyolojik etkilerini bu şekilde gösterirler (Owen, Punt & Stranford, 2007)

Yüksek derecede a sarmal yapıya sahiptirler ve moleküller dört a sarmal demeti ile benzer bir polipeptit katını paylaşırlar.

Bunlar sınıflandırılırken, Th1 hücreleri veya Th2 hücrelerinden üretilmeye başlanarak sınıflandırmaya devam edilir. Yakın zamanda Th1 ve Th2 hücrelerinden farklı sitokin profilini gösteren Th hücrelerinin (Th17) ve T düzenleyici hücrelerin (Treg) üçüncü bir alt grubu kategorize edilmiştir. Treg hücreleri tip 1 (Tr1), daha az miktarda ve çok düşük TGF- β ve IL-2 seviyesinde temel olarak IL-10 ve IFN- γ , IL-5 salgılar. Treg'in Tr3 alt kümesi (ayrıca Th3 hücreleri olarak da adlandırılır) tercihen TGF- β ve daha az miktarda IL-10 üretir (Barnes, 2008).

Salgılarına göre, lenfokinler (T hücreleri tarafından salgılanan ve bağışıklık yanıtını düzenleyen sitokinler), proinflamatuvar sitokinler (inflamatuvar süreci hızlandıran ve sürdüren sitokinler), büyüme faktörleri (hücre sağkalımını destekleyen ve yapısal değişikliklere neden olan sitokinler) olarak sınıflandırılırlar. Ayrıca Kemokinler (yangı hücreleri için kemotaktik olan sitokinler) ve Anti-inflamatuar sitokinler (yangı tepkisini negatif olarak modüle eden sitokinler)'de alt sınıflandırmada yer almaktadır. Sitokinleri birebir sınıflandırmak pek mümkün değildir ve bir grup içinde yer alan bir sitokin diğer bir grupta da yer alabilmektedir (Akdoğan & Yöntem, 2018; Diker, 2005).

Sitokinler uygun yara iyileşmesini destekleyen enfeksiyon ve yaralanma bölgelerinde inflamatuvar cevabı yürütmek için gerekli araçlardır. Bununla birlikte, yaralanma bölgesinde proinflamatuvar sitokinlerin abartılı üretimi hemodinamik instabilite veya metabolik düzensizlikler olarak sistemik olarak ortaya çıkabilir. Şiddetli yaralanma veya enfeksiyondan sonra, şiddetli ve kalıcı Th1 sitokin cevabı, çoklu organ yetmezliği ve ölüme yol açan hedef organ hasarı için katkıda bulunabilir. Th2 sitokinleri bu istenmeyen etkilerin bazılarını en aza indirebilir. Sitokinleri köken aldıkları hücreye veya biyolojik işlevlerine göre sınıflandırmak mümkün olmadığından, bunlar interlökinler (IL, IL-1'den IL-35'e sıralı olarak numaralandırılmış), tümör nekroz faktörleri (TNF), kemokinler (kemotaktik sitokinler), interferonlar (IFN) ve mezenkimal büyüme faktörleri olarak gruplandırılmıştır (Barros de Oliveira & ark, 2011; Diker, 2005; Sommer & White, 2010).

Sitokinler neredeyse her biyolojik süreci etkiler; Bunlar arasında embriyonik gelişim, hastalık patogenezi, enfeksiyona spesifik olmayan yanıt, antijene spesifik cevap, bilişsel işlevlerdeki değişiklikler ve yaşlanmanın dejeneratif süreçlerinin ilerlemesi yer alır. Ayrıca sitokinler, kök hücre farklılaşmasının, aşı etkinliğinin ve allogreft reddinin bir parçasıdır. Bu küçük, yapısal olmayan proteinlerin çeşitli ve sıklıkla çelişen aktiviteleri inflamasyon ve immünoloji alanlarını etkilemektedir. Çoklu biyolojik özellikler veya pleiotropizm bir sitokinin ayırt edici özelliğidir. Günümüzde "sitokin" terimi interferonları, interlökinleri, kemokin ailesini, mezenkimal büyüme faktörlerini, tümör nekroz faktörü ailesini ve adipokinleri kapsar. Sitokin benzeri aktiviteleri kodlayan 100'ün üzerinde ayrı gen vardır, bunların birçoğu örtüşen işlevlere sahiptir ve pek çoğu henüz keşfedilmemiştir (Kelso, 1998).

Sitokinler fonksiyonel sınıflara ayrılabilir. Örneğin, bazı sitokinler başlıca lenfosit büyüme faktörleridir, diğerleri ise proenflamatuar veya anti-inflamatuar moleküller olarak işlev görürken, diğer sitokinler antijene karşı immün yanıtı polarize eder. Sitokinler hemen hemen her biyolojik disiplinde çalışılmasına rağmen, sitokin aracılı etkiler inflamasyon, immünoloji, ateroskleroz ve kanser alanlarına hakimdir. Örneğin, kemokinler ve bunların reseptörleri enflamasyon, HIV-1 patojenezi, lenfosit kaçağı ve otoimmün hastalığa etki etmiştir. NALP1 genindeki mutasyonlar otoimmün hastalıklar ile ilişkiliyken NALP3'teki mutasyonlar otoinflamatuar hastalıklar ile ilişkilidir (Dinarello, 2007).

Tablo 1. Sitokin ve reseptörlerinin rol aldıkları görevlerine göre sınıflandırılması

Aktivite	Sitokin ve Reseptörleri
Hücre aracılı bağışıklık (proinflamatuvar)	IL 1 IL 7 IL 15 IL 6 IL 21 TNF- β IFN α IL 2 IL 10 IL16 IL 18 IL 23 TNF- α IFN β IL 4 IL 11 IL 17 IL 12 IFN γ
Humoral bağışıklık (proinflamatuvar)	IL1 IL4 IL6 IL12 IL15 IL25 IL2 IL5 IL10 IL13 IL21 TGF β
Alerjik bağışıklık (proinflamatuvar)	IL3 IL5 IL13 IFN γ SCF IL4 IL9 IL25 GM-CSF
Antiinflamatuvar	IL4 IL6 IL13 IL20 IL24 TGF β IL1RA IL5 IL10 IL19 IL22 IL26 IL1RII.

Elbette, bir hücrenin ürettiği ve bir başka hücreye etki eden bir çözünebilir faktör olarak bir sitokinin tanımı, hedef hücrenin işlevinde bir değişiklik meydana getirmek için, hormonların endokrin sistemine dayanmaktadır. Bir bakıma, sitokinleri immün ve inflamatuvar yanıtların “hormonları” olarak düşünebiliriz. Bununla birlikte, sitokinlerin bazı özellikleri bu tanımdan kaçmaktadır. Hormonlar belirli bir doku veya hücrenin birincil ürünleridir, oysa sitokinler çoğu hücrenin ürünüdür. Ancak sistemik bir inflamatuvar yanıt sırasında, sitokinler endokrine benzer aktivite sergiler. Hedef hücrelerin zarında, bunların sinyal iletimi ve düzenleyici işlevleri için spesifik reseptörleri vardır (Kelso, 2000).

Çeşitli uyarılara yanıt olarak sitokinler beyaz kan hücreleri dahil çeşitli hücrelerden salgılanır. Doğuştan gelen cevap konakçının hayatta kalması için gereklidir ancak hastalıkta da nedenseldir. Çeşitli hücre içi mikroorganizmalara karşı savunma için gerekli olan

interferon (IFN), çeşitli otoimmün hastalıkların patogeneğinde önemli bir sitokindir (Khan, 2016). Sitotoksik T hücrelerinin (CTL) oluşturulması için IL-2'ye ihtiyaç vardır ve birkaç aşı için temel oluşturur fakat aynı sitokin, bazı istenmeyen etkileri oluşturabilir ve bağışıklıkla ilgili toleransın gelişmesinde önemli bir rol oynadığı için doku reddi gibi durumlardan da sorumlu bir sitokindir. İnflamasyon, bağışıklık ve enfeksiyonlara ek olarak, sitokinler artık alanlarını ateroskleroz ve kansere genişletmiştir. Bu nedenle sitokinler sağlık ve hastalık için yararlı biyo-belirteçler olabilir ve teşhis, prognostik ve terapötik maddeler olarak işlev görebilir (Gulati & ark., 2016; Khan, 2016).

Lenfosit fonksiyonlarının düzenleyicileri olarak çözünen faktörler, 1970'lerin ortalarına kadar, Igal Gery ve Byron Waksman'ın tanımlamasıyla "lenfosit aktivasyon faktörü" olarak adlandırılmıştır ve daha sonra T hücre büyüme faktörü olarak değiştirilmiştir. Bir hastalık sürecinin, bu çözünebilir faktörlerin (sitokinler) hücrelerden üretilmesini tetiklediği ve bu "faktörlerin", hastalığın belirtilerini yansıtan özellik (ler) olduğu ortaya çıkmıştır. Bu görüş, konakçının enfeksiyonla başladığı spesifik olmayan fizyolojik ve immünolojik kargaşa ile en iyi şekilde değerlendirilir (Gery & Waksman, 1972; Mier & Gallo, 1980).

Hayvanlarda Sitokinler

Tavşanların peritoneal kavitesinden nötrofillerden salınan çözünebilir faktörler, bir hastalık (çoğu vakada enfeksiyon) ve konakçının (ateş) tepkisi arasında bir bağlantı kurabilen ilk faktördür. Bu çözünebilir faktörlerin biyolojik özellikleri ateş, viral enfeksiyonlara direnç, beyaz kan hücresi sayısının artması, akut faz proteinlerinin sentezi, kanser hücrelerinin ölümü ve enflamatuar hücrelerin göçünü içerir (Dinarello, 2007).

Sitokinler, reseptörlerin ve sinyallerin kademeli dizisinin ortaya çıkmasından önce en erken biçimlerden hücre içi moleküller olarak gelişmiştir. Sitokin benzeri aktivitelerin denizyıldızı ve *Drosophila* gibi omurgasızlarda, konak savunmasında ve onarımında

önemli bir rol oynadıkları gösterilmiştir. Poikilotermik kertenkelelerde sitokin aracılı vücut ısısında sağkalım mekanizması olarak ortaya çıkmıştır. Bazı sitokinler, belirli reseptörler için transkripsiyon faktörleri (muhtemelen başlangıç fonksiyonları) ve ekstraselüler ligandlar olarak işlev görürler (Bernheim & Kluger, 1976).

Sitokinlerin insanlarda ve kemirgenlerde yoğun olarak çalışılmış olmasına rağmen, evcil hayvanlarda sitokinlerin araştırılması, yakın zamanda, sitokinlerin immünolojik ve enflamatuar süreçlerdeki öneminin giderek farkına varılmasıyla hızlanmaya başlamıştır (Myers & ark., 1995).

Kanser sürecinde sitokinlerin rolü;

Sitokinler, kanserlerin büyümesini ve yayılmasını düzenlemede yer alır. Kanser hücreleri, sitokin üretme kabiliyetinde olmakla birlikte sitokinlerde kanser gelişmesine yardımcı bir ortam üretmek için otokrin veya fibroblastlar ve kan damarları gibi destekleyici dokularda kanser hücreleri üzerinde etkili olabilir. Sitokinler ayrıca, habis süreci destekleyen ek sitokinler üretmek için tümörle ilişkili makrofajlar ve endotelial hücreler gibi normal hücreleri de indükleyebilir. Sayısız kanser türüyle ilişkili sitokin profillerinde muazzam çeşitlilik vardır (Ostman & Augsten, 2009).

Kontrolsüz Büyüme: Bazı kanserler, diğer hücrelerin büyüme faktörleri üretmelerini indüklemek için sitokinleri kullanırlar.

Anjiyogenez ve Stromal Oluşumu: Tümör kütesinin sürekli olarak büyümesi oluşan yeni kan damarlarından kaynaklanmakta ve tümörler için oldukça önemlidir. Çoğu kanser, aynı zamanda, diğer doku stromal elemanlarını da indüklemekte, ayrıca lokal doku invazyonunu kolaylaştırmak için ekstraselüler matriksin çevresini de değiştirmektedir.

Metastatik yayılım: Sitokinler, metastatik bölgelerdeki tümör hücresi adezyonunu desteklemede rol aldıkları gibi, tümör

büyüme faktörlerinin de üretmek için bölgedeki normal hücreleri aktive etmede rol oynamaktadırlar. IL-1, tümör hücrelerinin ürettiği bir sitokin olup endotelial hücrelerden çözünebilir hücreler arası adhezyon moleküllerinin salınımını artırmaktadır.

Kanserli tüm hastalarda sadece tek bir sitokin bulunmaması önemlidir. Ayrıca, klinik olarak saptanabilir sitokin seviyelerinin olmaması, sistemik etkilerde rol oynamayı dışlamaz. Kanserli tedavi etmek için sitokinlerin kullanımı muazzam bir araştırma çabasının konusudur. Tümör hücrelerin ürettiği sitokinlere karşılık, sitokinler kemoterapi/radyoterapi gibi tedavi seçeneklerinin etkinliğini arttırmak için de kullanılmıştır. Malign süreçte yer alan sitokinler kanserli hastaların semptomlarında da önemli rol oynarlar (Musul, 2018).

Hayvanlarda Kanser

Hayvanlarda tütün ve alkol gibi kullanımlar bulunmadığından tümörün oluşum sebepleri ve sebeplerin sıklığı da buna bağlı olarak farklılık göstermektedir.

Sebepleri:

- Doku anomalileri
- Fiziksel kronik irritasyonlar (Boğalara takılan burun halkaları burunda fibroma sebep olabilir)
- Aktinik Işıklar (Hayvanlarda daha nadir görülür tüylerle örtülü olmaları UV ışınından etkilenme riskini azaltmaktadır)
- Radyoaktif maddeler (Deney hayvanlarında radyoaktif fosfor ve uranyum deneysel olarak lösemi yaptığı belirlenmiştir)
- Parazitler (Gastrophilus larvaları atların midelerinde papilloma sebep olabilir)

- Kimyasal Karsinojenler (Hayvanlarda en nadir görülen sebeplerdendir ancak bir maruziyet olması durumunda tıpkı insanlardaki gibi oluşum riski artar)
- Hormonlar (Östrojene bağlı özellikle köpeklerde oluşan meme tümörü)
- Kalıtım (Hereford ırkı sığırların bazı belli ailelerinde kornea ve konjunktiva kökenli göz kanserine yatkınlık olduğu söylenmektedir.)
- Viruslar (onkojenik viruslar adı altında anılır örneğin kedilerde lösemi yapan leukemia virusu gibi)
- Bakteriyel Enfeksiyonlar (Daha çok insanlarda bu sebeple tümör oluşumları görülür hayvanlarda nadirdir.)
- Bazı Bitki türleri (eğrelti otu sığırlarda sidik kesesinde, sıçan ve farelerde ise sidik kesesi ve bağırsaklarda tümör oluşturabilmektedir.)
- Vitaminler (Vitamin E civcivlerde lenfosarkom yapar)
- (Güreşen, 2018)

Ekolojistler onkojenik fenomeni göz ardı etmiş olsalar da ekosistem işleyişindeki rolleri aslında bireysel rekabetçi ve dağınık yetenekleri, patojenlere yatkınlığı ve predasyona karşı hassasiyeti etkilediği için karsinogenez önemli olabilir. Hayvanların davranışlarının ve yaşama biçimlerinin de kanserle yakından ilişkili olabileceği araştırmalar sonucu ortaya çıkmıştır. İlk olarak, insanlardakinden farklı olarak hayvanlardaki onkojenik fenomenler (nadir) metastatik kanserler ile sınırlı değildir, bunun yerine hayvanın yaşamı boyunca gelişen ve sağlık ve canlılık için çeşitli sonuçlara sahip olan çok çeşitli iyi huylu ve habis tümörleri içerirler (Vittecoq & ark., 2015). İkincisi ise hayvanların kanserden kaynaklanan ölümün olması laboratuvar koşullarında veya ev hayvanlarında mümkünken vahşi yaşamda paraziter sorunlar, türler arası rekabet, doğal seleksiyon gibi başlıca sebeplerden dolayı

kanser kaynaklı ölümlerin gözlemlenme şansının çok düşük olduğu bildirilmiştir.

Evrimsel yollar ve kansere karşı genetik mekanizmalar şu anda bazı vahşi yaşam türlerinde yoğun olarak araştırılmaktadır (Caulin & Maley, 2011), fakat davranışsal adaptasyonlara çok daha az dikkat edilmiştir. Potansiyel olarak kanser ortaya çıkmasını ve / veya ilerlemesini destekleyen çevresel faktörler potansiyel olarak çoktur, bunların kökenleri hem antropojeniktir (birçok formda kirlilik) hem de doğaldır (örneğin doğal radyasyon seviyeleri, onkojenik patojenler, bulaşıcı kanserler, ikincil bileşikler ve çeşitli stres türleri).

Doğal seçim, kendilerini kanser oluşumundan ve / veya ilerlemesinden koruyan davranışsal özellikler sergileyen bireyleri desteklemeli, ancak aynı zamanda, yavrular için kanser risklerini azaltan ebeveyn davranışlarını sergileyen bireyleri de desteklemelidir. Örneğin, belirli bir yaştan sonra, mutajenler tarafından daha az kirletilen üreme habitatlarının tercih edilmesi, yetişkinlerin hayatta kalmasında kanser kaynaklı azalmayı çok az etkileyebilecek veya hiç etkilemeyecek olsa da daha sonraki ya da daha fazla olan maligniteleri geliştiren sonraki yavruların olasılığı için çok önemli olabilir. Bu nedenle, negatif olarak ortaya çıkacak sonuçlar (yani, habitat seçimi ve seçici bireyler için kanser arasında bir bağlantı) bile, dikkatle ele alınmalıdır. Ancak, kanserden kaçınma için uyarlanabilir davranışın, uzunlmasına ve çok boyutlu araştırma gerektiren bir nesiller arası süreç olduğu akılda tutulmalıdır. Gelişmekte olan kanseri riske etmekten kaçınmanın bir başka dolaylı yolu cinsel seçim yoluylaadır. 'İyi genler' hipotezine göre (Møller & Alatalo, 1999) sağlıklı bireyler, soyunu üstün bir genetik arka plan ile sağlayacaktır. Onkojenik fenomenler bağlamında, tümör-taşıyan bireyler potansiyel olarak yavrulara genetik savunmasızlığı potansiyel olarak aktarabilirken, kanserli olmayan bireyler yavrularına kansere karşı etkili genetik savunmalar sağlayabilirler. Hipotez, gelişmekte olan kansere sahip olmayan ancak güçlü antitümör savunmaları gösteren bireylere de uygulanabilir; çünkü malignitelere karşı enerji ve kaynak tahsis

etmek de canlılıkta azalmaya yol açabilir. Bu nedenle hem kanser hem de ona karşı savunmalar teorik olarak canlılığın azalması ve dolayısıyla yetersiz ebeveyn yetenekleri ile ilişkili olabilir. Örneğin erkek balıklarda *Xiphophorus* spp. çok yüksek melanom gelişimi riski ile ilişkili bir onkojenin bulunmasının dezavantajı, özellikle daha agresif davranışlardan dolayı, erkek üreme başarısı üzerindeki güçlü pozitif etkisiyle ortadan kalkar (Fernandez & Bowser, 2010).

Hayvanlarda klinikte en çok görülen kanser çeşitlerinden bahsedecek olursak bunlar görülme sıklığına göre şu şekilde sıralanabilir:

- Aşı sarkomu
- Papillom
- Canine TVT (Canine transmissible venereal tumor)
- Meme tümörü
- Feline leukemia virüs (lösemi)
- Mast Cell Tumor

Köpeklerin bulaşıcı Venereal Tümörü:

Bu kanser türü en çok bilinen doğal olarak oluşan bir tümör olmakla birlikte aynı türler arasında bulaşabilmekte ve köpek ailesi içinde yer alan tilki, koyote ve kurtlarda da görülebilmektedir. Metastaz oluşturma riski nadir olsada metastaz oluşumu söz konusuysa o zaman genelde bölgesel lenf düğümlerinde yayılım gözlenebilmektedir. İmmun sistemi baskılanmış ve yavru köpeklerde yayılım riski daha fazladır (Mukaratirwa & Gruys, 2003; Park & ark., 2006).

Sitolojik muayene ile tanıya kolaylıkla gidilebilmektedir. Tedavisi mümkün olan bir kanser türü olduğu için daha az korkulan ve ameliyat gerektirmeyen bir hastalıktır. Kemoterapi ile köpekler tekrar sağlığına kavuşabilirler. Vinkristin sülfat intravenöz yolla haftada bir kez birkaç hafta sürede kullanıldığında etkin olduğu

bildirilmiştir. Deri dışındaki organların metastatik tutulumu olmadıkça, kemoterapi veya radyasyon tedavisi ile total remisyonun prognozu iyidir. Yardımcı kemoterapi kullanılmadıkça bu gibi durumlarda nüks olasılığı yüksektir (Ganguly & ark., 2013; Birhan & Chanie, 2015).

Zamanla tümör regresyona uğrayabilir. Yapılan bazı çalışmalarda TVT tedavisi görmüş ve iyileşmiş bir köpekten alınan kanın hasta olan bir hayvana nakliyle regresyonun sağlanabildiği tespit edilmiştir. Hastalığı atlatan köpeklerde bağışıklık oluşmaktadır ve bağışık bir anneden doğan yavruların TVT'ye yakalanma süresi uzamaktadır ve hastalık oluşsa bile diğer hayvanlara göre daha küçük yapıda tümörlerin geliştiği gözlenmiştir. Regresyon, tümörün gelişmesinden yaklaşık bir 40 gün sonra IgG'ler tarafından sağlanır (Setthawongsin & ark., 2023; Yang & Jones, 1973).

Tam Kan parametresinde lenfopeni, nötrofili ve trombositopeni görülür. Serum biyokimyasal parametrelerde ise hipoproteinemi, hypoalbuminemi, hypoglobulinemi ile yüksek seviyede BUN (Kan Üre Nitrojen) ve Kreatinin saptanmıştır. ALT düzeyinde artışların olması ise muhtemel olarak bu enzimle bağlantılı organa sıçrama ihtimalini göz önünde bulundurur (Behera & ark., 2012).

Köpeklerin bulaşıcı tümöründe yapılan bir çalışmada sağlıklı ve TVT'li dişi köpeklerin MDA, NO, Antioksidan aktivite, Vitamin C, Retinol ve karoten seviyeleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen bulgular TVT'li köpeklerde MDA, NO ve Vitamin C artışı ancak diğer parametrelerde anlamlı olarak düşüşü gösterilmiştir. Bu durum oksidatif stres artışını kanıtlamaktadır. Bu çalışma ile antioksidan takviyeler ile tedaviye yardımcı olunabileceği savunulmuştur (Aydın & ark., 2009).

CTVT hücrelerinin farelere transplantasyonunu incelemek için yapılan çalışma, bu tümörün yalnızca aynı MHC veya immün yetmezliği olan alıcılara paylaşılan sağlıklı hayvanlar arasında aktarılabilirliğini gösterdi. Transplantasyon teorisi, deneysel tümör

transplantasyonunun ancak canlı tümör hücreleri kullanılarak meydana gelebileceği gözlemine dayanmaktadır (Murgia & ark., 2006).

İmmunohistokimyasal teknikler kullanılarak yapılan çalışmalar, bu neoplazmın lizozim ve alfa-1-tripsin için pozitif olduğunu ve CTVT'nin mezenkimal ve histiyositik orijinli olduğunu göstermektedir. Hsiao ve ark. CTVT hücrelerinin TGF- β 1 ürettiğini ve bu sitokinin, NK hücre aktivitesinin yanı sıra tümör infiltre edici lenfosit sitotoksitesini inhibe ettiğini gösterdi. TGF- β 1'in NK hücre öldürme aktivitesi üzerindeki baskılayıcı etkileri, tümör infiltre eden lenfositler tarafından salgılanan proinflamatuvar sitokin interlökin-6 ile karşılanabilir. Çoklu türetilmiş IFN, CTVT hücrelerinde MHC ifadesini indüklemek için IL6 ile sinerjistik olarak harekete geçmiştir. Ek olarak IL6, CTVT'de in vitro olarak MHC ekspresyonunu indüklemiştir ve in vivo IL15 ile kombinasyon halinde MHC ekspresyonunu indükleyebilir (Hsiao & ark., 2008; Park & ark., 2006).

TGF- β , B hücrelerinin, olgun T hücrelerinin, timositlerin, doğal öldürücü (NK) hücrelerin ve lenfokin ile aktive edilmiş katil (LAK) hücrelerinin proliferasyonunu azaltır; Ayrıca açlığa bağlı NK hücre apoptozunu artırır ve bcl-2 transkripsiyonunu azaltır. MHC sınıf I antijenlerini aşağı regüle eden veya eksprese etmeyen tümör hücreleri, sitotoksik T lenfositler (CTL) tarafından tanınmaz, bunun yerine NK hücrelerini aktive eder. Ayrıca, bazı tümörler, hem NK hücre aktivitelerini hem de LAK hücresi sitotoksitesini inhibe eden TGF- β 'yi salgırlar. Bu nedenle, tümör kaynaklı TGF- β tarafından inhibe edilen NK sitotoksitesinin geri yüklenmesi, kanser baskılanmasında önemlidir (Liao & ark., 2003).

Köpeklerde Meme Tümörü:

Meme tümörleri, meme bezlerinin glandüler epitelyumundan kaynaklanır. Çeşitli histolojik formlar tarif edilmiştir. Dışi köpeklerdeki insidans oldukça yüksektir. Kısırlaştırmanın rutin olarak uygulanmadığı ülkelerde yetişkin köpekleri etkileyen en

önemli neoplastik değerdir. CMT olgularının en yüksek olduğu aralık 6-11 yaş arasındaki köpeklerdir (Dorn ve ark., 1968). Meme tümörleri ilk olarak kendi kökeni dokularına göre ve benign veya malign olup olmadıklarına göre sınıflandırılır. Benign/Malign karakterde olma olasılığı dişi köpeklerde 50:50 ihtimaldir. Kısırlaştırılmış hayvanlarda benign karakterde tümör oluşumu ihtimali minimuma iner (Antuofemo ve ark., 2007).

Sadece dişi köpeklere has bir neoplazma olsada Dileepkumar ve ark. (2014), klinik ve histolojik olarak doğrulanmış meme bezi tümörleri olan yedi erkek köpeği rapor etmişlerdir. Canin meme karsinomu dişi köpekler arasında en sık görülen kanserdir ve akciğere veya lenf nodüllerine (özellikle axillar yumrular) metastaz yapma yeteneğinden dolayı zaman zaman ölümcül sonuçlar doğurabilir (Srivastava & ark., 2009; Pang & ark., 2011).

Dişi köpeklerde meme tümörleri hormona bağımlıdır ve bu yüzden her östrus siklusunda meme tümörüne yakalanma riskide artmaktadır. Tümör hücreleri östrojen ve progesteron reseptörlerine sahiptirler. Östrus zamanı meme bezleri hipertrofiye uğramaktadır ve memelerde şişmeler olmaktadır (Garderen & ark., 1999). Hiç siklus göstermeden kısırlaştırılan köpeklerde meme tümörüne yakalanma riskinin çok az olduğu ele alınacak olursa ilk siklustan sonra meme tümörüne yakalanma ihtimali artar. İkinci siklustan sonra ise tümör oluşturma riski bir anda çok daha fazla artmaktadır (Schneider & ark., 1969).

Tümör gelişimi ve ilerlemesinde inflamasyon ve inflamatuvar hücrelerin rolü giderek daha fazla çalışılmaktadır. Her iki tümör hücresi ve inflamasyona katılan hücreler, iltihabın birçok yönüne aracılık eden ve kanser de dahil olmak üzere kronik hastalıkların gelişimini derinden etkileyen sitokinler ve kemokinler üretir (Snoussi & ark., 2006). İnterlökin-8 (IL-8), monositler, lenfositler, endotelial hücreler ve epitelyal hücreler, fibroblastlar ve Gram-negatif bakterilerden ve diğer sitokinlerden lipopolisakkaritler gibi uyarıcılara tepki olarak bir dizi diğer hücreler tarafından üretilen bir kemokindir (kemotaktik sitokin) (örn., TNF-a ve IL-1B) (Moulton,

1990). Meme kanseri dokularının yüksek IL-8 seviyelerini ifade ettiği gösterilmiştir (Snoussi & ark., 2006).

Kemokinler, spesifik efektör hücreleri toplayarak inflamatuvar yanıtların doğal evrimini kontrol edebilir. İnflamasyon bölgesinde sitokin üretimi sürekli ve bu nedenle kanserler gibi kronik hastalıkların gelişimi için önemlidir (Wahl & Kleinman, 1998).

Kemokinler, spesifik efektör hücreleri toplayarak inflamatuvar yanıtların doğal evrimini kontrol edebilir. İnflamasyon bölgesinde sitokin üretimi sürekli ve bu nedenle kanserler gibi kronik hastalıkların gelişimi için önemlidir (Wahl & Kleinman, 1998). IL-8, potansiyel bir kemoatraktan ve nötrofil ve lenfosit aktivatörüdür (Monton & ark., 1997; Snoussi ve ark., 2006). Ovaryan, akciğer, mesane, prostat ve pankreas kanserleri gibi birçok insan tümör tipine ve ayrıca baş ve boyun skuamöz karsinomuna ve melanomaya yanıt olarak proinflamatuvar etkiler üretir. IL-8'in mitojenik ve anjiyogenik özellikler aracılığıyla meme kanseri ilerlemesini arttırdığı gösterilmiştir (Snoussi & ark. 2006).

IL-8, tümör anjiyogenezinde anahtar bir faktördür (Li & ark., 1998). Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve ökaryotik başlatma faktörü (eIF4E) ile hareket eder (Zhou & ark., 2006). Ek olarak siklooksijenaz-2 (COX-2), IL-8 aktivasyonu yoluyla meme kanserinin invazivliğini arttırmaktadır (Simeone & ark., 2007). Anjiyogenezi teşvik etmenin yanı sıra, IL-8 metastatik fenotip ile güçlü bir ilişkiye sahiptir ve göğüs tümör hücrelerinin potansiyelini güçlendirir (De Larco & ark., 2003; Bobrovnikova- Marjon & ark., 2004). Bu hareket, memeli dokusunda kolaylaştırılır, çünkü bu doku, kan damarları ile iyi bir şekilde desteklenir (De Larco & ark., 2001). Meme tümörlerinde IL-8 oluşumu da kemik metastazını tetikleyebilir (Schwaninger & ark., 2007). IL-8, hormonal özellikler, postoperatif durumlar ve tümör tipi dahil bir dizi faktörle ilgilidir. Örneğin, insan meme kanserinin gelişiminde ve ilerlemesinde IL-8'in rolü, yüksek östrojen ifadesi ile ilişkilidir ve tümördeki östrojen reseptör seviyesinin belirlenmesi, iyi bir prognostik araçtır (Li &

ark., 1998; Vazquez-Martin & ark., 2007). IL-8 ayrıca progesteron reseptörleri ve c-erbB-2 ile ilişkilidir (Yao ve ark., 2007). Ameliyat sonrası, 2 hafta postoperatif meme kanseri hastalarında IL-8 seviyeleri artmaktadır (Schmidt & ark.; 2007). Tümör saldırganlığını doğrulamak için yüksek düzeylerde IL-8 de kullanılır (Zhou & ark. 2006).

Köpeklerde IL-8'in ifadesi, düzenlenmesi ve işlevi hakkında bilgi sınırlıdır. Son çalışmalar, tümör malignitesi ile ilişkili inflamatuvar ve anjiyogenik faktörlerle ilgilenmekte ve prognozu öngörmek için IL-8 ekspresyonunun kullanılabilceğini göstermektedir (Perez & ark., 2000; van Veer & ark., 2005). Tümör prognozu değerlendirmesi karmaşık olsa da, bireysel parametreler hakkındaki verilerin yararlı olabileceği kanıtlanabilir (Thomas & Berner, 2000). Köpek meme tümörlerinde interlökin-8 ekspresyon paternleri bildirilmemiştir ve bununla ilgili yapılan çalışmaların amacı, bu tümörlerde IL-8 ekspresyonunu değerlendirmek ve bir prognostik belirteç olarak değerini belirlemek olmuştur (Zuccari & ark., 2011).

Kedilerde Enjeksiyon yeri Fibrosarkomu ve Kedi Lösemi Virus ve Tümörle ilişkisi:

Aşıya bağlı sarkomlar ilk olarak 1990'ların başlarında kedilerde tanınıyordu. Türkiye'de son yıllarda özellikle kuduz aşısı ve feline leukemia virüsü aşısı uygulaması sonrasında gözlenmiştir. Aşının yapıldığı bölgede ilk olarak bir yangı oluşumu başlar ve ardından değişen sürelerde sarkom oluşturabilir. Bu oluşumun süresi 3 ay ile 3 yıl arasında değişebilmektedir ve kesin olarak süre bilinmemektedir (Hendrick & ark., 1991; Hartmann & ark., 2015).

Aşıya bağlı sarkomlar, aşılama ile ilişkili olmayan sarkomlara kıyasla benzersiz histolojik özelliklere sahiptir. Geniş bir histolojik tip yelpazesine ek olarak, tümör periferisinde periferik lenfosit infiltrasyonu, intratümöral dev hücreler, belirgin bir miyofibroblastik bileşen ve sıklıkla mavi-gri intrasitoplazmik materyal içeren makrofajların varlığı vardır. Kedilerin aşı ile ilişkili

sarkomların histolojik ve immünohistokimyasal özellikleri tanımlanmış olmasına rağmen, bu tümörlerin ince yapısı hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Hendrick & ark., 1994; Hendrick & ark., 1992).

Yapılan çeşitli çalışmalar sonucunda tümörün fibrosarkom yapıda olduğu ortaya çıkarılmıştır. Aşılana kedilerle hiç aşı yapılmamış kediler karşılaştırılmıştır ve aşılanana kedilerde fibrosarkom oluşum ihtimalinin daha erken yaşlara indiğı görülmüştür. Yine yapılan çalışmalar aşı sonrası oluşana fibrosarkomların oldukça agresif karakterde olduğunu kanıtlamıştır. Yoğun nekroz vardır ve tümörün mitotik aktivitesi oldukça yüksektir (Hartmann & ark., 2015).

En yaygın olarak kabul edilen hipotez, bir enjeksiyon yerinde kronik bir enflamatuar reaksiyonun, sonraki malign transformasyon için bir tetikleyici olarak davrandığını göstermektedir. Enjekte edilen aşilar, bir kısmı alüminyum bileşikleri ihtiva eden adjuvant madde içerir ve genelde inaktif aşılarla bulunur. Bu adjuvant maddenin (yardımcı madde) sarkom oluşturma yeteneğinin olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu enflamatuar reaksiyonun potansiyel olarak malign dönüşüme yol açabilir. Adjuvanların izleri, özellikle makrofajlar veya çoklu nükleer dev hücreler içinde ve daha sonra dönüştürülmüş fibroblastta Sarkom'un histolojik kesitlerinde biriken enflamatuar reaksiyonda görülebilir (Hendrick & ark., 1992; Madewell & ark., 2001).

Sarkomlar, tipik olarak interskapular bölge, lateral torasik veya abdominal duvar, lomber bölge ve semimembranosus ve semitendinosus kasları gibi aşılama ve enjeksiyonlar için kullanılan alanlarda ortaya çıkar. Cerrahi olarak oluşana tümörün alınması tek başına yeterli olmamaktadır ve genellikle nüksler görülebilmektedir bu yüzden tümöral oluşumla birlikte komşu dokularında alınması nüks ihtimalini ortadan kaldırmak için daha iyi bir seçenektir. Bu yüzden aşı uygulanırken aşı yerinin seçildiğı kısım bizim için oldukça önemlidir çünkü enseden yapılan enjeksiyonlarda ense kısmından tümörün komşu dokularla birlikte alınması imkansızdır.

Arka bacadan yapılan enjeksiyonlar sonrasında bacadan oluşan sarkomun uzaklaştırılması amputasyonla sağlanabilmektedir ve bu da nüksetme ihtimalini minimuma indirmektedir (Macy, 1995).

Kedi lösemi virüsü (FeLV), evcil kedilerin yaygın bir virüsüdür. Virüse karşı aşılar yaygın olarak kullanılmaktadır; bununla birlikte, bunlar baskın olarak tümör oluşumuna karşı koruma sağlarken enfeksiyona karşı koruma sağlamamaktadır. FeLV, tek iplikli RNA genomunun çift iplikli DNA kopyasını konak hücrelerin kromozomlarına sokan virüsler ailesi olan onkojenik Retroviridae'ye aittir. Stabil şekilde yerleştirildikten sonra, viral genler hücresel genler gibi davranır ve fonksiyonel protein ürünlerine transkripte edilebilir veya uzun süreler için gizli kalabilir (Hoover & Mullins, 1991; Rohn & Overbaugh, 1999).

Viremik olan kedilerde, kemik iliği de dahil olmak üzere çoklu dokular enfekte olur ve latent virüsü süresiz olarak tutabilir. Kalıcı olarak viremik kalan kediler klinik olarak sağlıklı olabilir veya daha yaygın olarak immünosupresif, hematolojik, bağırsak veya üreme bozukluklarını, lenfoma veya lösemi gibi neoplazmaları veya otoimmün hastalıkları geliştirebilirler. Bu nedenle, FeLV enfeksiyonu geniş bir potansiyel hastalık belirtileri yelpazesi ile sonuçlanabilir. Bu ısrarla enfekte olmuş kediler arasında, çoğunluk dejeneratif hastalıklardan ölecekken, azınlık ise neoplastik ve proliferatif hastalıklar geliştirecektir. Genel olarak, viremik kediler enfeksiyondan 2-4 yıl içinde FeLV ile ilişkili hastalıklara yenik düşer (Reinacher, 1989).

İnterferonlar (IFN), antiviral, antiproliferatif ve immüno-modülatör etkileri olan sitokinlerdir. IFN'ler ailesi 3 sınıftan, tip I, tip II ve tip III'den oluşmaktadır. Tip I IFN'ler IFN- α , β , δ , τ ve ω 'yi içerir, IFN- γ ise tek tip II IFN'dir. Tip I IFN'lerin biyolojik aktiviteleri, tümör hücrelerinin büyüme inhibisyonunu, apoptozun indüklenmesini, doğal öldürücü hücre aktivasyonunu ve majör histouyumluluk kompleksi (MHC) sınıf I moleküllerinin ekspresyonunda bir artışı içerir. Rekombinant kedigiller IFN- ω 'nin amino asit dizisi, insan IFN- ω 'ninkine yaklaşık %60 homolojiye sahiptir. İnsan IFN-

ω 'in antitümör etkinliği, in vitro ve in vivo olarak tarif edilmiştir. Rekombinant kedi IFN- ω , insan IFN- α 'ya yaklaşık olarak %60 homolojiye sahiptir. İnsan IFN- α , 1999'dan beri, insanlarda malign melanomanın adjuvan terapisi için Almanya'da kullanılmıştır. IFN- ω ve IFN- α 'nın yakın ilişkisi nedeniyle, rFeIFN- ω kullanılarak kedigiller fibrosarkomun adjuvan immünoterapisi, insan IFN- α 'nın tedavi protokolünü takip eder. Rekombinant kedi IFN- α ticari olarak mevcut değildir, rFeIFN- ω ise kedilerde kullanım için lisanslanmış tek IFN'dir (Dal Pozzo & Thiry, 2014; Jorgovanovic & ark., 2020).

Jourdier ve arkadaşları, interleukin-2 eksprese eden rekombinant poksvirüsleri kullanarak spontan feline fibrosarkomların lokal immünoterapisini araştırmışlardır. Bu çalışma, cerrahi ve iridyum bazlı radyoterapiye ek olarak insan veya kedi interleukin-2 uygulanan kedilerde kontrol hayvanlarında (cerrahi ve iridyum bazlı radyoterapi ile tedavi edilen) %61'e kadar tümör nüks oranlarında bir azalma olduğunu gösterdi. Rekombinant kedi IFN- ν , antiviral ve antiproliferatif etkilere sahiptir (Jourdiere & ark., 2003).

İnterferonlar (IFN'ler), özellikle ilgili viral enfeksiyonlar olmak üzere konakçı bağışıklık sisteminin temel bileşenleridir. IFN'lerin büyük ailesi farklı tiplere ayrılabilir. Tip I IFN'ler, terapötik amaçlar için yaygın olarak kullanıldığından en çok çalışılanlardır. Başlıca işlevleri arasında, tip I IFN'ler, bağışıklık sistemini mikrobiyal tanıma doğru artırır ve hassaslaştırır, doğuştan gelen ve edinilmiş bağışıklık arasında önemli bir bağlantı kurar. Ayrıca, viral replikasyonu engelleyen ve enfekte hücrelerin apoptozunu indükleyen farklı antiviral özelliklere sahiptirler (Leal & Gil, 2016).

Farklı bağışıklık yanıtlarının bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve kontrolüne katkısının daha iyi anlaşılması, yeni aşıların rasyonel tasarımında önemli bir adımdır. Sitotoksik T hücreleri (CTL'ler), viral enfeksiyonlarla ilişkili önemli erken savunmalardan biri olarak iyi bir şekilde kurulmuş ve FeLV geri kazanımı ile FeLV'ye özgü dolaşımdaki CTL seviyesi arasında pozitif bir korelasyon

gösterilmiştir. Birçok çalışma anti-FeLV nötralize edici antikörlerin virüse karşı bağışıklık ile ilişkili olduğunu göstermesine rağmen, virüs spesifik CTL enfeksiyondan bir hafta sonra meydana gelirken, FeLV nötralize edici antikörler dolaşımında saptanmadan önce geçici bir enfeksiyon geliştiren kedilerin çoğunluğu dolaşımında saptanır. Bu nedenle, FeLV'ye spesifik hücresel tepkilerin gelişimi, virüsün hızlı bir şekilde temizlenmesi için kritik gibi görünmektedir (Flynn & ark., 2002).

Mast Hücre Tümörü:

Mast hücresi tümörü (MCT), vücudun alerjenlere ve inflamasyona tepkisinde normal olarak rol oynayan bir tür kan hücresi kanserini temsil eder. Kemik iliğinden köken alırlar ve olgunlaştıkları periferik dokulara göç ederler. Normalde dolaşımında bulunmazlar, fakat lenfoid organlarda ve akciğerler, karaciğer, deri ve gastrointestinal (GI) gibi yüksek derecede vaskularize edilmiş dokularda yoğunlaşırlar. IgE antijenlerle bağlandığında, reseptörler çapraz bağlanır ve mast hücreleri aktive edilir. Bu, önceden oluşturulmuş sitoplazmik granüllerin (yani, degranülasyon) salınımının yanı sıra, prostaglandinlerin, lökotrienlerin ve sitokinlerin (ör., Tümör nekroz faktörü-a, interlökinler) sentezi ve salgılanması ile sonuçlanır (Abbas & Lichtman, 2000).

Çoğu durumda, mast hücre tümörlerinin teşhisi, sitoloji yoluyla sitoplazmik metakromatik granüller ile küçük ila orta yuvarlak hücrelerin görselleştirilmesine dayanır. Bununla birlikte, bazı durumlarda dereceyi belirlemek için insizyonel bir biyopsi önerilmektedir (Patnaik ve ark., 1984). Mast hücre granülleri, histamin, heparin ve proteazları içerir. Klinik olarak, histamin salınımı lokal şişlik, kaşıntı ve eriteme ile sonuçlanabilir (Seguin & ark., 2001).

Mast hücreli tümörler, tüm deri tümörlerinin %7 ila %21'ini oluşturan köpeklerde en sık rastlanan kutanöz tümörlerdir. Raporlar, mast hücre tümörleri olan boxer ırkı köpeklerin daha iyi bir prognoza sahip olabileceğini göstermektedir çünkü iyi diferansiye tümörlerin

daha yüksek bir insidansına sahiptirler fakat sharpei ırkı köpeklerin prognozu daha kötüdür çünkü daha genç yaşta diğer ırklara göre daha agresif tümörler geliştirirler (Baker-Gabb & ark., 2003; Bostock, 1973; Gieger & ark., 2003; Michels & ark., 2002; Miller, 1995; Thomm & Vail, 2001).

3 derecede değerlendirilirler, bunlar;

Derece I — İyi diferansiye tümörler

Derece II — Orta derecede farklılaşmış tümörler

Derece III — Kötü diferansiye tümörler

(Gieger & ark., 2005)

İyi diferansiye tümörlerde düşük metastatik oran vardır (<5%). Radyasyon terapisini takiben 1 yıl sonra, aralarında farklılaşmış tümörler ve kötü diferansiye tümörlerin metastatik oranları sırasıyla %12 ve %55'tir. Tek başına cerrahi ile tedavi edilen derece II mast hücreli tümörlerine sahip köpekler için metastatik oranlar, iki farklı çalışmada %5 ve %22 idi. Mast hücreli tümörleri genellikle bölgesel lenf nodlarına metastaz yapar, bunu dalak, karaciğer, mezenterik lenf nodları, diğer kutanöz bölgeler ve kemik iliği takip eder (Baker-Gabb & ark., 2003; Gieger & ark., 2003; Macy, 1986; Seguin & ark., 2001; Thamm & ark., 2001; Turrel & ark., 1988; Weisse & ark., 2002).

Tedavi seçenekleri arasında cerrahi, radyasyon terapisi, kemoterapi veya bu modalitelerin kombinasyonları bulunur. Son çalışmalar, ileri düzey mast hücreli hastalığı olan bazı köpeklerin agresif tedavi ile uzun süre daha yaşayabileceğini düşündürmektedir (Gieger & ark., 2005).

Sonuç olarak

Kanser sadece bireyin genetik yatkınlığı ile ilişkili olmayan, pek çok faktörün de birleşmesi sonucunda meydana gelen ve hala en çok araştırılan zorlu ve karmaşık bir süreci kapsamaktadır. Tüm kanserler için ortak olan bir özellik kontrolsüz büyümedir.

Kanser 10 yaşın üstündeki evcil hayvanlarda ölümlerin neredeyse % 50'sinin nedenidir. Evcil hayvanlarda görölen bazı yaygın kanser türleri: cilt, meme, baş ve boyun, lenfoma, lösemi, testiküler, abdominal ve kemik vb kanserleri içerir. İnsanlarda ve evcil hayvanlarda yaygın olarak bulunan kanser örnekleri, lenfoma, melanoma ve osteosarkomdur. En yaygın iki evcil hayvandan köpekler kedilere göre daha yüksek oranda kanser olma eğilimindedir. Kediler de çeşitli kanserlere karşı hassastır. Kedilerde kanser günümüzde en yaygın ölüm nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bazı ırklar belirli kanserlere diğerlerinden daha eğilimlidir. Osteosarkom veya kemik kanseri, Great Danes, mastiff, Labrador Retriever ve Rottweiler gibi büyük köpek ırklarında daha yaygın olarak görülür. Kedilerde köpeklerde olduğu gibi kanser yaygın olmasa da kedilerde bulunan kanserler daha agresif olma eğilimindedir.

Sitokinler, hücre ve doku fonksiyonlarını düzenleyen çok çeşitli peptid moleküllerdir. Sitokinler glikoprotein ve düşük moleküler ağırlıklı peptitler şeklindedir. 80'in üzerinde sitokin bildirilmiştir. Hücreler arasındaki etkileşimlere doğrudan aracılık ederler, böylece hücre ve doku fonksiyonlarını düzenlerler. Sitokinler embriyonik gelişimi, hücre büyümesini ve olgunlaşmasını, yara onarımını ve iyileşmeyi, akut faz reaksiyonları ve septik şoku da içeren bağışıklık yanıtını ve yeni kan damarı oluşumunu koordine etmede önemli rol oynar. Herhangi bir sitokinin etkileri genellikle konsantrasyonuna, diğer sitokinlerin varlığına, hedef hücrenin veya dokunun gelişim durumuna ve hücre dışı ortama göre büyük ölçüde değişiklik gösterir. Sitokinler, çeşitli hücre tiplerinin işlevlerini uyumlu bir bağışıklık yanıtına entegre ettikleri bağışıklık sisteminde yapısal olmayan proteinlerin çeşitli ve sıklıkla çelişen aktivitelere sahip, inflamasyon ve immünoloji alanında hücreler arası habercilerdir. Sitokinler sağlık ve hastalık için yararlı biyo-belirteçler olabilir ve teşhis yanında prognostik ve terapötik maddeler olarak da işlev görebilirler. Sitokinler sadece büyümeyi değil tümörün metastatik yayılımını kolaylaştırmakta da

büyük bir role sahiptir. Bazı sitokinler de kanseri tedavi etmek için kullanılmıştır.

KAYNAKÇA

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2000). Immediate hypersensitivity, in Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (eds): Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia, WB Saunders, 424-438.

Akbulut, H ve Akbulut K.G. (2005). Tıbbi Onkoloji Kitabı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antip Yayınları, Editör İçli F. Sayfa 23.

Aktipis, C.A., Nesse, R.M. (2013). Evolutionary foundations for cancer biology. *Evolutionary Appl*, 6: 144-159.

Antuofemo, E., Miller, M.A., Pırıno, S., Xie, J., Badve, S., Mohammed, S.I. (2007). Spontaneous mammary intraepithelial lesions in dogs: a model of breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention*, 16(11): 2247-2256.

Aydin, I., Bulbul A., Avcı G.E., Celik, H.A. (2009). Serum oxidative status and adenosine deaminase activity in dogs with transmissible venereal tumour. *B. Vet. J. Pulawy*, 53: 771-774.

Baker-Gabb M, Hunt GB, France MP (2003). Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs: Clinical behaviour and response to surgery. *Aust Vet J* 81(12): 732-738.

Barnes, P.J. (2008). The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest*, 118(11): 3546-3556.

Barros de Oliveira, C.M., Sakata, R.K., Issy, A.M., Gerola, L.R., Salomão, R. (2011) Cytokines and Pain. *Rev Bras Anesthesiol*, 61(2): 255-265.

Behera, S.K., Kurade N.P., Monsang S.W., Das D.P. (2012) Tumor venéreo trans-missível canino na regi o de K.K. Mishra and R.K. Mohanta. Clinico- Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentaç o pathological findings in a case of canine cutaneous clínico-patológicas. *Dias, M.P. Clın Vet*, 6: 332-338.

Bernheim, H. A. and Kluger, M. J. (1976). Fever and antipyresis in the lizard *Dipsosaurus dorsalis*. *Am. J. Physiol.*, 231:198–203.

Birhan, G., chanie, M. (2015) A Review on Canine Transmissible Venereal Tumour: From Morphologic to Biochemical and Molecular Diagnosis. *Academic J of Anim Disease*, 4(3): 185-195.

Bobrovnikova-Marjon EV, Marjon PL, Barbash O, Vander Jagt DL, et al. (2004). Expression of angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 is highly responsive to ambient glutamine availability: role of nuclear factor-kappaB and activating protein-1. *Cancer Res.* 64: 4858-4869.

Bostock DE (1973). The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract*, 14: 27–40.

Caulin, A. F., and C. C. Maley (2011). Peto's paradox: evolution's pre-prescription for cancer prevention. *Trends in Ecology and Evolution*, 26: 175–182.

Chen, L., Deng, H., Cui, H., fang, J., Zuo Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9: 7204-7218.

Dal Pozzo F, Thiry E (2014). Antiviral chemotherapy in veterinary medicine: current applications and perspectives. *Rev Sci Tech off Int Epiz*, 33(3):1-27.

De Larco JE, Wuertz BR, Yee D, Rickert BL, et al. (2003). Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 13988-13993.

Deverman, B.E., Patterson, P.H. (2009). Cytokines and CNS Development. *Neuron*, 64(1): 61-78.

Diker, K.S. (2005). İmmunoloji. Medisan Yayınevi, 2. Baskı ISBN: 975-7774-34-0.

Dileepkumar K.M., Maiti S.K., Kumar N., Zama M.M.S. (2014). Occurrence of canine mammary tumours. *Ind. J. Can. Pract.* 6:179-183.

Dinarello CA (2007) Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol*, 37(1): 34-45.

Dorn, C.A., Taylor, D.O.N., Schneider, R. (1968). Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties, California II. Cancer morbidity in dogs and cats from Alameda County. *J. Natl. Cancer Inst.*, 40: 307-318.

Erer, H. ve Kıran, M.M. (2009). Veteriner Onkoloji. Bahçivanlar Basım. 4. Baskı. ISBN: 978-975-97351-4-2.

Evan, G.I. and Vousden, K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342.

Fernandez A, Bowser P (2010). Selection for a dominant oncogene and large male size as a risk factor for melanoma in the Xiphophorus animal model. *Molecular Ecology*, 19: 3114–3123.

Fışkın, K. (2002). Genetik Kavramlar. Altıncı baskıdan çeviri. Öner, C. Sayfalar 635-651.

Flynn JN, Dunham SP, Watson V, Jarrett O (2002). Longitudinal analysis of feline leukemia virus-specific cytotoxic T lymphocytes: correlation with recovery from infection. *J Virol*, 76: 2306-2315.

Ganguly, B., Das, U., Das, A.K. (2013) Canine Transmissible Venereal Tumour: A Review. *Vet and Comp Onc*, 14(1): 1-12.

Garderen, E., Hein, J.A., Swennenhuis, J.I., Wissink, E.H.J. Rutteman, G.R., Hellmen, E., Mol, J.A., Schalken, J.A. (1999). Expression and molecular characterization of the growth hormone receptor in canine mammary tissue and mammary tumours. *Endocrinology*, 140(12): 5907-5914.

Gery, I. and Waksman, B. H. (1972). Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J. Exp. Med.* 136:143–155.

Gieger TL, Theon AP, Werner JA, et al (2003). Biologic behavior and prognostic factors for mast cell tumors of the canine muzzle: 24 dogs (1990–2001). *J Vet Intern Med* 17: 687–692.

Gieger, T., Northrup, N., Wall, M. (2005). Clinical Management of Mast Cell Tumors in Dogs. *Compendium*, 56-75.

Gulati K, Guhathakurta S, Joshi J, Rai N, Ray A (2016) Cytokines and their Role in Health and Disease: A Brief Overview. *MOJ Immunol* 4(2): 00121. DOI: 10.15406/moji.2016.04.00121.

Güreşen, G. (2018) Kedi ve Köpeklerde Kanser Prevalansının Retrospektif Araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi. Danışman: Prof. Dr. İbrahim Demirkan.

Hartmann, K., Day, M. J., Thiry, E., Lloret, A., Frymus, T., Addie, D., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Gruffydd-Jones, T., Horzinek, M. C., Hosie, M. J., Lutz, H., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Radford, A. D., Truyen, U., Möstl, K. (2015). Feline injection-site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of feline medicine and surgery*, 17(7), 606–613. <https://doi.org/10.1177/1098612X15588451>.

Hendrick MJ, Brooks JJ (1994). Postvaccinal sarcomas in the cat: histology and immunohistochemistry. *Vet Pathol* 31: 3126–3129.

Hendrick MJ, Dunagan CA. (1991). Focal necrotizing granulomatous panniculitis associated with subcutaneous injection of rabies vaccine in cats and dogs: 10 cases (1988–1989). *J Am Vet Med Assoc*, 198: 304–305.

Hendrick MJ, Goldschmidt MH, Shofer FS, Wang Y-Y, Somlyo AP (1992). Postvaccinal sarcomas in the cat: epidemiology

and electron probe microanalytical identification of aluminum. *Cancer Res* 52: 5391–5394.

Hikim, A.P., Wang, C., Leung, A., Swerdloff, R.S. (1995). Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*, 136: 2770-2775.

Hoover EA, Mullins JI (1991). Feline leukemia virus infection and disease. *J Am Vet Med Assoc* 199: 1392–1401, PubMed.

Hsiao, Y.W., Liao K.W., Chung T.F., Liu C.H., Hsu C.D, Chu R.M. (2008). Interactions of host IL-6 and IFN-gamma and cancer-derived TGF-beta1 on MHC molecule expression during tumor spontaneous regression. *Cancer Immunol Immunother*, 57: 1091-1104.

Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., Zhang, Y. (2020) Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. *Biomarker Research*, 8: 49-65.

Jourdier, T. M., Moste, C., Bonnet, M. C., Delisle, F., Tafani, J. P., Devauchelle, P., Tartaglia, J., & Moingeon, P. (2003). Local immunotherapy of spontaneous feline fibrosarcomas using recombinant poxviruses expressing interleukin 2 (IL2). *Gene therapy*, 10(26), 2126–2132. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302124>.

Judith A. Owen, Jenni Punt, Sharon A. Stranford. Kuby Immunology, 7th Edition. Macmillan, USA, 2007.

Kelso A (1998) Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol* 76:300–317.

Kelso, A. (2000). Cytokines and Their Receptors: An overview. *Therapeutic Drug Monitoring*, 22(1): 40-43.

Khan, M. M. (2016). Role of Cytokines. *Immunopharmacology*, 57–92. doi:10.1007/978-3-319-30273-7_2.

Köküslü, C. (1996). Genel Patoloji. Medisan Yayınevi. 1. Baskı. ISBN: 975-7774-20-0.

Leal, R.O., Gil, S. (2016) The Use of Recombinant Feline Interferon Omega Therapy as an Immune-Modulator in Cats Naturally Infected with Feline Immunodeficiency Virus: New Perspectives. *Vet Sci*, 3: 32-40.

Leroi, A.M., Koufopanou, V., Burt, A. (2003). Cancer selection. *Nat Reviews Cancer*, 3: 226-231.

Li Q, Bostick-Bruton F, Reed E (1998). Effect of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha on cisplatin-induced ERCC-1 mRNA expression in a human ovarian carcinoma cell line. *Anticancer Res*. 18: 2283-2287.

Liao, K., Hung S., Hsiao Y., Bennett M., Chu, R.M. (2003). Canine transmissible venerealtumor cell depletion of B lymphocytes: molecule(s) specifically toxic for B cells. *Vet. Immunol. Immunopathol*, 92: 149-62.

Macy D.W. (1995). The potential role and mechanisms of FeLV vaccine-induced neoplasms. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*, 10: 234–237.

Macy DW (1986). Canine and feline mast cell tumors: Biologic behavior, diagnosis, and therapy. *Semin Vet Med Surg Small Anim*, 1:72–83.

Madewell BR, Griffey SM, McEntee MC, et al. (2001). Feline vaccine-associated fibrosarcoma: an ultrastructural study of 20 tumors (1996–1999). *Vet Pathol*, 38: 196–202.

Michels GM, Knapp DW, DeNicola DB, et al (2002). Prognosis following surgical excision of canine cutaneous mast cell tumors with histologically tumor-free versus nontumor-free margins: A retrospective study of 31 cases. *JAAHA* 38: 458–466.

Mier, J. W. and Gallo, R. C. (1980). Purification and some characteristics of human T-cell growth factor from

phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte-conditioned media. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77: 6134–6138.

Miller DM (1995). The occurrence of mast cell tumors in young shar peis. *J Vet Diagn Invest* 7: 360–363.

Moller, A. P., Alatalo, R. V. (1999). Good-genes effects in sexual selection. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 85-91.

Monton M, Lopez-Farre A, Mosquera JR, Sanchez de ML, et al. (1997). Endogenous angiotensin II produced by endothelium regulates interleukin-1beta-stimulated nitric oxide generation in rat isolated vessels. *Hypertension* 30: 1191-1197.

Moulton JE (Editor) (1990). Tumors of the Mammary Gland. In: Tumors in Domestic Animals. 3rd edn. University of California Press, California, 518-550.

Mukaratirwa, S., & Gruys, E. (2003). Canine transmissible venereal tumour: cytogenetic origin, immunophenotype, and immunobiology. A review. *The veterinary quarterly*, 25(3), 101–111. <https://doi.org/10.1080/01652176.2003.9695151>.

Murgia, C., Pritchard J.K., Kim S.Y, Fassati A, Weiss R.A. (2006). Clonal origin and evolution of a transmissible cancer. *Cell*, 126: 477-487.

Musul, B. (2018) The Role of Tumor Stroma and Cancer Associated Fibroblasts in Tumor Growth Through Cytokines. Sabancı Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi. Danışman: Prof. Dr. Devrim Gözüaçık.

Myers, M.J., Murtaugh, M.P., Dekker, M. (1995). Cytokines in Animal Health and Disease; Edited by Michael J. Myers and Michael P. Murtaugh, Marcel Dekker, Inc., New York, 465 p. ISBN 0-8247-9435-4.

Nicholson, D.W., Thornberry, N.A. (1997). Caspases: Killer proteases. *Trends Biochem Sci*, 22: 299-306.

Ostman A, Augsten M. (2009). Cancer-associated fibroblasts and tumor growth—bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*, 19: 67–73.

Pang, L. Y., Cervantes-Arias, A., Else, R. W., Argyle, D. J. (2011). Canine Mammary Cancer Stem Cells are Radio- and Chemo-Resistant and Exhibit an Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype. *Cancers*, 3(2), 1744–1762. <https://doi.org/10.3390/cancers3021744>.

Park, M., Kim Y, Kang M, Oh S., Cho D., Shin N., Kim D. (2006). Disseminated transmissible venerealtumor in a dog. *J. Vet. Diagn. Invest*, 18: 130-133.

Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: Morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 21:469–474.

Perez Alenza MD, Pena L, del Castillo N, Nieto AI (2000). Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. *J Small Anim Pract* 41: 287–291.

Reinacher M (1989). Diseases associated with spontaneous feline leukemia virus (FeLV) infection in cats. *Vet Immunol Immunopathol* 21: 85–95, [Crossref](#). [PubMed](#). [ISI](#).

Reuter, S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B. (2010). Oxidative Stress, inflammation and cancer: How are they linked? *Free radical Biol Med.*, 49: 1603-1616.

Rohn JL, Overbaugh J (1999). Pathogenic feline retroviruses: feline leukemia virus and feline immunodeficiency virus. In: *Persistent Viral Infections*, ed. Chen SY, Ahmed R, pp. 379–408. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY,

Schmidt A, Bengtsson A, Tylman M and Blomqvist L (2007). Pro-inflammatory cytokines in elective flap surgery. *J. Surg. Res.* 137: 117-121.

Schneider, R., Dorn, R.C., Taylor, D. (1969). Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 43: 1249-1261.

Schwaninger R, Rentsch CA, Wetterwald A, van der Horst G, et al. (2007). Lack of noggin expression by cancer cells is a determinant of the osteoblast response in bone metastases. *Am. J. Pathol.* 170: 160-175.

Seguin B, Leibman NF, Bregazzi VS, et al (2001). Clinical outcome of dogs with grade-II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996–1999). *JAVMA* 218(7):1120–1123.

Setthawongsin, C., Techangamsuwan, S., & Rungsipipat, A. (2023). Canine Transmissible Venereal Tumor: An Infectious Neoplasia in Dogs. *IntechOpen*. doi: 10.5772/intechopen.106150.

Simeone AM, Nieves-Alicea R, McMurtry VC, Colella S, et al. (2007). Cyclooxygenase-2 uses the protein kinase C/ interleukin-8/urokinase-type plasminogen activator pathway to increase the invasiveness of breast cancer cells. *Int. J. Oncol.* 30: 785-792.

Snoussi K, Mahfoudh W, Bouaouina N, Ahmed SB, et al. (2006). Genetic variation in IL-8 associated with increased risk and poor prognosis of breast carcinoma. *Hum. Immunol.* 67: 13-21.

Sommer, C., White, F. (2010). Cytokines, Chemokines and Pain, Ed Beaulieu P, Lussier D, Porreca F et al., Pharmacology of pain. 1st Ed. Seattle IASP press, 279-302.

Srivastava AK, Sharma AK, Singh, B (2009). Caninemammary tumours: a study on occurrence and distribution pattern. *Indian J Vet Pathol*, 33: 109-111.

Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V.M. (2000). Apoptosis Signalling. *Annu Rev Biochem*, 69: 217-245.

Thamm DH, Vail DM (2001). Mast cell tumors, in Withrow SJ, MacEwen EG (eds): Small Animal Clinical Oncology. Philadelphia, WB Saunders, 261–279.

Thomas E and Berner G (2000). Prognostic and predictive implications of HER2 status for breast cancer patients. *Eur. J. Oncol. Nurs.* 4: 10-17.

Tomatır, A.G. (2003). Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri*, 23: 499-508.

Turrel JM, Kitchell BE, Miller LM, et al (1988). Prognostic factors for radiation treatment of mast cell tumors in 85 dogs. *JAVMA* 193: 936–940.

Van't Veer LJ, Paik S, Hayes DF (2005). Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. *J. Clin. Oncol.* 23: 1631-1635.

Vazquez-Martin A, Colomer R and Menendez JA (2007). Protein array technology to detect HER2 (erbB-2)-induced 'cytokine signature' in breast cancer. *Eur. J. Cancer* 43: 1117-1124.

Vittecoq M, Ducasse H., Arnal A., Møller A. P., Ujvari B., Jacqueline C. B, Tissot T., Miss D., Bernex F., Pirot N., Lemberger K., Abadie J., Labrut S., Bonhomme F., Renaud F, Roche B., Thomas F. (2015) Animal behaviour and cancer. *Animal Behaviour*, 101: 19-26.

Wahl LM and Kleinman HK (1998). Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 90: 1583-1584.

Weisse C, Shofer FS, Sorenmo K (2002). Recurrence rates and sites for Grade II canine cutaneous tumors following complete surgical excision. *JAAHA* 38: 71–73.

WHO (2022). World Health Organization, cancer. Erişim adresi: [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>]. Erişim Tarihi: 20/10/2022.

Yang, T. J., & Jones, J. B. (1973). Canine transmissible venereal sarcoma: transplantation studies in neonatal and adult dogs. *Journal of the National Cancer Institute*, 51(6), 1915–1918. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.6.1915>.

Yao C, Lin Y, Ye CS, Bi J, et al. (2007). Role of interleukin-8 in the progression of estrogen receptor-negative breast cancer. *Chin. Med. J.* 120: 1766-1772.

Yokuş B. Çakır DÜ. (202) İnvivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*.5: 535- 43.

Yokuş, B., Çakır D.Ü. (2012). Kanser Biyokimyası. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1(2): 7-18.

Zhou S, Wang GP, Liu C and Zhou M (2006). Eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and angiogenesis: prognostic markers for breast cancer. *BMC Cancer* 6: 231.

Zidek Z, Anzenbacher P, Kmonickoval E (2009) Current status and challenges of cytokine pharmacology. *Br J Pharmacol* 157(3): 342-361.

Zuccari, D.A.P.C., Castro, R., Gelaleti, G.B., Mancini, U.M (2011). Interleukin-8 expression associated with canine mammary tumors. *Genet Mol Res*, 10(3): 1522-1532.

BÖLÜM VIII

Kök Hücrelerin Kriyoprezervasyonu

Sare UYURCA¹
Öğünç MERAL²

Giriş

Kriyoprezervasyon, çok düşük sıcaklıklarda (-80 veya -196°C) organların, dokuların, hücrelerin ve diğer biyolojik materyallerin uzun süreli depolanmasını sağlamak için kullanılan bir tekniktir. Kriyoprezervasyon rejeneratif tıp, doku mühendisliği, kök hücre tedavileri, hücre bankası oluşturma, ilaçların geliştirilmesi ve araştırılması gibi çok sayıda biyomedikal uygulamanın geliştirilmesini sağlamıştır. Kök hücre temelli tıptaki son gelişmelerle birlikte, kök hücrelere olan talep giderek artmaktadır. Bu nedenle mevcut arz-talep dengesizliğinin üstesinden gelmek için kök hücrelerin yüksek kaliteli ve yüksek verimli depolanmasını sağlamak son derece önemlidir. Kriyoprezervasyon işleminde kök hücrelerin kalitesini korumak için kriyoprezervasyon protokollerinin

¹ Doktora Öğrencisi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası, sarecavdarr@gmail.com

² Doç. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, omeral@ankara.edu.tr

optimizasyonu önemlidir. Hematopoietik kök hücrelerin (HSC) klinik uygulamalar amacıyla kriyoprezervasyonu rutin olarak yapılırken, mezenkimal kök hücreler (MSC) için kriyoprezervasyon protokolleri geliştirilme aşamasındadır ve klinik etkinliklerinin gösterilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Balci & Can, 2013; Chang & Zhao, 2021).

Kriyoprezervasyonun Tarihçesi, Tanımı ve Prensipleri

Kriyoprezervasyon, Yunanca “soğuk veya don” anlamına gelen “kryos” kelimesinden köken almaktadır, hücrelerin veya dokuların genellikle sıvı nitrojen içinde -130 °C'nin altındaki sıcaklıklarda depolanmasını ifade eder (Maffei, Brevini & Gandolfi, 2014). Kriyoprezervasyon, numuneleri çok düşük sıcaklıklara soğutarak organelleri, hücreleri, dokuları veya diğer biyolojik yapıları koruyan bir işlemdir (Jang & ark., 2017). Kriyoprezervasyon koşullarında canlı hücrelerdeki kimyasal ve biyolojik reaksiyonlar, önemli ölçüde azalır hatta durur (Chang & Zhao, 2021). Birçok tıbbi uygulamada kullanım potansiyeli yüksek olan kök hücreler ve diğer canlı dokular, donma ve çözülme sırasında buz kristali oluşumu, ozmotik şok ve membran hasarı nedeniyle basit soğutma veya dondurma yöntemleriyle uzun süre saklanamaz ve hücreler ölür. Hücre ve dokuların başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu, son yıllarda kriyoprotektif ajanların ve sıcaklık kontrol ekipmanlarının kullanılmasıyla daha çok önem kazanmıştır. Hücrelerin veya dokuların başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu ve klinik uygulamaları için donma ve çözülme sırasında meydana gelen fiziksel ve kimyasal özelliklerin araştırılması son derece önemlidir (Jang & ark., 2017).

Polge, Parks ve Smith, gliserolün kriyoprotektif işlevini kanatlı spermatozoasını kriyoprezerve ederken şans eseri keşfetmişlerdir. Smith, insan kırmızı kan hücrelerini gliserol içinde başarıyla kriyoprezerve ederek bu gözlemleri geliştirmiştir. Her iki çalışmada, biyoprezervasyon alanında çok önemli olan kriyoprotektif ajana (CPA) ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. 1959'da Lovelock ve Bishop, birçok hücre tipi için gliserolle

kıyaslandığında arttırılmış geçirgenlik avantajı sağlayan dimetil sülfoksidi (DMSO) CPA olarak ilk kez kullanmışlardır. Sonraki yıllarda, CPA'ların yanı sıra hücredeki soğuk yaralanması ve kriyoprezervasyon mekanizmalarındaki değişikliklere ve bunların incelenmesine odaklanan birçok gelişme meydana gelmiştir (Baust, Gao & Baust, 2009; Lovelock & Bishop, 1959; Polge, Smith & Parkes, 1949; Smith, 1950).

Kriyoprezervasyon protokolü genellikle dört aşamadan oluşur:

1) CPA'ların eklenmesi: hücrelerin belirli bir süre CPA çözeltilerine maruz bırakılması;

2) Dondurma: uzun süreli depolama için sıcaklığın belirli bir oranda kontrollü -80 °C'ye veya sıvı nitrojen sıcaklığına düşürülmesi;

3) Çözdürme: sıcaklığın belirli bir oranda artırılması;

4) CPA'nın uzaklaştırılması: CPA'nın toksisitesi nedeniyle hücreleri canlıya uygulamadan önce CPA'nın uzaklaştırılması aşamasıdır (Xu, 2011).

Kök Hücrelerin Kriyoprezervasyonu

Kök hücreler, hücre tedavisi, rejeneratif tıp, ilaç keşfi ve toksikoloji araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Bojic & ark., 2021). Kök hücre kriyoprezervasyonunda yaygın olarak tercih edilen CPA %5-10'luk konsantrasyonda DMSO'dur. Hücreler kriyoprotektan eklendikten sonra genellikle dakikada -1 ila -3 °C'lik optimum soğutma hızlarında kontrollü hızda dondurucular kullanılarak -80 °C'ye kadar dondurulur. Ardından, donmuş numune, uzun süreli koruma için çoğunlukla -196 °C'de bir sıvı nitrojen tankına yerleştirilir. Kök hücreler 37 °C'lik bir su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürülür (Xie & ark., 2022).

1. Yetişkin Kök Hücrelerin Kriyoprezervasyonu

HSC ve MSC gibi yetişkin kök hücreler, doku onarımında önemli bir rol oynar. Yetişkin kök hücreler, kemik iliği, periferik kan, kan damarları, beyin, yağ doku, iskelet kası, deri ve karaciğer dahil olmak üzere birçok organ ve dokudan izole edilmiştir. Sınırlı kendini yenileme kapasitesine sahiptirler ve spesifik uyarıların etkisiyle bir dizi farklı hücre tipine farklılaşabilirler. Örneğin, MSC'ler osteositler, kondrositler ve adipositler gibi çeşitli hücre türlerine farklılaşabilirler; HSC'ler miyeloid ve lenfoid hücre soyları dahil tüm kan hücresi türlerine farklılaşabilir (Xu, 2011). Birçok alışma yetişkin kök hücrelerin donma ve çözülme sonrası hücresel aktivitesinin kriyoprezervasyon çözeltilerinden etkilendiğini göstermiştir (Miyagi-Shiohira & ark., 2015).

1.1.HSC'lerin Kriyoprezervasyonu

HSC'lerin kriyoprezervasyonu hücre içi buz oluşumunun zararlı etkilerinden kaçınmak için genellikle bir kriyoprotektan varlığında yavaş dondurma ile gerçekleştirilir. 1- 2 °C/dk'lık kontrollü hızda dondurma tekniği ve hızlı zdrme standart olarak kabul edilir. Hücreleri dondurmak için genellikle -80 °C'de pasif dondurma cihazları kullanılır (Hunt, 2011). Standart kriyoprotektan olarak % 10 DMSO kullanılır (Berz & ark., 2007). Fakat DMSO'nun transfüzyondan önce uzaklaştırılması hücre kaybına yol açar. Bu nedenle, DMSO'nun yerine toksik olmayan bir alternatifin kullanılması veya DMSO konsantrasyonunun azaltılması, HSC'lerin kriyoprezervasyonunun başarısını arttırır (Xu, 2011). DMSO konsantrasyonunun %5'e düşürülmesinin hücre iyileşmesine çok az olumsuz etkisi olduğu ve %2'ye kadar düşük DMSO konsantrasyonlarının başarıyla kullanılabileceği tespit edilmiştir (Hunt, 2011).

Dondurma çözeltisinde hücre zarından geçemeyen disakkaritlerin varlığının HSC'leri koruyabildiği bildirilmiştir (Xu, 2011). Hidroksietil nişasta (HES) ve trehaloz gibi alternatif kriyoprotekthanların, DMSO ile kombine halde veya tek başına,

hematopoietik hücrelerin kriyoprezervasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (Hunt, 2011). HSC'ler ile yapılan bir çalışmada %5 DMSO + 0.3 M sükröz kombinasyonunun, %10 fetal sığır serumu (FBS) + %10 DMSO kombinasyonuna kıyasla daha iyi fonksiyonel kapasitesi olduğu tespit edilmiştir. Periferik kan kök hücrelerinin trehaloz ile kriyoprezervasyonunun, %90 FBS + %10 DMSO kombinasyonundan daha iyi hücre sağkalımı sağladığı tespit edilmiştir (Hornberger & ark., 2019). %2.5 DMSO + 30 mmol trehaloz kombinasyonunun, HSC'lerin kriyoprezervasyonunda başarıyla kullanılabilceği tespit edilmiştir (Xu, 2011).

Biyoantioksidanların HSC'lerin kriyoprezervasyonu üzerindeki etkilerini göstermek için yapılan bir çalışmada, test edilen üç antioksidan, askorbik asit, α -tokoferol asetat ve katalaz arasında katalazın maksimum kriyoprotektif etkiyi gösterdiği tespit edilmiştir. Katalaz ve trehalozun %10 DMSO ile kombinasyonunun, hematopoietik hücrelerin kriyoprezervasyonunda faydalı olduğu bildirilmiştir (Xu, 2011).

1.2. MSC'lerin Kriyoprezervasyonu

MSC'ler farklılaşma kapasiteleri, immünsüpresif özellikleri, sekretom profili ve göç kabiliyetleri nedeniyle rejeneratif tıpta yaygın olarak kullanılır. Kriyoprezervasyon kök hücrelerin farklılaşma kapasitesini etkileyebilir. Çeşitli pluripotens belirteçlerin kaybı kriyoprezervasyonla ilişkilendirilmiştir, ancak bu değişikliklerin kesin nedenleri halen araştırılmaya devam edilmektedir (Naaldijk & ark., 2012). Embriyonik kök hücre (ESC)'lerden farklı olarak MSC'ler, belirli kültür pasajlarından sonra yaşlandıkları için süresiz olarak kültüre edilemezler (Gugjoo & ark., 2020).

MSC'lerin kriyoprezervasyonu ile ilgili yapılan birçok çalışmada, genellikle yavaş dondurma yöntemi kullanılmıştır (Naaldijk & ark., 2012). Yapılan bir çalışmada köpek kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre (BMMSC)'leri %10 DMSO + %10 FBS ile kriyoprezerve edilmiştir. Hücreler modifiye edilmiş üç

aşamalı bir protokolle dondurulmuş; 1 saat boyunca 4 °C'de, 2 saat boyunca -20 °C'de, 10.5 saat boyunca -80 °C'de ve son olarak uzun süreli depolama için sıvı nitrojen (-196 °C) içinde saklanmıştır. Hüresel hasarı en aza indirmek için BMMSC'lerin çözdürülmesi 37 °C'de yapılmıştır. Kriyoprezerve ve taze BMMSC'ler arasında hücre canlılığında anlamlı bir fark bulunmamış ve BMMSC'lerin in vivo osteojenik farklılaşma yeteneğini koruduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, uzun süreli kriyoprezervasyonun BMMSC'lerin rejenerasyon kapasitelerini koruduğunu göstermektedir (Zhu & ark., 2013). Hem yavaş hem de hızlı dondurma protokolleri kullanılarak dondurulmuş MSC'ler taze MSC'lere benzer fenotip, hücre yüzey belirteçleri ve çoğalma hızı göstermiştir (Naaldijk & ark., 2012). Liu ve arkadaşlarının adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücre (ADMSC)'lerin kriyoprezervasyonunda %10 DMSO + %20 FBS kullandığı çalışmada kriyoprezervasyonun MSC'lerin fenotipi, proliferasyonu ve osteojenik farklılaşma potansiyelinde olumsuz bir etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir (Liu & ark., 2008). Ayrıca yapılan başka bir çalışmada BMMSC'lerin %10 DMSO ile kriyoprezervasyonun ardından çözülme sonrası canlılığın 72.95 ± 6.14 olduğu bildirilmiştir (Doan & ark., 2012). Bir diğer çalışmada köpek BMMSC'lerinin %10 DMSO + %10 FBS ile kriyoprezervasyonun in vitro hücre çoğalması ve farklılaşması üzerinde belirgin bir olumsuz etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Li & ark., 2009). Bir çalışmada at kaynaklı MSC'ler %10 FBS + %10 DMSO ortamında kriyoprezerve edilmiş ve iyi proliferatif potansiyel göstermiştir (Vidal & ark., 2012). At kanından izole edilen multipotent kök hücrelerin %10 DMSO + %90 FBS ile kriyoprezervasyonunda çözdürme sonrası MSC'lerin morfolojilerini, telomeraz aktivitelerini, karyotip profilini, proliferasyon hızını, yüzey belirteçlerinin ekspresyonunu ve adipojenik, osteojenik ve miyojenik farklılaşma potansiyellerini koruduğunu tespit edilmiştir (Martinello & ark., 2010). Bununla birlikte, %90 FBS + %10 DMSO'dan oluşan dondurma ortamında kriyoprezervasyondan sonra, köpek ADMSC'lerinin taze hücrelere göre daha düşük proliferasyon ve telomeraz aktivitesi gösterdiği

tespit edilmiştir. Bu çalışmada kriyoprezervasyon protokolünün MSC'lerin adipojenik, osteojenik ve miyojenik farklılaşma potansiyelini değiştirmediği bildirilmiştir (Martinello & ark., 2011). Başka bir çalışmada, ADMSC'lerin %10 DMSO + %90 FBS ile kriyoprezerve edilmesinin proliferasyonu, osteojenik ve adipojenik farklılaşmayı önemli ölçüde engellediği bildirilmiştir (James & ark., 2011). Bir diğer çalışmada köpek BMMSC'lerinin %10 DMSO + %10 FBS ile kriyoprezervasyonundan sonra taze hücrelere göre daha düşük canlılığa ve proliferatif kapasiteye sahip olduğu bildirilmiştir (Edamura & ark., 2014).

MSC'lerin kriyoprezervasyonunda buz kristali oluşumunu önlemek için optimum konsantrasyonda uygun CPA kullanımı çok önemlidir. MSC'leri korumak için genellikle %10 DMSO ve FBS (% 20 - % 90) birlikte kullanılır (Yong & ark., 2015). DMSO konsantrasyonunun hücre canlılığı üzerinde önemli bir etkisi vardır. Kriyoprezervasyon ortamında DMSO konsantrasyonunun %5'ten %20'ye yükselmesi, domuz BMMSC'lerinde hücre canlılığını azaltma ve apoptotik gen ekspresyonunu arttırma eğilimindedir (Gugjoo & ark., 2020). Son yıllarda, metilselüloz (MC), sükroz, trehaloz, HES, polivinilpirolidon (PVP) ve bu kriyoprotektanların farklı kombinasyonlarıyla ikinci nesil bir kriyoprezervasyon ortamı geliştirmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Pham & Vu, 2016). Thirumala ve arkadaşları ADMSC'leri DMSO yerine PVP (%1, %5, %10, %20 ve %40) ile kriyoprezerve edip çözdürdükten sonra, MSC'lerin en yüksek hücre canlılığının %10 PVP'de %69,7 olduğunu bildirmişlerdir. %10 PVP + %10 insan serumu (HS) kullanımıyla hücre canlılığının % 72.1'e yükseldiğini fakat %10 DMSO + %80 HS'deki hücre canlılığının %82.5 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca adipositlere ve osteoblastlara farklılaşma potansiyelinin kriyoprezervasyondan sonra korunduğunu ve ADMSC'lerin kriyoprezervasyonunda PVP'nin alternatif bir CPA olabileceğini tespit etmişlerdir (Thirumala & ark., 2010a). Yapılan bir çalışmada DMSO konsantrasyonlarının azaltılması için farklı moleküler ağırlıklardaki HES kullanımının etkisi araştırılmıştır. MSC'ler HES ile kriyoprezervasyondan sonra, karakteristik hücre

yüzeysel belirteci ekspresyonu, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyelini korumuşlardır. Tek başına HES, MSC'ler için etkili bir kriyoprezervasyon sağlamazken %5 DMSO + %5 HES kombinasyonunun etkili bir şekilde kullanılabileceği bildirilmiştir (Naaldijk & ark., 2012). Yapılan bir çalışmada ADMSC'lerin kriyoprezervasyonunda (i) %80 fetal dana serumu (FCS) + %10 DMSO, (ii) %80 HS + %10 DMSO, (iii) %1 MC + %10 HS veya FCS veya DMSO ve (iv) %0, %2, %4, %6, %8 veya %10 DMSO kombinasyonları halinde kullanılmıştır. DMSO kullanılmamasının apoptotik ve / veya nekrotik MSC'lerin fraksiyonunu önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. %2 DMSO ile elde edilen canlı hücrelerin yüzdesinin, %10 DMSO + %80 serum (HS veya FCS) ile elde edilen hücrelere ($\sim 84 \pm 5$ ve $\sim 84 \pm 8$) benzer olduğu tespit edilmiştir. Çözülme sonrası MSC canlılığının, adipojenik ve osteojenik farklılaşabilme yeteneğinin, serum kullanılmadan bile, minimum %2 DMSO konsantrasyonu ile korunabileceğini bildirilmiştir (Thirumala, Gimble & Devireddy, 2010b). Yapılan bir çalışmada ADMSC'lerin kriyoprezervasyonunda DMSO (%1, %4, %8 ve %10), trehaloz (%9, %6 ve %2) ve %90 FBS kombinasyonları kullanılmış. Tüm protokollere kıyasla %4 DMSO, %6 trehaloz ve %90 FBS kombinasyonunun daha etkili olduğu tespit edilmiş. Çözüldükten sonra hücrelerin farklılaşabildiği ve biyolojilerinin bütünlüğünü koruduğu tespit edilmiştir (De Rosa & ark., 2009). Farelerden, ratlardan ve buzağılardan elde edilen MSC'lerin kriyoprezervasyonu için polietilen glikol (PEG) ve / veya trehaloz ile düşük konsantrasyonda DMSO içeren farklı kriyoprezervasyon çözeltileriyle yapılan bir çalışmada, %5 DMSO + %2 PEG + %3 trehaloz + %2 sığır serum albümini (BSA) kombinasyonunun çözülme sonrası hücre canlılığında (91.5 ± 5.6) diğer kombinasyonlara oranla daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca DMSO kullanılmadığında %10 1,2-propanediol ve %10 1,2-propanediol + %2 BSA kombinasyonundaki hücre canlılığının yüzdesinin sırasıyla %10 DMSO ve %10 DMSO + %10 FBS'den anlamlı olarak düşük olduğu bildirilmiştir. Hücre sağkalımı DMSO'ya göre düşük olmasına rağmen, 1,2-propanediol gibi bir

kriyoprotektanında kriyoprezervasyonda kullanılabileceği tespit edilmiştir (Liu & ark., 2010; Liu & ark., 2011). Başka bir çalışmada, mannitol, laktoz, sükröz, trehaloz veya rafinoz gibi şekerler, kriyoprezervasyondan 24 saat önce inkübasyon ortamına 200 mM konsantrasyonda ve kriyoprotektif solüsyona da 300 mM konsantrasyonunda eklendiğinde, bu kombinasyonların çözülme sonrası hücre canlılığını arttırdığı tespit edilmiştir ve MSC'lerin şekerlerle kriyoprezervasyonun adipojenik ve osteojenik farklılaşma yeteneğini koruduğu gösterilmiştir (Petrenko & ark., 2014).

FBS konsantrasyonundaki bir artışla, MSC'lerin çözülme sonrası yaşayabilirliği artabilir. Buffalo amniyotik sıvı MSC'lerinin kriyoprezervasyon ortamında serum konsantrasyonlarının artmasıyla çözülme sonrası canlılığının % 28'den % 85'e yükseldiği tespit edilmiştir (Gugjoo & ark., 2020). At, koyun ve ratlardan elde edilen MSC'lerin farklı kriyoprotektan solüsyonları kullanılarak kriyoprezerve edildiği bir çalışmada %10 DMSO + %20 FBS'nin hücre canlılığı ve replikasyon açısından diğer kriyoprotektan kombinasyonlarından daha yüksek performans gösterdiği bildirilmiştir (Renzi & ark., 2012). Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonda hayvan serumu kullanımı hastalarda bazı olumsuz etkilere neden olabilir (Pham & Vu, 2016). İnsan MSC'lerinin serumsuz kriyoprezervasyon ortamında, FBS içeren ortamlara kıyasla kriyoprezervasyon sonrası benzer veya üstün sonuçlar verdiği gösterilmiştir (Gugjoo & ark., 2020). Bir çalışmada, BMMSC'ler %2, %5 ve %10 konsantrasyonlarında DMSO içeren ve hayvansal ürün içermeyen ortamda kriyoprezerve edilmiş. %5 ve %10 DMSO içeren çözeltilerde kriyoprezervasyondan sonra hücre iyileşmesinin sırasıyla %72 ve %80 olduğu tespit edilmiştir. Kriyoprezervasyonun BMMSC'lerin proliferasyon hızını, MSC markerlarının ekspresyonunu ve osteojenik potansiyelini değiştirmediği gözlenmiştir (Ginis, Grinblat & Shirvan, 2012). Yapılan diğer bir çalışmada at BMMSC'leri, %20 serum + %10 DMSO + %70 MEM veya %95 serum + %5 DMSO'dan oluşan 6 farklı solüsyonda kriyoprezerve edilmiş. Serum olarak, otolog serum, ticari at serumu veya FBS kullanılmıştır. 6 çözelti arasında

çözülme sonrası canlılık, toplam hücre sayısı, morfoloji skorları veya büyüme kinetiği açısından anlamlı fark görülmemiştir. Her grupta çözülme sonrası canlılık %80-90 arasında değişmiştir. Kısa süreli MSC kriyoprezervasyonu için %5 DMSO'nun kriyoprotektan olarak yeterli olduğu bildirilmiştir. At MSC'lerinde kullanılan kriyoprezervasyon formülasyonu veya serum kaynağı ne olursa olsun, çözülme sonrası canlılık ve büyüme açısından farklılıklar görülmemiştir. At BMMSC'lerinin kısa süreli kriyoprezervasyonu için %95 otolog serum ve %5 DMSO kullanımı önerilmektedir (Mitchell & ark., 2015). FBS kullanımını değiştirmek için, kseno içermeyen medyumlar önerilmiştir. Kseno içermeyen %5 DMSO'nun MSC'leri etkili bir şekilde korumak için ideal bir CPA olabileceği belirtilmiştir (Yong & ark., 2015). Yapılan bir çalışmada hayvansal kaynaklı serumun yerine serisin kullanılmıştır. ADMSC'ler, %10 DMSO + %1 serisin + 0.1 mol/L maltoz veya %10 DMSO kullanılarak kriyoprezerve edilmiştir. Her iki solüsyonda da sağkalım oranının %95'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Serisin içeren kriyoprezervasyon çözeltisinin, proliferasyon potansiyeli açısından tek başına %10 DMSO'dan daha etkili olduğu bildirilmiştir (Miyagi-Shiohira & ark., 2015).

MSC'lerin kriyoprezervasyonunda vitrifikasyon yöntemi de araştırılmıştır (Naaldijk & ark., 2012). İnsan amniyon türevli mezenkimal kök hücrelerin (HAM) kriyoprezervasyonu amacıyla vitrifikasyon çözeltisi olarak %40 etilen glikol (EG) + %18 Fikol + 0.3 M sükroz kombinasyonunun kullanıldığı bir çalışmada HAM'ların çözülme sonrası canlılığının %84,3±3,2 olduğu tespit edilmiştir. Kriyoprezerve HAM'ların, taze HAM'lardan ayırt edilemeyen morfolojik özellikleri olduğu gösterilmiştir. Vitrifikasyonun HAM'ların kriyoprezervasyonu için güvenilir ve etkili bir yöntem olduğu ve çözülmüş HAM'ların, osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşma yeteneğini koruduğu tespit edilmiştir (Moon & ark., 2008).

Yapılan bir çalışmada at göbek kordonu kanından elde edilen MSC'lerin birinci ila onuncu pasajları %70 FBS + %10 DMSO kombinasyonu ile kriyoprezerve edilmiştir. En yüksek canlılık oranı, kriyoprezervasyondan sonraki 1. ve 8. haftalarda ilk pasajdan elde edilen hücrelerde görülmüştür. Dondurmadan 8 hafta sonra çözündürülen hücrelerin canlılık oranı P1'de %80.4 iken P10'da %51.2'ye kadar düştüğü görülmüştür. Kriyoprezerve edilen hücrelerin canlılıkları, büyüme kabiliyetleri ve farklılaşma potansiyelleri açısından karakterizasyonunda önemli bir değişiklik olmaksızın 8 hafta boyunca başarılı bir şekilde dondurulabildiği tespit edilmiştir (Eini & ark., 2012).

2. Pluripotent Kök Hücrelerin (PSC) Kriyoprezervasyonu

İndüklenmiş pluripotent kök hücre (iPSC)'ler ve ESC'ler pluripotent kök hücreler (PSC) olarak sınıflandırılır (Miyazaki & Suemori, 2016). ESC'ler vücuttaki tüm hücre türlerine farklılaşabilir ve sınırsız kendini yenileme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle, ESC'lerin hasarlı dokuları onarma ve organ rejenerasyonu için kullanılmasına olan ilgi son yıllarda önemli ölçüde artmıştır (Xu, 2011).

Diğer birçok hücre gibi ESC'lerde sıvı nitrojende uzun süre saklanabilir. Diğer kök hücreler, konvansiyonel yavaş dondurma (1 °C/dak) ve hızlı çözündürme ile başarılı bir şekilde dondurulurken, ESC'leri dondurmada en yaygın kullanılan teknik vitrifikasyondur. Bu yöntemde, hücrelerin korunmasına yardımcı olmak ve hücrelerdeki buz kristali oluşumunu azaltmak için kademeli olarak artan bir sükröz konsantrasyonu ve DMSO kullanır (Freshney, 2010). Yavaş dondurulan ESC'lerin iyileşme oranı genellikle %10'un altındayken, ESC'nin vitrifikasyonu yüksek iyileşme oranları sağlar (Neubauer & ark., 2015). Kriyoprotektan olarak %10 DMSO'nun kullanıldığı yavaş dondurma yöntemi, ESC'lerin iyileşme oranını azaltır. Kriyoprotektan olarak DMSO'nun kullanılması, kriyoprezervasyondan sonra ESC farklılaşmasını indükleyebilir. Bu nedenle, ESC kriyoprezervasyonunda DMSO konsantrasyonlarının azaltılması idealdir (Xu, 2011). %10

DMSO'nun yerini almak için farklı CPA kombinasyonları denenmiştir (Martín-Ibáñez, Hovatta & Canals, 2012). Ha ve arkadaşları, CPA olarak % 5 DMSO ve farklı FBS konsantrasyonları (%5, %50 ve % 95) kullanımının etkisini incelemişlerdir. %50 ile %95 FBS arasında sağkalım oranlarında anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen, FBS konsantrasyonu azaldıkça kriyoprezervasyonlu hücrelerin sağkalım oranında azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca EG veya gliserol gibi CPA'ların farklı konsantrasyonları denenmiştir. En etkili kriyoprezervasyon %5 DMSO + % 50 FBS + % 10 EG kombinasyonu kullanıldığında elde edilmiş ve bu ortamın %5 DMSO + %50 FBS'ye kıyasla sağkalım oranında 3 kat artış sağladığı bildirilmiştir. ESC'nin temel özelliklerinin, yani proliferatif yeteneği ve pluripotensinin kriyoprezervasyondan sonra korunduğu tespit edilmiştir (Ha & ark., 2005).

Son zamanlarda, %5 DMSO ve %5 HES kombinasyonunun ESC'lerin yavaş dondurma yöntemiyle kriyoprezervasyonunda etkili olduğu gösterilmiştir (Martín-Ibáñez, Hovatta & Canals, 2012). Propilen glikol veya gliserolün kriyoprotektan olarak kullanımıyla hücrelerin %20-60 iyileştiği bildirilmiştir (Miyazaki & Suemori, 2016). DMSO ve FBS içeren kriyoprezervasyon ortamına trehaloz ilavesinin, hematopoietik prekürsör hücrelerinin canlılığını %7 ila %20 arttırdığı bildirilmiştir (Ji, de Pablo & Palecek, 2004). Wu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada %10 DMSO içeren dondurma ortamına trehaloz ilavesinin kriyoprezerve edilen ESC'lerde çözülme sonrası hücre iyileşmesi oranını %15'ten %48'e yükselttiğini göstermiştir (Wu & ark., 2005).

iPSC'lerin kriyoprezervasyonda DMSO, EG, propilen glikol ve gliserolün karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bu dört CPA'nın toksisitesi, 37 °C'de %10'luk bir CPA çözeltisinde 30 dakika bekletildikten sonra analiz edilmiştir. Sonuçlar, DMSO'nun iPSC'ler için en toksik CPA olduğunu, gliserolün ise en az zararlı CPA olduğunu göstermiştir. iPSC'lerin yavaş dondurma-hızlı çözdürme protokolü ile kriyoprezervasyonundan sonra aynı CPA'lar uyguladığında koruyucu etkinin tam tersi olduğu bildirilmiş, DMSO

etilen glikol ile birlikte en koruyucu CPA iken gliserolün en az koruyucu olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle DMSO'dan daha az toksisite gösterdiği ve benzer koruma seviyeleri sağladığı için tercih edilen kriyoprotektan olarak EG seçilmiştir (Martín-Ibáñez, Hovatta & Canals, 2012).

Sonuç

Kök hücre uygulamalarının geliştirilmesinde kriyoprezervasyon büyük bir öneme sahiptir. Kök hücrelerin kriyoprezervasyondan sonra canlı ve fonksiyonel olarak geri kazanılabilmesi için, çeşitli teorilerin geliştirildiği, teknolojik kriyojenik cihazların, alternatif kriyoprotektanların kullanıldığı birçok çalışma yapılmıştır ve farklı kök hücre tipleri için birçok farklı CPA kombinasyonlarını içeren protokoller geliştirilmiş, hayvan bileşeni içermeyen serumsuz veya DMSO içermeyen kriyoprezervasyon protokolleri araştırılmıştır. Kök hücrelerin hücrel ve genetik yapısını değiştirmeden kriyoprezerve edilmesi kök hücre bazlı tedavilerde başarılı sonuçlar elde etmeyi sağlayacaktır. Kriyoprezervasyon sırasında hücrelerde meydana gelen ve hücrelere zarar veren fiziksel ve kimyasal değişikliklerin daha kapsamlı araştırılması ve rejeneratif tıp tedavilerinde maksimum fayda sağlamak için, türlere ve dokulara özgü kriyoprezervasyon protokollerinin standartlaştırılması gerekmektedir.

KAYNAKÇA

Balci, D., & Can, A. (2013). The assessment of cryopreservation conditions for human umbilical cord stroma-derived mesenchymal stem cells towards a potential use for stem cell banking. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 60–72. Doi: 10.2174/1574888x11308010008.

Baust, J. G., Gao, D., & Baust, J. M. (2009). Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*, 5(3), 90–96. Doi: 10.4161/org.5.3.10021.

Berz, D., McCormack, E. M., Winer, E. S., Colvin, G. A., & Quesenberry, P. J. (2007). Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *American Journal of Hematology*, 82(6), 463–472. Doi: 10.1002/ajh.20707.

Bojic, S., Murray, A., Bentley, B. L., Spindler, R., Pawlik, P., Cordeiro, J. L., Bauer, R., & de Magalhães, J. P. (2021). Winter is coming: the future of cryopreservation. *BMC Biology*, 19(1), 56. Doi: 10.1186/s12915-021-00976-8.

Chang, T., & Zhao, G. (2021). Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Advanced Science*, 8(6), 2002425. Doi: 10.1002/advs.202002425.

De Rosa, A., De Francesco, F., Tirino, V., Ferraro, G. A., Desiderio, V., Paino, F., Pirozzi, G., D'Andrea, F., & Papaccio, G. (2009). A new method for cryopreserving adipose-derived stem cells: an attractive and suitable large-scale and long-term cell banking technology. *Tissue Engineering, Part C, Methods*, 15(4), 659–667. Doi: 10.1089/ten.TEC.2008.0674.

Doan, C. C., Truong, N. H., Vu, N. B., Nguyen, T. T., Nguyen, H. M., Nguyen, K. G., Do, S., Phan, N. K., & Pham, P. V. (2012). Isolation, culture and cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Plants, Animals, and Environmental Sciences*, 2(2), 83-90.

Edamura, K., Nakano, R., Fujimoto, K., Teshima, K., Asano, K., & Tanaka, S. (2014). Effects of cryopreservation on the cell viability, proliferative capacity and neuronal differentiation potential of canine bone marrow stromal cells. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 76(4), 573- 577. Doi: 10.1292/jvms.13-0296.

Eini, F., Foroutan, T., Bidadkosh, A., Barin, A., Dehghan, M. M., & Tajik, P. (2012). The effects of freeze/thawing process on cryopreserved equine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Comparative Clinical Pathology*, 21(6), 1713-1718. Doi: 10.1007/s00580-011-1355-8.

Freshney, I. R. (2010). Cryopreservation. In R. Ian Freshney (Ed.), *Culture of Animal Cell. A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (6th ed., pp. 317-334). New Jersey: Wiley.

Ginis, I., Grinblat, B., & Shirvan, M. H. (2012). Evaluation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after cryopreservation and hypothermic storage in clinically safe medium. *Tissue Engineering, Part C, Methods*, 18(6), 453-463. Doi: 10.1089/ten.TEC.2011.0395.

Gugjoo, M. B., Pal, A., Chandra, V., & Sharma, G. T. (2020). Mesenchymal stem cell isolation, culture, characterization and cryopreservation. In Mudasir Bashir Gugjoo & Amar Pal (Eds.), *Mesenchymal Stem Cell in Veterinary Sciences* (pp. 27-46). Singapore: Springer Nature.

Ha, S. Y., Jee, B. C., Suh, C. S., Kim, H. S., Oh, S. K., Kim, S. H., & Moon, S. Y. (2005). Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 20(7), 1779-1785. Doi: 10.1093/humrep/deh854.

Hornberger, K., Yu, G., McKenna, D., & Hubel, A. (2019). Cryopreservation of hematopoietic stem cells: emerging assays, cryoprotectant agents, and technology to improve outcomes. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(3), 188–196. Doi: 10.1159/000496068.

Hunt, C. J. (2011). Cryopreservation of human stem cells for clinical application: A review. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 38(2), 107–123. Doi: 10.1159/000326623.

James, A. W., Levi, B., Nelson, E. R., Peng, M., Commons, G. W., Lee, M., Wu, B., & Longaker, M. T. (2011). Deleterious effects of freezing on osteogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells, in vitro and in vivo. *Stem Cells and Development*, 20(3), 427-439. Doi: 10.1089/scd.2010.0082.

Jang, T. H., Park, S. C., Yang, J. H., Kim, J. Y., Seok, J. H., Park, U. S., Choi, C. W., Lee, S. R., & Han, J. (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integrative Medicine Research*, 6(1), 12-18. Doi: 10.1016/j.imr.2016.12.001.

Ji, L., de Pablo, J. J., & Palecek, S. P. (2004). Cryopreservation of adherent human embryonic stem cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(3), 299-312. Doi: 10.1002/bit.20243.

Li, H., Yan, F., Lei, L., Li, Y., & Xiao, Y. (2009). Application of autologous cryopreserved bone marrow mesenchymal stem cells for periodontal regeneration in dogs. *Cells Tissues Organs*, 190(2), 94-101. Doi: 10.1159/000166547.

Liu, G., Zhou, H., Li, Y., Li, G., Cui, L., Liu, W., & Cao, Y. (2008). Evaluation of the viability and osteogenic differentiation of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*, 57(1), 18-24. Doi: 10.1016/j.cryobiol.2008.04.002.

Liu, Y., Xu, X., Ma, X. H., Liu, J., & Cui, Z. F. (2011). Effect of various freezing solutions on cryopreservation of mesenchymal stem cells from different animal species. *Cryo Letters*, 32(5), 425–435.

Liu, Y., Xu, X., Ma, X., Martin-Rendon, E., Watt, S., & Cui, Z. (2010). Cryopreservation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells with reduced dimethylsulfoxide and well-

defined freezing solutions. *Biotechnology Progress*, 26(6), 1635–1643. Doi: 10.1002/btpr.464.

Lovelock, J. E., & Bishop, M. W. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183 (4672), 1394-1395. Doi: 10.1038/1831394a0.

Maffei, S., Brevini, T. A. L., & Gandolfi, F. (2014). Freezing and freeze-drying: the future perspective of organ and cell preservation. In Tiziana A.L. Brevini (Ed.), *Stem Cells in Animal Species: From Pre-clinic to Biodiversity. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine* (pp. 167–184) . Switzerland: Humana Press.

Martín-Ibáñez, R., Hovatta, O., & Canals, J. M. (2012). Cryopreservation of human pluripotent stem cells: are we going in the right direction? In Igor Katkov (Ed.), *Current Frontiers in Cryobiology* (pp. 139-166). InTech.

Martinello, T., Bronzini, I., Maccatrozzo, L., Iacopetti, I., Sampaolesi, M., Mascarello, F., & Patrino, M. (2010). Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Engineering, Part C, Methods*, 16(4),771-781. Doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0512.

Martinello, T., Bronzini, I., Maccatrozzo, L., Mollo, A., Sampaolesi, M., Mascarello, F., Decaminada, M., & Patrino, M. (2011). Canine adipose- derived-mesenchymal stem cells do not lose stem features after a long-term cryopreservation. *Research in Veterinary Science*, 91(1), 18-24. Doi: 10.1016/j.rvsc.2010.07.024.

Mitchell, A., Rivas, K. A., Smith, R., & Watts, A. E. (2015). Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95% autologous serum and 5% DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95% and DMSO at 10 or 5. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 231. Doi: 10.1186/s13287-015-0230-y.

Miyagi-Shiohira, C., Kurima, K., Kobayashi, N., Saitoh, I., Watanabe, M., Noguchi, Y., Matsushita, M., & Noguchi, H. (2015). Cryopreservation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell Medicine*, 8(1-2), 3–7. Doi: 10.3727/215517915X689100.

Miyazaki, T., & Suemori, H. (2016). Slow cooling cryopreservation optimized to human pluripotent stem cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 951, 57–65. Doi: 10.1007/978-3-319-45457-3_5.

Moon, J. H., Lee, J. R., Jee, B. C., Suh, C. S., Kim, S. H., Lim, H. J., & Kim, H. K. (2008). Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. *Human Reproduction*, 23(8), 1760- 1770. Doi: 10.1093/humrep/den202.

Naaldijk, Y., Staude, M., Fedorova, V., & Stolzing, A. (2012). Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *Bmc Biotechnology*, 12, 49. Doi: 10.1186/1472-6750-12-49.

Neubauer, J. C., Beier, A. F., Geijsen, N., & Zimmermann, H. (2015). Efficient cryopreservation of human pluripotent stem cells by surface-based vitrification. In Willem F. Wolkers & Harriette Oldenhof (Eds.), *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Methods in Molecular Biology* (3rd ed., pp. 321-328). New York: Springer Science.

Petrenko, Y. A., Rogulska, O. Y., Mutsenko, V. V., & Petrenko, A. Y. (2014). A sugar pretreatment as a new approach to the Me₂SO- and xeno-free cryopreservation of human mesenchymal stromal cells. *Cryo Letters*, 35(3), 239-246.

Pham, P. V., & Vu, N. B. (2016). Production of clinical-grade mesenchymal stem cells. In Phuc Van Pham (Ed.), *Stem Cells in Clinical Applications* (pp. 107-129). Switzerland: Springer.

Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, *164* (4172), 666. Doi: 10.1038/164666a0.

Renzi, S., Lombardo, T., Dotti, S., Dessì, S. S., De Blasio, P., & Ferrari, M. (2012). Mesenchymal stromal cell cryopreservation. *Biopreservation and Biobanking*, *10*(3), 276–281. Doi: 10.1089/bio.2012.0005.

Smith, A. U. (1950). Prevention of haemolysis during freezing and thawing of red blood cells. *Lancet*, *2* (6644), 910–911. Doi: 10.1016/s0140-6736(50)91861-7.

Thirumala, S., Gimble, J. M., & Devireddy, R. V. (2010b). Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells and Development*, *19*(4), 513–522. Doi: 10.1089/scd.2009.0173.

Thirumala, S., Wu, X., Gimble, J. M., & Devireddy, R. V. (2010a). Evaluation of polyvinylpyrrolidone as a cryoprotectant for adipose tissue-derived adult stem cells. *Tissue Engineering, Part C, Methods*, *16*(4), 783–792. Doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0552.

Vidal, M. A., Walker, N. J., Napoli, E., & Borjesson, D. L. (2012). Evaluation of senescence in mesenchymal stem cells isolated from equine bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue. *Stem Cells and Development*, *21*(2), 273–283. Doi: 10.1089/scd.2010.0589.

Wu, C. F., Tsung, H. C., Zhang, W. J., Wang, Y., Lu, J. H., Tang, Z. Y., Kuang, Y. P., Jin, W., Cui, L., Liu, W., & Cao, Y. L. (2005). Improved cryopreservation of human embryonic stem cells with trehalose. *Reproductive Biomedicine Online*, *11*(6), 733–739. Doi: 10.1016/s1472-6483(10)61692-6.

Xie, J., Ekpo, M. D., Xiao, J., Zhao, H., Bai, X., Liang, Y., Zhao, G., Liu, D., & Tan, S. (2022). Principles and protocols for post-cryopreservation quality evaluation of stem cells in novel

biomedicine. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 907943. Doi: 10.3389/fphar.2022.907943.

Xu, X. (2011). Cryopreservation of stem cells. In Murray Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology* (2nd ed., pp. 481-488). Academic Press.

Yong, K. W., Wan Safwani, W. K., Xu, F., Wan Abas, W. A., Choi, J. R., & Pingguan-Murphy, B. (2015). Cryopreservation of human mesenchymal stem cells for clinical applications: current methods and challenges. *Biopreservation and Biobanking*, 13(4), 231-239. Doi: 10.1089/bio.2014.0104.

Zhu, X., Yuan, F., Li, H., Zheng, Y., Xiao, Y., & Yan, F. (2013). Evaluation of canine bone marrow-derived mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation. *Zoological Science*, 30(12), 1032–1037. Doi: 10.2108/zsj.30.1032.

BÖLÜM IX

Mezenkimal Kök Hücrelerin Biyolojik Özellikleri

Sare UYURCA¹
Öğünç MERAL²

Giriş

Kök hücre, hücre bölünmesi yoluyla uzun süreli kendini yenileme yeteneğine sahip, özel, işlevsel bir hücreye farklılaşması için uyarılabilen, özelleşmemiş hücrelere atıfta bulunan genel bir terimdir (Quimby, 2019). Mezenkimal kök hücreler (MSC) kendini yenileme, klonal hücre popülasyonları oluşturma ve multilineage farklılaşma ile karakterize multipotent kök hücrelerdir (Wang, Yuan & Xie, 2018). MSC'ler kondrositlere, adipositlere, osteoblastlara, miyositlere, nöral hücrelere ve hepatositlere farklılaşma yeteneğine sahiptir (Kang & Park, 2020). MSC'nin plasenta, diş pulpası, amniyotik sıvı, kalp, iskelet kası, yağ dokusu, kemik iliği, sinovyal sıvı, endometriyum, wharton jölesi ve pankreas dahil olmak üzere

¹ Doktora Öğrencisi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Biyokimyası, sarecavdarr@gmail.com

² Doç. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, omeral@ankara.edu.tr

bir dizi yetişkin ve fetal dokudan izole edilebildiği gösterilmiştir (Markov & ark., 2021; Väänänen, 2005). MSC'lerin hücre-hücre teması, mediatör salgılanması, ekstraselüler veziküllerin üretimi ve hatta trofik faktörleri ve hasarlı hücreleri onarmak için mitokondriyi aktarabilen membran nanotüplerinin oluşumunu içeren çok sayıda mekanizma yoluyla doku rejenerasyonuna ve onarımına yardımcı olduğu düşünülmektedir. MSC'ler anjiyogenezi artıran, inflamasyonu azaltan ve immün sistemi modüle eden biyoaktif faktörler salgılar. Organ hasarlarında, MSC'lerin fibrozisi inhibe ettiği ve lokal kök hücreleri toplayarak sağkalmalarını, çoğalmalarını ve farklılaşmalarını uyardığı düşünülmektedir (Quimby & Borjesson, 2018). MSC'lerin bu üstün meziyetleri, doku hasarı ve inflamasyon için potansiyel tedavilere yeni bir bakış açısı kazandırmaktadır (Wang, Yuan & Xie, 2018).

1. Anti-İnflamatuar ve İmmünomodülatör Özellikleri

Son zamanlarda, MSC'lerin immünomodülatör ve anti-inflamatuar özelliklerinin altında yatan mekanizmaların anlaşılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. İn vitro çalışmalar, MSC'lerin çevresel sinyallerin yoğunluğuna bağlı olarak zıt yönlerde yanıt verebileceğini göstermektedir. Yani, bağışıklık sisteminin yeterince aktif olmadığı durumlarda inflamasyonu teşvik ettiği ve bağışıklık sisteminin aşırı aktif olduğu durumlarda bağışıklık sistemini baskıladığı tespit edilmiştir (Salari & ark., 2020).

MSC'lerin immünomodülatör fonksiyonlarını, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler (DC), T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler gibi bağışıklık hücreleriyle, hücre-hücre teması ve parakrin etki yoluyla gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Song, Scholtemeijer & Shah, 2020). Son çalışmalar, sadece canlı MSC'lerin değil apoptotik, metabolik olarak inaktive edilmiş veya parçalanmış MSC'lerin de immünomodülatör yeteneklere sahip olduğunu göstermektedir (Weiss & Dahlke, 2019).

1.1. Canlı MSC'lerle İmmünomodülasyon

İn vitro olarak elde edilen MSC'ler, doğal ve kazanılmış bağışıklık süreçlerinde yer alan efektör hücrelerin çoğunun işlevini etkinleştirme ve düzenleme yeteneğine sahiptir (Andrzejewska, Lukomska & Janowski, 2019).

Doğal bağışıklık sistemi DC, NK hücreleri ve makrofajlardan oluşur ve MSC'lerle etkileşimleri rejeneratif süreçleri teşvik eder ve inflamatuvar yanıtları inhibe eder (Wang, Yuan & Xie, 2018).

Dendritik hücreler, T hücresi aktivasyonunu ve farklılaşmasını indükleyebilen hücrelerdir (Patente & ark., 2019). MSC'nin dendritik hücre farklılaşması, olgunlaşması ve işlevine müdahale ettiği gösterilmiştir. MSC'ler, olgunlaşmamış dendritik hücrelerin olgun formlara dönüşmesini engeller ve dendritik hücrelerin hücre döngüsünü G0/G1 fazında durdurabilir. Ayrıca DC'lerin dokulara mobilizasyonunu sınırlandırır (Andrzejewska, Lukomska & Janowski, 2019; Herrero & Pérez-Simón, 2010). MSC'ler, prostaglandin E2 (PGE2)'yi içeren bir mekanizma yoluyla monositlerin DC'lere farklılaşmasını bloke eder (Guerrouahen & ark., 2019).

NK hücreleri lenfositlerin bir alt kümesi olarak kabul edilir ve önemli bir interferon- γ (IFN- γ) kaynağıdır (Guerrouahen & ark., 2019). MSC'ler, hasarlı dokulardaki NK hücrelerinden salgılanan IFN- γ tarafından aktive edilebilir ve anti-inflamatuvar etkiler gösterebilir (Kanai & ark., 2021). Ayrıca MSC'ler NK hücrelerinin sitotoksik aktivitesinin azalmasına neden olurlar (Andrzejewska, Lukomska & Janowski, 2019).

Makrofajlar klasik olarak aktive edilmiş M1 makrofajları ve alternatif olarak aktive edilmiş M2 makrofajları olmak üzere 2 gruba ayrılır. M1 makrofajları inflamatuvar yanıtları başlatabilir ve sürdürebilir, pro-inflamatuvar sitokinler salgılayabilir ve diğer immün hücrelerin inflamasyonlu dokuya alınmasını tetikleyebilir; M2 makrofajları ise, apoptotik hücreleri fagosite eder ve anti-

inflatuar mediatörler salgılar. MSC'ler immunomodulator etkisiyle, M1 makrofajları, M2 makrofajlara dönüştürür ve makrofajlar tarafından salgılanan interlökin 10 (IL-10), T hücresi proliferasyonunu inhibe eder (Andrzejewska, Lukomska & Janowski, 2019; Murray & Wynn, 2011; Viola & ark., 2019).

Kazanılmış bağışıklık sistemi CD4⁺ T yardımcı ve CD8⁺ T sitotoksik lenfositlerden ve B lenfositlerinden oluşur (Wang, Yuan & Xie, 2018).

MSC'ler CD4⁺ ve CD8⁺ T lenfosit proliferasyonunu baskılar. MSC'ler tümör nekroz faktör α (TNF- α) ve IFN- γ gibi T lenfositler tarafından sentezlenen pro-inflatuar sitokinlerin seviyesini düşürür ve anti-inflatuar sitokinlerin sentezini artırır (Andrzejewska, Lukomska & Janowski, 2019). MSC'lerin Th1 ve Th17 (Th; T yardımcı) hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebildiğini, IL-2, IL-6, IL-17, salınımını azalttıkları ve Th2 hücreleri tarafından IL-4 salgılanmasını arttırdıkları tespit edilmiştir (Ma & Chan, 2016; Zhao & ark., 2010).

B hücreleri, antijenler ve IL-10 gibi inflamatuvar sitokinler tarafından uyarıldığında antikor salgılar (Guerrouahen & ark., 2019). MSC'ler B lenfositlerinin proliferasyonunu, farklılaşmasını, olgunlaşmasını, kemotaksisini ve aktivasyonunu inhibe eder (Wang, Yuan & Xie, 2018). MSC'ler aktive B hücreleri tarafından salgılanan IgM, IgG ve IgA (Ig; immünoglobulin) sınıfları gibi immünoglobülinlerin sentezini sınırlama yeteneğine sahiptir, böylece bu hücrelerin plazma hücrelerine farklılaşmasını bloke eder. Ayrıca, B lenfositlerinin yüzeyindeki kemokinlerin ve reseptörlerin ekspresyonunu azaltırlar, bu da potansiyel olarak göç etme yetenekleri üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir (Andrzejewska, Lukomska & Janowski, 2019).

MSC'ler, topluca sekretom olarak adlandırılan ve hasarlı dokularda rejeneratif süreçleri destekleyen çok çeşitli parakrin faktörler salgılar (Andrzejewska, Lukomska & Janowski, 2019). MSC'ler, immünosupresyonu indüklemek için solubl immün faktörler salgılayarak hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık

sistemlerindeki immün hücrelerle etkileşime girebilir. Hasarlı hücreleri onararak veya immünolojik aktivitesini baskılayarak işlevlerini yerine getiren sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar ve kemokinler gibi MSC'ler tarafından bir dizi solubl faktör salınır. Bunlar arasında transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β), indolamin-2,3-dioksijenaz (IDO), PGE2, IL-10 ve tümör nekroz faktör (TNF) ile uyarılmış gen-6 (TSG-6) gibi efektörler bulunur (Voga & ark., 2020; Wang, Yuan & Xie, 2018).

Metabolik bir enzim olan IDO, MSC tarafından inflamatuvar bir ortamda salgılanan solubl faktörlerden biridir. IDO, triptofanı metaboliti kynurenine dönüştürerek immün hücrelerin proliferasyonunu ve etkisini engelleyebilir. IDO, T- ve B-hücre döngüsünün durmasına, T-hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ve düzenleyici T hücresi (Treg) oluşumunun indüklenmesine, B-hücrelerinin ve NK hücrelerinin inhibisyonuna yol açan reaksiyonları katalize eder ve M2 makrofajlarının farklılaşmasıyla ilişkilidir (Voga & ark., 2020; Wang, Yuan & Xie, 2018).

TSG-6, anti-inflamatuvar ve koruyucu özelliklere sahip bir proteindir. TNF-a ve IL-1 gibi proinflamatuvar mediatörler TSG-6'nın salgılanmasını uyarabilir. MSC'lerden salınan TSG-6'nın M1'den M2 fenotipine geçişi indüklediği ve Treg sayısını artırarak inflamatuvar semptomları hafiflettiği gösterilmiştir (Voga & ark., 2020; Wang, Yuan & Xie, 2018).

IL-10 makrofaj ve dendritik hücrelerin Th1 ve Th2 yanıtını ve yardımcı fonksiyonlarını sınırlayan, T hücre gelişimini inhibe eden ve Treg üretimini arttıran bir anti-inflamatuvar sitokindir. Yapılan çalışmalar IL-10'un T hücre apoptozuna yol açtığını göstermiştir. MSC'lerin IL-10 salgılaması, inflamatuvar bir ortam ve T hücreleri ile temas aracılığıyla uyarılır (Voga & ark., 2020; Yang & ark., 2009).

PGE2 kemokin üretimini modüle eder, proinflamatuvar hücrelerin bölgeye yönelmesini engeller ve düzenleyici hücrelerin

farklılaşmasını arttırır. NK hücre inhibisyonunda önemli bir araçtır ve M2 fenotipine doğru makrofaj polarizasyonunda rolü vardır. MSC'ler tarafından üretilen PGE2, TNF üretimi ve göçü gibi çeşitli hücre fonksiyonlarını kısıtlar.IDO ile PGE2 sinerjik etkisi, insan MSC'lerinde T hücresi proliferasyonunun yanı sıra NK hücresi sitolitik aktivitesinin inhibe edilmesini sağlar. Ayrıca, MSC tarafından apoptotik hücrelerin temizlenmesindeki rolü de gösterilmiştir (Voga & ark., 2020; Wang, Yuan & Xie, 2018).

TGF- β , hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması, embriyonik gelişim, yara iyileşmesi ve anjiyogenez gibi birçok biyolojik süreçte yer alır. MSC'nin göçünü ve homingini, proliferasyonunu ve farklılaşmasını etkiler. TGF- β 'nın makrofajların M1 durumdan M2 duruma geçişini indüklediği ve dolayısıyla Treg'lerin indüksiyonunda önemli ölçüde görev aldığı gösterilmiştir (Voga & ark., 2020).

1.2. Apoptotik MSC'lerle İmmünomodülasyon

MSC'lerin canlılığı, bazı immünomodülatör etkileri için bir ön koşul olarak görülmemektedir. Apoptotik adipoz doku kaynaklı MSC'lerin (A-ADMSC'ler), sepsis indüksiyonundan sonra sıçanlarda mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir. A-ADMSC'lerle tedavi edilen grupta mortalite, dolaşımdaki TNF- α , T yardımcı hücre ve sitotoksik T hücrelerinin seviyelerinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, A-ADMSC tedavisinin, inflamasyon, oksidatif stres ve apoptozun yanı sıra akciğerde ve böbreklerde sepsise bağlı histopatolojik değişikliklerin azaltılmasında canlı MSC'lere kıyasla daha etkili olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, apoptotik MSC'leri fagosite eden makrofajların süpernatantlarının hipoksik kardiyomiyositlerin sağkalımını arttırdığı bildirilmiştir. Farelerde endotoksin kaynaklı bir akut akciğer hasarı modelinde apoptotik MSC'lerin intrapulmoner uygulaması sağkalımı arttırmamış veya hastalığın şiddetini azaltmamıştır. Ayrıca, ne plazmada ne de bronkoalveolar lavaj sıvısında TNF- α düzeylerinde azalma ve IL-10 düzeylerinde artış gözlenmemiştir (Weiss & Dahlke, 2019).

2. Kök Hücrelerin Göçü ve Hedef Belirleme Özellikleri

MSC'ler karakteristik göç ve homing özelliğine sahiptirler ve belirli uyaranlardan sonra nişini terk edebilirler ve kanda dolaşabilirler (Barky, Ali & Mohamed, 2017; Gugjoo, Pal & Sharma, 2020). MSC'ler hasarlı bölgelere göç edebilirler ve hasarlı bölgelerin lokal komponentlerine farklılaşma kapasitesine ve doku rejenerasyonuna yardımcı olan kemokinleri, sitokinleri ve büyüme faktörlerini salgılama yeteneğine sahiptirler (Fu & ark., 2019). Özellikle hücre kemotaksisini bloke etme veya uyarma sürecinde MSC'ler tarafından salgılanan kemokinler önemli bir rol oynar (Andrzejewska, Lukomska & Janowski, 2019).

Stromal hücre kaynaklı faktör 1 (SDF-1), MSC'ler tarafından eksprese edildiği düşünülen kemokin reseptörü CXCR4'ün ligandıdır. MSC'ler üzerinde CXCR4'ün aşırı ekspresyonu kemik iliğine homingi artırmaktadır. Bununla birlikte, bazı araştırmalar MSC'lerin CXCR4'ü eksprese etmediğini bildirerek diğer reseptörlerin de devreye girdiğini öne sürmektedir. Nitekim MSC'lerin CXCR7'yi de eksprese ettiği ve bunun da benzer şekilde SDF-1'i bağlayarak çeşitli dokulara homingi kolaylaştırdığı gösterilmiştir. MSC'ler CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR5 ve CXCR6 dahil olmak üzere çeşitli başka reseptörleri de eksprese etmektedir, ancak bunların rolleri ayrıntılı olarak aydınlatılmayı beklemektedir (Ullah, Liu & Thakor, 2019).

Büyüme faktörleri, hücre göçünü, proliferasyonu, farklılaşmayı ve ekstraselüler matris sentezini düzenleyen bir polipeptid sınıfıdır. Çalışmalar, büyüme faktörlerinin MSC'lerin göçünde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Günümüzde bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF) ve TGF- β 1 doku onarımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bir dizi çalışma, bu büyüme faktörlerinin MSC'lerin hasarlı bölgeye homingini indüklemek ve MSC'lerin doku

rejenerasyonuna katılımı için kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir (Fu & ark., 2019).

Osteopontin (OPN), çeşitli dokularda sentezlenen bir O-glikozil fosfat proteindir, aynı zamanda kalp, böbrek, akciğer, kemik ve diğer dokularda hasar ve inflamasyona yanıt olarak yukarı regüle edilen bir sitokindir. OPN ekspresyonundaki artış, çeşitli hücrelerde hücre göçü ve sağkalım yeteneğindeki artışla ilişkilendirilmiş ve özellikle MSC'lerin göçünü artırabildiği görülmüştür (Fu & ark., 2019).

3. Ekstrasellüler Veziküllerin Salgılanması

Ekstrasellüler vezikül (EV)'lerin, proteinler, lipidler ve RNA'lar dahil olmak üzere içeriklerini hücreler arasında transfer ederek hem lokal hem de sistemik olarak hücreler arası iletişimde önemli rollere sahip olduğu düşünülmektedir (Robbins & Morelli, 2014). EV'ler, hücre plazma zarının içe veya dışa doğru tomurcuklanmasıyla oluşan veziküllerdir. EV'lerin IL-10, IL-22, IL-23 ve TGF-beta konsantrasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Choudhary, 2021). Klasik olarak, EV'ler fiziksel parametrelere göre (i) apoptotik cisimler (Aps; ~ 50–5,000 nm); (ii) mikroveziküller (MV; ~100–1.000 nm); ve (iii) eksozomlar (EX; ~40–100 nm) olarak üç ana sınıfa ayrılır (Akers & ark., 2013; Than & ark., 2018). Bu veziküller, hücreler arası iletişim, hücre farklılaşması ve proliferasyonu, anjiyogenez, stres yanıtı ve bağışıklık sinyali dahil olmak üzere çok çeşitli hücre işlevlerine yardımcı olmak için hemen hemen tüm hücre türleri tarafından salgılanırlar (Hade, Suire & Suo, 2021).

Son çalışmalar, hem normal hem de kanserli hücrelerin hücre dışı boşluğa veziküller salgıladığını göstermektedir. EV'ler, salgılayan hücrenin genetik ve proteomik içeriğini yansıtan materyaller içerir. Kanser hastalarının biyolojik sıvılarından (örneğin serum, beyin omurilik sıvısı, idrar) izole edilen EV'lerde kansere özgü materyallerin tanımlanması, EV'leri biyobelirteç gelişimi için önemli bir platform olarak sunar (Akers & ark., 2013).

4. Mitokondriyal Aktarım

Mitokondriyal disfonksiyon, sinir, iskelet kası, kalp ve karaciğer hücreleri gibi yüksek enerji ihtiyacı olan hücreleri etkiler (Gomzikova, James & Rizvanov, 2021). Mitokondriyal disfonksiyon homeostatik mekanizmayı bozan reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine neden olur. Kök hücrelerin terapötik mekanizmalarının yanı sıra, doğrudan hücre farklılaşması yoluyla veya dolaylı olarak parakrin sinyalizasyonu, EV'ler ve immünomodülasyon yoluyla, hastalıklı hücrelere mitokondri aktardığı da gösterilmiştir (Choudhary, 2021). MSC'lerin mitokondri transferi yaparak, hasarlı hücrenin iyileşmesine katkıda bulunduğunu, aerobik solunumu iyileştirdiğini ve apoptozu inhibe ettiğini göstermek için çok sayıda çalışma yapılmıştır (Gomzikova, James & Rizvanov, 2021). Spees ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, mitokondrinin yetişkin kök hücrelerden ve somatik hücrelerden aktif transferinin, fonksiyonel olmayan mitokondriye sahip memeli hücrelerinde aerobik solunumu iyileştirebileceği ortaya koyulmuştur (Spees & ark., 2006). Buna ek olarak mitokondriyal transfer aracılığıyla kemikte ve renal proksimal tübüler epitel hücrelerinde hücre proliferasyonu, göçü ve hücresel farklılaşmanın arttığı bildirilmiştir (Choudhary, 2021).

MSC'lerden hasarlı hücrelere mitokondriyal transfer, doku onarımında olumlu sonuçlar vermiş olsa da, kanser hücrelerinde ATP üretimi, hücre proliferasyonu ve invazyon yeteneğini arttıracığı için kanser hücreleri üzerindeki etkileri istenmez. MSC mitokondriyal transferinin, doku onarımı ve kanser tedavisi için farmasötik bir hedef olabileceği düşünülmektedir (Li & ark., 2019).

KAYNAKÇA

Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S., & Chen, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-oncology*, *113*(1), 1–11. Doi: 10.1007/s11060-013-1084-8.

Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise review: mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *37*(7), 855–864. Doi: 10.1002/stem.3016.

Barky, A. R., Ali, E. M. M., & Mohamed, T. M. (2017). Stem cells, classifications and their clinical applications. *Am J Pharmacol Ther*, *1*(1), 001-007.

Choudhary, R. K. (2021). Overview of stem cells and their applications in veterinary medicine. In Ratan Kumar Choudhary & Shanti Choudhary (Eds.), *Stem Cells in Veterinary Science* (pp. 3-23). Singapore: Springer.

Fu, X., Liu, G., Halim, A., Ju, Y., Luo, Q., & Song, A. G. (2019). Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*, *8*(8), 784. Doi: 10.3390/cells8080784.

Gomzikova, M. O., James, V., & Rizvanov, A. A. (2021). Mitochondria donation by mesenchymal stem cells: Current understanding and mitochondria transplantation strategies. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 653322. Doi: 10.3389/fcell.2021.653322.

Guerrouahen, B. S., Sidahmed, H., Al Sulaiti, A., Al Khulaifi, M., & Cugno, C. (2019). Enhancing mesenchymal stromal cell immunomodulation for treating conditions influenced by the immune system. *Stem Cells International*, *2019*, 7219297. Doi: 10.1155/2019/7219297.

Gugjoo, M. B., Pal, A., & Sharma, G. T. (2020). Mesenchymal stem cell and its properties. In Mudasir Bashir Gugjoo

& Amar Pal (Eds.), *Mesenchymal Stem Cell in Veterinary Sciences* (pp. 13-26). Singapore: Springer Nature.

Hade, M. D., Suire, C. N., & Suo, Z. (2021). Mesenchymal stem cell-derived exosomes: Applications in regenerative medicine. *Cells*, *10*(8), 1959. Doi: 10.3390/cells10081959.

Herrero, C., & Pérez-Simón, J. A. (2010). Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *43*(5), 425–430. Doi:10.1590/s0100-879x2010007500033.

Kanai, R., Nakashima, A., Doi, S., Kimura, T., Yoshida, K., Maeda, S., Ishiuchi, N., Yamada, Y., Ike, T., Doi, T., Kato, Y., & Masaki, T. (2021). Interferon- γ enhances the therapeutic effect of mesenchymal stem cells on experimental renal fibrosis. *Scientific Reports*, *11*(1), 850. Doi:10.1038/s41598-020-79664-6.

Kang, M. H., & Park, H. M. (2020). Challenges of stem cell therapies in companion animal practice. *Journal of Veterinary Science*, *21*(3), e42. Doi: 10.4142/jvs.2020.21.e42.

Li, C., Cheung, M. K. H., Han, S., Zhang, Z., Chen, L., Chen, J., Zeng, H., & Qiu, J. (2019). Mesenchymal stem cells and their mitochondrial transfer: a double-edged sword. *Bioscience Reports*, *39*(5), BSR20182417. Doi: 10.1042/BSR20182417.

Ma, O. K., & Chan, K. H. (2016). Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. *World Journal of Stem Cells*, *8*(9), 268–278. Doi: 10.4252/wjsc.v8.i9.268.

Markov, A., Thangavelu, L., Aravindhan, S., Zekiy, A. O., Jarahian, M., Chartrand, M. S., Pathak, Y., Marofi, F., Shamlou, S., & Hassanzadeh, A. (2021). Mesenchymal stem/stromal cells as a valuable source for the treatment of immune-mediated disorders. *Stem Cell Research & Therapy*, *12*(1), 192. Doi: 10.1186/s13287-021-02265-1.

Murray, P. J., & Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews. Immunology*, *11*(11), 723–737. Doi: 10.1038/nri3073.

Patente, T. A., Pinho, M. P., Oliveira, A. A., Evangelista, G. C. M., Bergami-Santos, P. C., & Barbuto, J. A. M. (2019). Human dendritic cells: Their heterogeneity and clinical application potential in cancer immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, *9*, 3176. Doi: 10.3389/fimmu.2018.03176.

Quimby, J. M. (2019). Stem cell therapy. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, *49*(2), 223–231. Doi: 10.1016/j.cvsm.2018.10.001.

Quimby, J. M., & Borjesson, D. L. (2018). Mesenchymal stem cell therapy in cats: Current knowledge and future potential. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *20*(3), 208–216. Doi: 10.1177/1098612X18758590.

Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(3), 195–208. Doi: 10.1038/nri3622.

Salari, V., Mengoni, F., Del Gallo, F., Bertini, G., & Fabene, P. F. (2020). The anti-inflammatory properties of mesenchymal stem cells in epilepsy: Possible treatments and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 9683. Doi: 10.3390/ijms21249683.

Song, N., Scholtemeijer, M., & Shah, K. (2020). Mesenchymal stem cell immunomodulation: mechanisms and therapeutic potential. *Trends in Pharmacological Sciences*, *41*(9), 653–664. Doi: 10.1016/j.tips.2020.06.009.

Spees, J. L., Olson, S. D., Whitney, M. J., & Prockop, D. J. (2006). Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(5), 1283–1288. Doi: 10.1073/pnas.0510511103.

Than, U. T. T., Guanzon, D., Broadbent, J. A., Leavesley, D. I., Salomon, C., & Parker, T. J. (2018). Differential expression of keratinocyte-derived extracellular vesicle mirnas discriminate exosomes from apoptotic bodies and microvesicles. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 535. Doi: 10.3389/fendo.2018.00535.

Ullah, M., Liu, D. D., & Thakor, A. S. (2019). Mesenchymal stromal cell homing: Mechanisms and strategies for improvement. *iScience*, *15*, 421–438. Doi: 10.1016/j.isci.2019.05.004.

Väänänen, H. K. (2005). Mesenchymal stem cells. *Annals of Medicine*, *37*(7), 469–479. Doi: 10.1080/07853890500371957.

Viola, A., Munari, F., Sánchez-Rodríguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The metabolic signature of macrophage responses. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1462. Doi: 10.3389/fimmu.2019.01462.

Voga, M., Adamic, N., Vengust, M., & Majdic, G. (2020). Stem cells in veterinary medicine-current state and treatment options. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*, 278. Doi: 10.3389/fvets.2020.00278.

Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal stem cell-based immunomodulation: Properties and clinical application. *Stem Cells International*, *2018*, 3057624. Doi: 10.1155/2018/3057624.

Weiss, A. R. R., & Dahlke, M. H. (2019). Immunomodulation by mesenchymal stem cells (MSCs): Mechanisms of action of living, apoptotic, and dead MSCs. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1191. Doi: 10.3389/fimmu.2019.01191.

Yang, S. H., Park, M. J., Yoon, I. H., Kim, S. Y., Hong, S. H., Shin, J. Y., Nam, H. Y., Kim, Y. H., Kim, B., & Park, C. G. (2009). Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T

cell proliferation by inducing IL-10. *Experimental & Molecular Medicine*, 41(5), 315–324. Doi: 10.3858/emm.2009.41.5.035.

Zhao, S., Wehner, R., Bornhäuser, M., Wassmuth, R., Bachmann, M., & Schmitz, M. (2010). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells and Development*, 19(5), 607–614. Doi: 10.1089/scd.2009.0345.

BÖLÜM X

Veteriner ve Tıp Hekimliğinde Elektriksel Stimülasyon

Filiz KAZAK¹

Giriş

Elektriksel stimülasyonun, insan ve hayvan vücudunda önemli etkilere sahip olduğu bilinmektedir. Başlangıçta, uygulanan dışsal kaynaklı elektriksel stimülasyonlar, elektrotlar aracılığıyla deri üzerinden kaslara ve sinirlere iletilmesi ile elektrik akımlarının vücuttaki iyonları hareket ettirmesi, motor nöronların ve duysal afferentlerin depolarizasyonu ile aksiyon potansiyelleri oluşturur. Sonra, kasta refleks yolla kontraksiyon oluşturması, yavaş ve hızlı motor üniteleri senkronize katılım ile aktif hale getirmesi, kas fibrillerinde, kas içi sinir dallarında ve kütanöz reseptörlerde aksiyon potansiyeli oluşturur. Günümüzde elektriksel stimülasyon, sağlıklı insanlarda ve hayvanlarda kas eğitiminde atletik performansı artırmak amacıyla kullanıldığı gibi, bir elektroterapi, özellikle

¹ Doç. Dr., Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay

nörolojik ve kas iskelet sistemi ile ilgili durumlarda çeşitli hastaların fonksiyonlarını geliştirmek için en sık kullanılan cerrahi olmayan tedavi yöntemidir (Çetin & ark., 2018; Ni & ark., 2023). Ayrıca, organların fonksiyonlarını hızlandırmak ya da ağrı ve benzeri semptomları azaltmak amacıyla geleneksel eğitim ve rehabilitasyon programlarına yardımcı olarak kullanılan çeşitli elektriksel stimülasyon modaliteleri bulunmaktadır. Geçmişte uygulanan modaliteler, kısa dalga radyo terapisi, faradizm, düşük frekanslı doğru akım terapisi veya non-invaziv doğru akım dahil olmak üzere elektrik tedavi yöntemleri iken (Buchner & Schildboeck, 2006), günümüzde uygulanan elektriksel stimülasyon modaliteleri, nöromusküler elektriksel stimülasyon (NMES), transkutanöz elektriksel sinir stimülasyonu (TENS) ve fonksiyonel elektriksel stimülasyon (FES) şeklindedir (Karakaya & ark., 2013; Ni & ark., 2023).

Elektriksel Stimülasyon

Vücutta elektriksel stimuluslardan ilk olarak etkilenen dokular, sinir ve kas dokularıdır. Elektriksel stimülasyon, uyarılabilir membranları doğrudan etkileyerek, elektriğin tedavi edici etkilerinin oluşumunu sağlar. Elektriksel stimülasyon hücre düzeyinde etkilerini, periferik sinirlerin ve kas liflerinin uyarılması sonrasında, hücrelerin membran potansiyellerinde ve yapılarında değişiklik oluşturması ile protein sentezlenmesi düzeylerinde ve enzimatik aktivitelerde farklılıkların şekillenmesi aracılığında gerçekleştirmektedir (Tuncer, 2000). Elektriksel stimülasyonun terapötik mekanizması, kas atrofisini azaltmak ve yapısal koruyucu proteinlerin ve nörotrofik faktörlerin ekspresyonunu artırarak kasın yeniden sinirlenmesini teşvik etmek olabilir (Ni & ark., 2023). Elektriksel stimülasyon doku düzeyinde etkilerini, kas kasılması ile kas kuvveti artışı sağlayarak, lenfatik ve venöz dolaşımı hızlandırarak ve doku rejenerasyonun artmasını tetikleyerek göstermektedir (Başar, 2006; Tunç, 2014). Segmental düzeyde elektrik stümilasyonunun, grup kas kasılmaları, eklem mobilitesi ve sinerjistik kas aktivitesi üzerine etkileri bulunduğu ve aynı zamanda kasın pompalama hareketleri ile dolaşım sisteminde kan akışı ve

lenfatik drenajı üzerinde dolaylı olarak etkilere neden olduğu bildirilmektedir. Sistematik düzeyde elektriksel stimülasyonu, analjezik etkilerin ortaya çıkmasında rol oynayan betaendorfin, enkefalin, dopamin ve dimorfin gibi endojen polipeptidlerin salınımlarını etkilemektedir. Aynı zamanda substans-P ve serotonin gibi nörotransmitterler ile birlikte dolaylı olarak analjezik etki oluşumuna neden olmaktadır. Elektriksel stimülasyonu dolaşım üzerine sistemik etkilerini, vazoaaktif intestinal polipeptidler gibi polipeptidler ile birlikte gerçekleştirmektedir. Ayrıca elektriksel stimülasyonun dolaylı olarak böbrek ve kalp fonksiyonları gibi iç organ aktivitelerinin düzenlenmesinde metabolizma üzerine etkileri de bulunmaktadır (Tunç, 2014). Elektriksel stimülasyon, fizyolojik olarak elektrotermal, elektrokimyasal ve elektrofiziksel temel etki mekanizmasına sahiptir (Başar, 2006). Hekimlikte elektriksel stimülasyonunun kullanımı, diagnostik, tedavi ve fonksiyonel amaçlıdır. Hekimler klinikte elektrik stimülasyonu kas gücünü arttırmak, hareket aralığını arttırmak, ödemi azaltmak, atrofiyi azaltmak, dokuyu iyileştirmek ve ağrıyı azaltmak için kullanılabilir (Doucet & ark., 2012). Elektriksel stimülasyonunun etkileri ve kullanım alanları, dalga boyu formu, atım süresi gibi elektrik uygulama parametreleri ve elektriksel stimülasyonun uygulanması için seçilen doku tipi gibi faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Karakaya & ark., 2013).

Elektriksel Stimülasyonun Tarihçesi

Elektriksel stimülasyonun tedavi amaçlı kullanımı yüzyıllar öncesine dayanmaktadır. Asırlar öncesinde, Romalıların, Antik Mısırlıların, ve Yunanlıların ağrı tedavisinde elektrik üreten balıkları kullanması buna bir delildir. Kruger parmaklardaki kontraktürleri açmak için elektrik akımı 1744 yılında ilk kez uygulamıştır. Jean Jallabert 1747 yılında bir hastanın paralize elini Leyden kavanozu ile elektriksel stimülasyonu kullanarak uyarmıştır (Malmivuo & Plonsey, 1995; Singh, 2005). Luigi Galvani 1790 yılında kurbağa kas ve sinirleri üzerine elektriğin etkilerini araştırdıkları çalışmaları ile kasın elektriksel uyarımla kasıldığını bulmuştur. Böylece ilk kez elektrik akımlarının kas kasılmalarına neden olduğu ve sinirlerin iyi

bir iletken olduğu keşfedilmiştir. Michael Faraday 1831’de akım üreten elektrik jeneratörü icat etti ve elektrik akımlarının aktif hareket oluşturmak için sınırları uyarabildiğini gösterdi (Doucet & ark., 2012). Onsekiz ve ondokuzuncu yüzyıllarda doğal elektriksel akımları üreten elektrik cihazları ile elektriksel uygulamalara başlanılmıştır. D.B. Duchenne, motor nokta ve kas hareketlerini bulan kişi, elektriksel uyarımla tedavinin fizyolojisini inceleyen “Elektroterapinin Temeli” adlı çalışmasını yayınlarken elektroterapinin gelişimine katkıda bulunmuştur. Elektriksel akımların rehabilitasyon ve tedavi amaçlı kullanımı üzerine yapılan çalışmalar yirminci yüzyılın başlarında artış göstermiştir. Kas fonksiyonu için elektriksel stimlasyonun kullanıldığı en eski klinik çalışmalardan biri, Liberson 1961 yılında taşınabilir elektrik stimülatörü ile felle ilişkili hemiplejisi olan hastalarda ayak düşmesini düzeltmek amaçıyla bacadaki peroneal siniri uyararak hastalarda yürüme sırasında fonksiyonel olarak ayak dorsifleksiyonu sağladığı çalışmadır (Liberson & ark., 1961). Bu çalışmada uygulanan elektriksel stimlasyon 1962 yılında 'fonksiyonel elektriksel stimlasyon' olarak adlandırılmıştır. Teknoloji alanındaki gelişmeler ile birlikte 1970’li yıllardan sonra daha kompleks FES sistemleri geliştirilmiştir. Çok kanallı FES sistemleri ile oluşan hareketin daha etkin olmasını sağlanmıştır (Marquez-Chin & ark., 2020). İlk kez 1964 yılında kas kasılmasını sağlayan 20-50 Hz frekanslarda uygulanan NMES’ten bahsedilmiştir (Valenti, 1964). Petrofsky ve ark. (1984) tarafından kapalı devre kontrollü, döngüsel kas stimülasyonunun kullanıldığı yürüme sistemi tanımlanmıştır. İmplant edilebilen FES elektrotları ve nroprotezlerle 1990’lı yıllarda yeni FES teknolojisinin geliştirilmesi ile elektriksel stimlasyon alanında ilerlemeler hala devam etmektedir (Marquez-Chin & ark., 2020).

Elektriksel Stimlasyonun Parametreleri

Elektriksel stimlasyon parametreleri: frekans (30-50 Hz), amplitüd (kasılma olan kadar artan, stimulusun yoğunluğu), akım süresi (1-300 msn), dalga formu (bifazik, monofazik), modülasyon (ritmik artan), uyarı ve dinlenme süresi, yükselme düşme süresi

şeklinde (Cooper & ark., 1973; Mysiw & Jackson, 2000). İnnervasyonu tam olan kasları aktive etmek için akım süresi, 1-300 msn'lik faz süreli stimülatörler kullanılır (McCulloch & Nelson, 1995). TENS için klinikte pratikte yaygın olarak kullanılan frekans ise 1-150 Hz'dir (Vance & ark., 2014). NMES ise genellikle 20-50 Hz frekansında kas kasılması üretir (Ni & ark., 2023). İstenilen kontraksiyon gerçekleşinceye kadar stimulusun yoğunluğu ya da amplitüdü, kademeli olarak arttırılır. Kas kasılması ile amplitüd arasında doğrusal olan bir ilişki bulunur (McCulloch & Nelson, 1995; Mysiw & Jackson, 2000). Bir stimülatörün uyarı ve dinlenme süreleri ayarlanabilir olmalıdır. Kas kasılması periyodunu dinlenme periyodu takip etmelidir. Yorgunluktan kaçınmak için tedavinin başlangıcında dinlenme süresi, uyarı süresinden daha uzun olmalıdır. Zaman içinde dinlenme süresi azaltılarak, akım geçiş süresi arttırılabilir. Yükselme-düşme süresi, her atım zincirinin sıfırdan maksimum amplitüde ya da yoğunluğa artış süresi ve buradan sıfır değerine düşüş süresidir. Kas kontraksiyonu, akım amplitüdünün azaldığı ya da arttığı durumlarda gerçekleşmektedir. Bu sebep ile akım yükselme süresinin kısa olması tercih edilir (McCulloch & Nelson, 1995; Pekindil, 2000).

Elektriksel Stimülasyon Çeşitleri

Elektriksel stimülasyonunun etkileri ve kullanım alanları, kullanılan dalga boyu formu, atım süresi ve uygulanan doku çeşiti gibi faktörlere göre değişiklik gösterir. Çeşitli farklı yöntem ve tekniklerle karakterize edilen elektroterapi, transkütan elektriksel stimülasyonu (TES) adı altında 1985 yılından beri yaygın şekilde kullanılmış; ancak bu terim altında, çeşitli farklı hastalıklarda, manyetik alanlar, TENS ve NMES dahil olmak üzere çok sayıda farklı modaliteleri içermiştir (Karakaya & ark., 2013). Günümüzde elektriksel stimülasyon çeşitleri, NMES, TENS ve FES şeklindedir (Ni & ark., 2023). NMES'in etkileri, derideki elektrik akımının, motor nöronu (veya doğrudan kası) depolarize etmek ve kas kasılmasını sağlamak için uygulanmasına dayanır. Bununla birlikte, TENS, esas olarak ağrı önleyici sistemlerin uyarılması ve endorfin salınımına dayanan analjezi için kullanılır (Buchner & Schildboeck,

2006). NMES, kasları güçlendirmek ve spastisiteyi önlemek amacı ile uygulanmaktadır. FES ise aktiviteyi düzeltmek için fonksiyonel amaç ile uygulanan kısmen daha düşük frekanslı elektriksel stimülasyonu modalitesidir (Keskin, 2012). FES ile NMES arasındaki fark; FES'in fonksiyon esnasında eş zamanlı ya da aralıklı olarak uygulanması olarak ta bildirilmektedir (Doucet & ark., 2012).

Nöromusküler Elektriksel Stimülasyon

Literatürde ilk kez 1964 yılında "fonksiyonel" amaçlar için kullanılabilir kas tetanisi ve kasılmasını oluşturmak için tipik olarak daha yüksek frekanslarda (20-50 Hz) elektriksel stimülasyon sağlayan NMES'ten bahsedilmiştir (Valenti, 1964). NMES'in kasları güçlendirme, kas atrofi ve dejenerasyonun önlenmesi, eklem hareket açıklığının korunması veya artırılması, spastisiteyi azaltma, kortikospinal sinir yollarının uyarılabilirliğini artırma ve nöroplastisiteyi artırma yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir (Boyacı, 2015; Kristensen & ark., 2021). NMES tedavisinin spinal ve kortikal mekanizmalar aracılığı ile motor yeniden öğrenmeyi sağladığı düşünülmektedir. Motor yeniden öğrenmede sıklıkla NMES, elektromiyografi aracılı NMES ve nöroprotezler şeklinde üç tip klinik uygulama yapılmaktadır. Terapötik NMES'te uygulama periyodu dışında da devam eden etkinliği elde etmek amaçlanır. Bu tedavi ile yetersizlikteki artışın engellenmesi, fonksiyonun artırılması ve ekstremiteler ya da organ sisteminde kullanılmamaya bağlı gelişen hareket kısıtlılığı engellenmeye çalışılır. Sonuç olarak, NMES genellikle ortopedik ve nörolojik rehabilitasyonda kullanım alanı bulmaktadır (Boyacı, 2015).

NMES, sağlıklı kasta ilgili kası innerve eden sinir liflerini, denerve kasta ise kas liflerini elektrik akımı ile uyararak kasılma oluşturma temeline dayanmaktadır (Tuncer, 2000). Sağlıklı kişilerde ve performans sporcularında kas dayanıklılığı ve kuvvetini, kardiyovasküler verimi, kan dolaşımını, toparlanma hızını, eklem hareket açısını arttırmak, ağrıyı, kas spazmlarını ve ödemi azaltmak, masaj etkisi yapmak ve performansı arttırmak amacı ile NMES kullanılmaktadır (Kaçaloğlu & Kale, 2019). NMES, fonksiyonel

veya terapötik hareketler oluşturmak için felçli veya paretik kasları aktive etmek için uygulanmaktadır (Jung & ark., 2009). NMES genellikle 20-50 Hz frekansında kas kasılması üretir ve hastanın fonksiyonunu iyileştirmek için kullanılır. NMES, hem periferik sinir hasarı olan hastalarda iskelet kası kütlesini ve fonksiyonunu eski haline getirmek için yaygın olarak kullanılır hem de sağlıklı bireylerde sinir sistemini aktive etmek için de uygulanır (Ni & ark., 2023). Ayrıca NMES'in, MSS hasarı olan ama periferik motor sinirlerinde problemi olmayan hastalarda, periferik sinir sistemi yoluyla kas dokusunun harekete geçirilmesi sağlanarak, kas kuvvetini arttırmak, istemli hareketi geliştirmek gibi fonksiyonel tedavi edici yararlı etkileri de bulunmaktadır (Karakaya & ark., 2013). Dolayısıyla NMES öncelikle omurilik hasarı ve inme nedeniyle kaybedilen uzuv motor fonksiyonunu restore etme aracı olarak kullanılmıştır. İnsanlarda, fonksiyonel manyetik rezonans görüntüleme kullanan çalışmalar, NMES kaynaklı eklem hareketinin, beyin hareketini, hiperkinetik harekete göre otomatik harekete daha yakın otomatik hale getirdiğini göstermiştir; dahası, tekrarlayan hareketin fonksiyonel haritayı yeniden düzenlemeye yardımcı olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, NMES, sadece fonksiyonu geri kazanmanın bir yolu değildir, aynı zamanda, klinik etkinlik olan motor fonksiyon eğitim aracı olarak da kullanılmıştır (Kanchiku & ark., 2015).

NMES sadece bir nöromotor yeniden tutma etkisi sağlamaya yardımcı olmakla kalmayıp aynı zamanda kas gücünü ve dayanıklılığını da artırabilir, böylece sinerjistik olarak başarılı iyileşme şansını artırabilir. NMES tedavisi ile teşvik edilen fonksiyonel davranışta gözlenen iyileşmelere, en azından kısmen, merkezi sinir sistemindeki moleküler plastisite aracılık edebilir. Çünkü periferik sinirlerin elektriksel olarak uyarılması, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) de dahil olmak üzere rejenerasyon ile ilişkili genlerin yükselişine neden olur (Jung & ark., 2009). Önceki çalışmalar, sinir elektriksel stimülasyonunun etkisinin bilhassa BDNF ve glial hücre kaynaklı nörotrofik faktörün (GDNF) gen ifadelerinin artışı ile elde edildiğini ileri sürmüştür (Ni

& ark., 2023). Deneysel alışmalar, ES'nin, sitokinleri eksprese etmek için sinir hucellerini aktive edebildiğini ve kasla ilgili yapısal proteinler arttırdığını sunmuştur (La & ark., 2019). Bununla birlikte, NMES kaynaklı noral plastisite ve iyileşmeye aracılık eden genel mekanizmalar belirsizliğini korumaya devam ediyor (Jung & ark., 2009).

Bilim adamları hala hayvan deneylerinde, NMES'in sinir rejenerasyonu ve kas atrofisinin önlenmesi üzerindeki etkisini ve mekanizmasını doğrulamak için rat siyatik sinir transeksiyonu ve onarım modelini kullanarak araştırmalarına devam etmektedir (Ni & ark., 2023). Nicolas ve ark. (2018), deneysel bir rat modelinde, motor korteks elektriksel stimülasyonunun yaralanma sonrası periferik sinir rejenerasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında motor korteks stimülasyonunun sinir rejenerasyonu ve kas reinervasyonu açısından yararlı bir etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Keane ve ark. (2022) tibial sinir transeksiyonu rat modelinde, sinir izogreft onarımı sonrası intraoperatif elektriksel stimlasyonun artan aksonal uyarılabilirlik, aksonal miyelin ve gelişmiş motor fonksiyonu ile motor noron rejenerasyonunu kolaylaştırdığını göstermiştir.

NMES'in avantajı, yaşlanmadan en çok etkilenen ve fonksiyonel aktivitedeki azalmadan sorumlu olan tip II lifleri aktive edebilmesidir. Yüksek frekanslı sürekli NMES'in dezavantajı kolay kas yorgunluğuna neden olmasdır (Ni & ark., 2023).

Transkutanöz Elektriksel Sinir Stimlasyonu

Kas kasılmasını tetiklemeden duyuusal aksonları aktive etmek için küçük bir akım kullanan elektriksel stimlasyona TENS denir (Ni & ark., 2023). TENS, ağrıyı hafifletmek için invaziv olmayan, ucuz, kendi kendine uygulanan bir tekniktir (Johnson, 2007). TENS için klinikte pratikte yaygın olarak kullanılan frekans 1-150 Hz'dir (Vance & ark., 2014). TENS'in yüksek ve düşük frekans modları vardır. Düşük frekanslı TENS, 10 Hz veya daha düşük darbeli akımların sağlanması olarak tanımlanır. Yüksek frekanslı TENS, TENS cihazlarındaki maksimum ayara (tipik olarak 150–200 Hz)

kadar 10 Hz'den fazla frekansları tanımlamak için kullanılır. TENS genellikle ağrı, spastisite ve idrar kaçırma tedavisinde kullanılır (Johnson & ark., 2022).

TENS teknikleri arasında geleneksel TENS, akupunktur benzeri TENS ve yoğun TENS yer alır. Genelde ilk etapta konvansiyonel TENS kullanılır. Geleneksel TENS'in amacı, merkezi sinir sisteminde segmental düzeyde nosiseptör hücre aktivitesini ve duyarlılığı azaltmak için büyük çaplı, zararlı olmayan aferentleri seçici olarak aktive etmektir. Geleneksel TENS ile ağrının hafifletilmesi, başlangıç ve bitiş açısından hızlıdır ve hasta, elektrotların altında güçlü ancak ağrısız bir parestezi deneyimlediğinde maksimum düzeye ulaşır. Bu nedenle hastaların gün boyu TENS uygulamasına ihtiyaçları olabilir (Johnson, 2007).

Rehabilitasyonda TENS, duyuusal geri bildirim geliştirmek ve sinir ağı yollarını ayarlamak için kullanılır. Duyusal geri bildirim, bir eylemin tamamlanmasında önemli bir rol oynar. Motor sinir hasar gördüğünde ve hareket edemediğinde, duyu siniri, motor sinir iyileşene kadar kas atrofisini önlemek için geçici olarak kası innerve edecektir (Adidharma & ark., 2022). TENS, vücudun hareketi için önemli olan duyuusal geri bildirim geliştirebilir. Ağrı, hastaların en belirgin şikayetçi olduğu ve günlük yaşamlarını en çok etkileyen duyuusal bozukluklardan biri olup aynı zamanda en subjektif duyuusal bozukluktur (Vance & ark., 2014). Düşük bir frekansta veya ultra yüksek frekansta ağrıyı hafifletmek amacıyla klinikte uygulanan TENS için frekans ise 2-10 Hz'dir (Ni & ark., 2023). Klinik deneyim, sistematik incelemeler çelişkili olmasına rağmen, TENS'in akut ağrı için farmakoterapiye yardımcı olarak faydalı olabileceğini düşündürmektedir. Klinik deneyim ve sistematik incelemeler TENS'in kronik ağrı için faydalı olduğunu göstermektedir (Johnson, 2007).

TENS göğüs kafesinin cerrahi müdahale ile açılması işlemi, torakotomi, yapılan hastalarda ağrı kesicilerin kullanımını azaltacak, aynı zamanda ağrı kesici etkiyi güçlendirecek farmakolojik olmayan yöntemlerden biri olarak kullanılmıştır (Yüceer, 2013). Birçok

klirik çalışma, implante edilen TENS'in periferik sinir hasarının neden olduğu inatçı ağrıyı azaltarak ve önleyerek önemli bir iyileşme sağladığını göstermiştir (Ni & ark., 2023). Tonye-Geoffroy ve ark. (2021) TENS uygulamasının 3 aydan uzun süren yaşamı ciddi şekilde etkileyen periferik sinir ağrısı da dahil olmak üzere kanser dışı ağrıları olan hastaları iyileştirdiğini ve 6 aylık tedavide hastaların %40'ında ağrıda iyileşme grldğun bildirmiştir. Torasik ve abdominal ameliyatlardan sonra TENS uygulamasının torasik ve abdominal cerrahi sonrası ağrıları %60-80 oranında azaltmasına ile öksürmenin kolaylaşmasına, atelektazi oranının %50'den %14'e düşmesine neden olması ile akciğere ilişkin komplikasyonların azalttığı, akciğerin vital kapasitesini arttırdığı, tedaviye (göğüs fizyoterapisine) uyumu kolaylaştırarak solunumu rahatlattığı belirlenmiştir (Yüceer, 2013). TENS uygulaması birçok cerrahi girişimden sonra, doğumda ve çeşitli hastalıkların yol açtığı akut ve kronik ağrıların tedavisinde etkili olduğu için kullanımı güvenilir bulunmaktadır.

TENS son zamanlarda merkezi sinir sistemi bozukluğu olan hastalarda spastisiteyi iyileştirmekte de kullanılmaktadır (Jung & ark., 2017; Havuç & ark., 2018). Bununla birlikte, dşuk frekanslı TENS genellikle duyuusal sinirleri hedef alır ve görünür kas kasılması oluşturmaz (Ni & ark., 2023). TENS, felçli hastalarda anormal germe refleksi aktivitesi üzerine kısa süreli engelleyici etkiye sahiptir. Ayrıca felçli hastalarda egzersiz yaptırılarak ya da egzersiz yaptırılmadan TENS'li eğitimlerde spastisitenin azaldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Jung & ark. 2017; Havuç & ark., 2018). Cho ve ark. (2003), kronik felçli hastalarda gastrokinemius kasına fizik tedavi yapılmasından sonra TENS uygulaması ile TENS'in kronik felçli hastalarda dengede durmayı arttırdığını ve spastisitenin azalmasında etkisi olduğunu bildirmiştir. Pape ve ark. (1993), altı serebral palsili çocuğa altı ay boyunca geceleri dşuk yoğunlukta TENS uygulamışlardır. Altı ay sonra yapılan değerlendirmede, çocukların kaba motor, denge ve lokomotor yeteneklerinde oldukça anlamlı gelişmeler olduğunu ve TENS'in standart rehabilitasyona ilave olarak uygulanmasının yararlı olacağını ifade etmişlerdir.

TENS periferik sinir hasarının neden olduğu inatçı ağrıların tedavisinde iyi bir etkiye sahiptir ve noninvaziv veya minimal invaziv TENS'in hastalar tarafından kabul edilmesi kolaydır (Ni & ark., 2023). Çok az yan etkisi vardır ve doz aşımı potansiyeli yoktur, bu nedenle hastalar tedaviyi gerektiği gibi ayarlayabilir (Johnson, 2007). TENS'in dezavantajları etkisinin kısa olması ve duyarlılığın azalması nedeniyle yaşlıların gençlere göre daha az etkili olmasıdır (Ni & ark., 2023).

Fonksiyonel elektriksel stimülasyon

FES, elektriksel stimülasyonun fonksiyonel ve amaçlı hareketlere yardımcı olduğu bir NMES alt tipi olarak düşünülmektedir (Marquez-Chin & ark., 2020). FES, fonksiyonel iyileşme sağlamak için kasların veya sinirlerin elektriksel stimülasyondur (Ni & ark., 2023). FES, aktiviteyi düzeltmek için fonksiyonel amaçla uygulanan düşük frekanslı elektriksel stimülasyon modalitesidir (Dursun & Dursun, 1995). Tam implante, perkütan stimülasyon ve yüzey stimülasyonu olarak adlandırılan üç tip FES yöntemi vardır (Popovic & ark., 2002). FES temel olarak alt ekstremitelerin yürüme fonksiyonuna ve üst ekstremitelerin parmak kavrama fonksiyonuna odaklanır, aynı zamanda kasların kasılma ve aktivasyon düzenleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Monaghan & ark., 2010).

FES, başlangıçta hedef kasın hareket oluşturmak için uyarıldığı ve bir sonraki adımın esneme ve üst ekstremitenin nesneyi kavramasını (parmak kavrama) veya ayakta durma, denge, duruş ve yürüyüş gibi alt ekstremit fonksiyonlarının restorasyonunu içerir (Ni & ark., 2023). FES klinik uygulamalarında kaslar ve kasılma sıraları, istenen hareketi üretecek şekilde özel olarak seçilir. Belirli bir hareketi kolaylaştıran bir FES sistemine genellikle nöroprotez veya motor nöroprotez adı verilir. Örneğin kavramaya yönelik bir nöroprotez, nesnelere kavrama yeteneğini geri kazandıran bir FES sistemidir. Diğer örnekler arasında ayakta durmaya, yürümeye, uzanmaya, uzanmaya ve kavramaya yönelik nöroprotezler yer alır (Marquez-Chin & ark., 2020). FES, sinir sistemi bozukluklarına

bağlı paralizli kas veya kas gruplarını kontrol eden periferik sinirlerin alçak frekanslı akımlarla uyarılması ile lökomotor sistem bozukluğunu gidermeyi ve motor fonksiyonu geliştirmeyi sağlayabilir (Chae & ark., 2005; Dursun & Dursun, 1995). Tedavide vücuda yayılmadığından yüzey uyarımı şeklinde olan FES tipi tercih edilir. Yüzey uyarımı şeklinde olan FES tipinde, akım yüzey elektrotları, ciltte stabilite ve elektrot yüzeyinde eşit akım dağılımı sağlayan biyoyumlu jeller kullanır. Geleneksel yüzey elektrotları cilde yakın büyük kasları innerve etmek için uygundur (Miller & ark., 2017). Fonksiyonel elektriksel stim lasyonu uygulayabilmek için alt motor nöronlar,  n boynuzdan hedef kastaki nöromuskuler kavşağa kadar sağlam olmalıdır. Motor bozuklukta multiple kasta koordineli kontraksiyonlar meydana getirir ve doğrudan fonksiyon oluşturur. Bu sebeple, inme, omurilik yaralanması, serebral palsi, travmatik beyin hasarı ya da multipl skleroz gibi üst motor nöron hastalıklarında tercih edilir. Paralizli kaslarda kas aktivasyonunu engelleyerek elde kavrama ve bırakma, yürüme, ayakta durma, mesane ve barsak fonksiyonlarını düzenleme, solunum ve seksüel fonksiyonları iyileştirme gibi amaçlarla rehabilitasyonda kullanılmaktadır (Knutson & ark., 2014). FES,  st motor nöron lezyon olan kişilerde günlük yaşam aktivitelerinde performansı arttırmak ya da ekleme fonksiyon sağlamak amacı ile paralize kası hareket bütünlüğü ile uyumlu şekilde aktifleştirmek için kullanılan NMES'tir. FES motor aktivite organizasyonunu kapsayan mekanizmaları etkileme olasılığı olduğu için, çocuklara göre yetişkinler tedaviye daha az uyum sağlar (Korkmaz & ark., 2016).

Hemiplejik hastalarda, ayağın dorsifleksör kaslarının paralizileri ya da baldır kaslarının spastisitesi, yürürken ayağın düşmesine sebep olur. Ayağın dorsifleksör kaslarına elektriksel uyarım ile tetanik kasılma sağlanarak, ayak düşmesi engellenebilir (Ersöz, 2001). Literatürde inmeli hastalarda düşük ayağın tedavisinde kullanılan, konvansiyonel rehabilitasyon tedavisine ek olarak FES uygulaması yapılmasının, hastanın motor fonksiyon, ambulasyon, denge, postural kontrol, yürüme paterni, yürüme hızı ve ritmi ile fiziksel yetersizlik ve günlük yaşam aktiviteleri

bakımından olumlu sonuçlara neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda konvansiyonel rehabilitasyona ek olarak FES uygulamalarının, yürümenin adım sayısı, yürüme süresi ve hızına etkili olduğu rapor edilmiştir (Mesci & ark., 2007; Yavuzer & ark., 2006,).

FES, klinisyenlerin felç veya omurilik yaralanması geçirmiş bireylerin ayakta durma, yürüme, uzanma ve kavrama yeteneklerini yeniden kazanmalarına yardımcı olmak için kullanabileceği önemli bir terapötik müdahaledir (Marquez-Chin & ark., 2020). FES'in avantajı, bir sinir veya kasın hedeflenen uyarılmasının farklı motor fonksiyonlar için stabil etkiler üretebilmesidir. Ancak ES aletini uzun süre takmak rahatsızlık vericidir. Uzun süreli FES kas yorgunluğuna neden olabilir ve duyarlılığı azaltabilir (Ni & ark., 2023).

Veteriner Hekimliğinde Elektriksel Stimulasyon

Hayvan fizyoterapisini geliştirmek için dünya çapında artan bir ilgi vardır. Hayvan fizyoterapisi veya fizik tedavi yöntemleri hayvanlara uygulanan standart veteriner hekim tedavileridir. Hayvanlarda kullanılan fizyoterapi çeşitleri: termal terapi (sıcak, soğuk), hidroterapi, egzersiz yapmak, statik veya titreşimli manyetik alanların kullanımı, lazer terapi, terapötik ultrason, masaj terapisi ve elektroterapidir (Buchner & Schildboeck, 2006).

Küçük hayvan fizyoterapisinde elektriksel stimülasyon temel olarak ağrıyı hafifletmek veya kas ve/veya sinir fonksiyonunu uyarmak amacıyla kullanılmıştır (Bockstahler & ark., 2004, Prydie & Hewitt, 2015). Veteriner hekimlikte elektriksel stimülasyon için kullanılan cihazlar genellikle dokuz voltluk bir pil ile çalışan küçük taşınabilir ünitelerdir. Cihaz, elektrotlara giden bir veya iki güç kablosuna sahiptir. Daha iyi donatılmış cihazlar, hem ağrıyı azaltma hem de kas stimülasyon işlevi bulunmaktadır (Samoy & ark., 2016).

NMES, sağlam bir sinir kullanarak bir kas veya siniri uyarmak için kullanılan elektrik akımıdır (Bockstahler & ark., 2004). Nöromusküler üniteye elektriksel bir impuls verilmesi, daha hızlı tip

II kas liflerinin ilk kasılmasına, ardından yavaş tip I kas liflerinin kasılmasına neden olur. NMES kaynaklı bir kas kasılmasının gücü, istemli bir kas kasılmasınınkinden daha düşüktür, ancak çoğu zaman, yaralanma veya ameliyat sonrası maksimum bir istemli kas kasılması imkansızdır veya istenmemektedir. Bu gibi durumlarda NMES, kas fonksiyonunun korunmasına ya da geçerliliğine yardımcı olabilir. NMES ve TENS, insanlarda bir dizi ortopedik ve nörolojik durumda kullanılmıştır ve birçok durumda standart bakım planı olmuştur. Ancak veteriner hekimlik alanındaki araştırmalar hala sınırlıdır ama umut vericidir. (Millis & Levine, 2014). Johnson ve ark. (1997) zayıf diz eklemi ve kranial çapraz bağlarında problemi olan köpeklerin cerrahi olarak tedavisi ile NMES rehabilitasyonu sonrası daha düşük derecede topallık ve osteoartrit olgusunu gözlemlendiğini rapor etmiştir. TENS, özellikle ağrı kontrolü için kullanılan bir tür elektriksel stimülasyondur (Bockstahler & ark., 2004). Köpeklerde, osteoartritin tedavilerinde amaç hedef eklem ağrısını azaltmak ya da önlemek, enflamasyonu gidermek, doku dejenerasyonunu engelleme, doku rejenerasyonunu sağlamak ve kondrositlerin anabolik aktivitelerini arttırmaktır. Osteoartrit tedavisinde bahsedilen amaçlara ulaşmak için tek bir tedavi yöntemi yerine özellikle TENS ile modifiye tedavi yöntemlerinin uygulanmasının daha etkili olduğu bildirilmektedir (Johnston & ark., 2005). Levine ve Millis (2002), TENS'in beş osteoartritlik köpekte diz eklemi üzerindeki etkisi kuvvet plakası değerlendirmesi ile değerlendirildiğinde iyileşmenin olduğunu sunmuşlardır. Mlacnik ve ark. (2006) farklı tip topallıkları bulunan köpeklerde fizyoterapi olarak TENS ile kilo vermenin etkisini araştırdıkları çalışmada TENS'li köpeklerin, TENS uygulanmayan köpeklerden daha hızlı kilo vermekle kalmayıp aynı zamanda daha iyi ağırlık taşıdıklarını (kuvvet plakası ile doğrulanmış) gösterdikleri görülmüştür.

Atlarda elektriksel stimülasyonun oluşturduğu hareketi ölçen çalışmalar nadirdir. Riedler ve ark. (2020) atlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında atlara elektriksel stimülasyonu, atların lumbosakral bölgesine yerleştirilen altı elektrot (omurganın her iki yanında üç adet) içeren bir sırt tedavi pedi (FES310 sistemine ait) aracılığıyla

uyguladı ve bu sistem, kademeli olarak maksimum 10 volta yükseltilen, dikkörtgen dalga biçiminde darbeleri, iki fazlı bir elektrik uyarımı üretti. Bu çalışma sonucunda, elektriksel stimülasyonun atlarda önemli gövde ve arka bacak hareketlerine neden olduğu ortaya konulmuştur.

Atlarda kas-iskelet sistemi yaralanmalarının fiziksel rehabilitasyonu oldukça önemlidir (Bergh & ark., 2010). Atlarda görülen sırt ağrısı, sırt ağrısı çözüldükten sonra bile epaksiyal kaslarda atrofi ve işlev bozukluğuyla sonuçlanan dengesiz bir omurlar arası durumu potansiyel olarak başlatabilir (Lucas & ark., 2022). Lucas ve ark. (2022) yaptıkları bir çalışmada, atlarda multifidus kasının güçlendirilmesini teşvik etmek için 7 haftalık NMES tedavilerinin faydalı olduğunu ve atlarda omurga stabilizasyonunu iyileştirmek için bir sırt rehabilitasyon tedavi programı sırasında NMES'in tedavi ile birleştirilebileceğini sunmuştur. NMES'in, atlarda rehabilitasyon sırasında kas gücünü artırmak veya korumak için kullanıldığı bilinmektedir. Bununla birlikte, NMES'in atlarda sık kullanılmasına rağmen, tam etkinliğini açıklayan çalışmalar olmadığı bilinmektedir (Bergh ve ark. 2010). Bergh ve ark. (2010) atlarda NMES protokolünün lif tipleri ve alanları, glikojen konsantrasyonları ve enzim aktiviteleri (sitrat sentaz, 3-OH-asil CoA dehidrogenaz, heksokinaz ve laktat dehidrogenaz) üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla, 6 sağlıklı eğitim görmemiş Standardbred atın M. gluteus medius ve M. longissimus dorsi kaslarının bulunduğu tek bir bölgeye NMES günde 50 Hz'de 21-39 mA ile 45-60 dakika boyunca, haftada 5 gün 4 hafta boyunca uygulanmıştır. Sağlıklı atlarda kas lifi tiplerinde, lif alanlarında, glikojen içeriğinde veya enzim aktivitelerinde önemli değişikliklere neden olmadığını bildirmişlerdir. Daha yoğun ve/veya uzun süreli NMES tedavi protokollerinin sağlıklı atların kasları üzerindeki etkisini ve stimülasyon protokollerinin atrofiye edilmiş kaslarda pozitif değişiklikler meydana getirip getirmediğini açıklamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanaatine varmışlardır. Ayrıca tekrarlayan laringeal sinir yaralanması olan atlarda tedavi amaçlı FES uygulaması ile yapılan bir çalışmada, 20

haftalık ES'den sonra ipsilateral posterior krikoaritenoid kasına FES implante edildiğinde, tedavi sonrası FES'in bu atlarda kas gücünü ve laringeal fonksiyonu iyileştirdiği bildirilmiştir (Cercone & ark., 2019).

Veteriner hekimlikte elektriksel stimülasyon sadece terapi amaçlı değil aynı zamanda gıda sektöründe karkas et kalitesinin iyileştirilmesi amacı ile de kullanılmaktadır. Elektriksel stimülasyon, et kalitesinin iyileştirilmesi için yeni kesilen ve iç organları çıkarılan karkasa uygulanır. Ete elektriksel stimülasyon uygulaması ile kan damarlarının kasılması ve iyi bir kan akışının sağlanması sonucunda açık ve parlak renkli et elde edilir ve etin bu rengi korunur. Elektriksel stimülasyonu uygulama ile karkas etlerin kalitesi üzerine yapılan çalışmalar, etin gevrekleşmesinde elektriksel stimülasyonun etkin rolü olduğunu bildirilmektedir. Elektriksel stimülasyon uygulamalarının, kaslarda glikolizisi hızlandırarak soğuk kasılmasının oluşumunu durdurduğunu ve duyuşsal özellikleri iyileştirdiği ve et kalitesini arttırdığı sunulmuştur. Elektriksel stimülasyonun, etin olgunlaşması üzerinde olan etkisi ile ilgili üç çeşit teori vardır. Birinci teori; elektriksel stimülasyon uygulanan kasların pH'sı kısa sürede 5.7-5.9'a kadar düşer. Böylece soğuk kasılması riski ortadan kalkar. İkinci teori, elektriksel stimülasyon uygulanan karkasların sıcaklığı arttığında pH'sı hızlı bir düşüş gösterir. Bu durumda katepsin gibi lizozomal enzimler aktifleşerek, proteinlerin denatürasyonuna neden olur ve doğal hızlı bir olgunlaşma oluşur. Üçüncü teori ise, elektriksel stimülasyon kas formasyonunu fiziksel olarak bozarak, hücre boşluklarına serbest kalsiyum salınımını artırır. Sonuç olarak elektriksel stimülasyon, etlerde postmortem glikolizisi ve rigor mortisi hızlandırır. Böylece hızlı pH düşüşü ile birlikte bir taraftan kasların kontraksiyonu ile karakterize potansiyel bir et kalitesi problemi olan soğuk kasılması riski ortadan kalkar. Diğer taraftan da protein denatürasyonunu da arttırarak hızlı bir olgunlaşma gerçekleşir. Elektriksel stimülasyon uygulamasının etlere etkisine yönelik araştırmalar ilk kez 1940'lı yıllarda Amerika'da yapılmıştır. Avustralya, Hollanda, İrlanda, Yeni Zelanda gibi ülkeler de 1976 yılından itibaren günümüze kadar

elektriksel stimölasyon sistemlerinin ette kullanımı sonrasında et gevrekliğini belirgin olarak arttırdığını rapor eden araştırmalar sunmuştur. Sonuç olarak, çeşitli hayvan türlerine ait etlerin kalitesinin ve bilhassa gevrekliğinin arttırılmasında etlere elektriksel stimölasyon uygulamasının etkin bir yöntem olduğu öne sürölmüştür (Kahraman & ark., 2006, Temelli, 2009).

Tıp Hekimliğinde Elektriksel Stimölasyon

Elektriksel stimölasyon, kas iskelet sistemi fonksiyonunun korunması ve geliştirilmesi açısından önemli bir yere sahiptir (etin & ark., 2018). Elektriksel stimölasyonun normal kasın seçici olarak güçlendirilmesinde, kasın kontraksiyonu ve duyuusal değişikliğinin oluşturulmasında, immobilizasyonla ilişkili kas atrofisinin önlenmesinde, dokuyu iyileştirmede ve ödem azalmasında etkili olduğu gösterilmiştir (Karakaya & ark., 2013; Lake, 1992). Ryan ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada, quadriceps femoris kasına elektriksel stimölasyon uygulaması ile manyetik rezonans görüntüleme ölçümlerinde quadriceps femoris kasının enine kesit alanında %35 artma ve kas mitokondriyal kapasitesinde %25 artış olduğunu, ayrıca felçli kasa onaltı haftalık elektriksel stimölasyona bağlı direnç eğitimi uygulanması sonucu kas kütlelerinde de artış olduğunu bildirmiştir. Spinal kord yaralanması olan hastalarda terapatik ve fonksiyonel çeşitli amaçlı elektriksel stimölasyonu kullanılmaktadır. Spinal kord yaralanmalarında hastaların fizyoterapi ve rehabilitasyonunda elektriksel stimölasyon, kas kuvvetinin arttırılması, enduransın geliştirilmesi, bası yaralarının azaltılması, mesane fonksiyonlarının geliştirilmesi, kardiyovasküler enduransın arttırılması, mitokondriyal biyogenezisi ve oksidatif fosforilasyonu sağlamaktadır (etin & ark., 2018). Dudley ve ark. (1999), omurilik hasarı olan hastaların tedavisinde NMES uygulaması ile birlikte ilerleyici dirençli egzersizlerin yapılmasının, haftada iki gün sekiz hafta gibi kısa bir sürede, quadriceps femoris kası atrofisini engellediğini rapor etmiştir.

Gordon ve ark. (2010) akut kısa düşük frekanslı (20 Hz) elektriksel stümölasyonu şiddetli karpal tünel sendromlu hastalarda

ameliyat sonrasında nörolojik fonksiyonu iyileştirmek için kullandıklarında, elektrisel stümülasyonun aksonal rejenerasyonu desteklediğini ve kas renaervasyonunu hızlandırdığını göstermiştir. Bununla birlikte, aşırı elektrisel stimülasyon kas yorgunluğuna neden olabilir ve sinir iyileşmesini artırıcı etkisini zayıflatabilir (Ni & ark., 2023). Vanderthommen ve ark. (2007) kısa aralıklı elektrisel stümülasyonun en iyi seçenek olduğunu ve yüksek frekanslı akımların erken kas yorgunluğuna neden olduğunu öne sürdü. Kas elektrisel stümülasyonu ile sinir elektrisel stümülasyonu karşılaştırması yapılan çalışmalarda, elektrisel sinir stimülasyonunun elektrisel kas stimülasyonuna göre hem daha rahat olduğunu hem de kas yorgunluğuna daha az neden olduğunu sunmuştur (Inns & ark., 2021).

Elektrisel stümülasyonun bilimsel olarak biyostimülasyon özelliği bulunduğu, yangıyı önlediği, ağrı kesici etkisi olduğu, bağışıklık sistemini aktifleştirdiği, neovaskülarizasyonu sağlayarak kan dolaşımını düzenlediği, lenf akımını arttırdığı ve metabolizmayı düzenlediği kanıtlanmıştır (Keskin, 2012). Elektrisel stimülasyon ile kasların aerobik ve anaerobik kapasitelerinde de değişiklik olmaktadır. Sürekli, düşük frekanslı elektrisel stimülasyon, glukozun oksidasyonu ve fosforilasyonu için ihtiyaç duyulan enzimlerde artışa neden olmakta, kasların glukoz tüketimi artmakta, laktik asit birikimi azalmakta ve yorgunluk gecikmektedir. Bu metabolik değişimler, aynı zamanda kan akımı ve oksijen tüketimini de arttırmaktadır (Mysiw & Jackson, 2000). Bununla birlikte, terapötik elektrisel stimülasyonu olarak bilinen eşik elektrisel stimülasyonu, düşük düzeyde ve kontraksiyon oluşturmadan elektrisel stimülasyonunun evde ve uykuda sürekli verilmesi ile, uyku sırasında hormon sekresyonunun yükseldiği, kan akışını hızlanması ile kas hacminin arttığı da bildirilmektedir. (Merrill, 2009).

Elektromyostimülasyon sporcular için bir kuvvet antrenman metodu olarak yaklaşık 30 yıldır uygulanmaktadır. Elektromyostimülasyon uygulamalarının yüzme, basketbol, voleybol, buz hokeyi, ragbi, tenis, futbol, jimnastik, atletizm, halter,

kayaklı koşu gibi birçok farklı spor dalında sportif performansı arttırma üzerine etkileri ile ilgili araştırmalar devam etmektedir. Yüksek frekanslı kısa süreli bir elektromyostimölasyon yöntemiyle üst düzey sporcularda hızlı ve anlamlı derecede kuvvet kazanımları sağlanabileceği bildirilmektedir. Bunun dışında, elektriksel stimölasyonun, bilhassa sporcuların sakatlık sonrası, ilgili kaslarına uygulanan elektriksel uyarımlar ile rehabilitasyonları sonucunda, kas kuvvetlerinin geri kazanılmasında, uzun süren hareketsizlik dönemlerinde kas kütlelerinde ve kas kuvvetinin devamlılığını sağlamada, ileri yaşlarda ortaya çıkan kas atrofilerinden korunmada, kas aktivasyonunu kolaylaştırmada önemli rol oynadığı bilinmektedir (Kaçoğlu & Kale, 2019).

Spastisite, kasın pasif harekete karşı fizyolojik direncindeki artış olarak tanımlanmaktadır. Spastisitenin azaltılması amacı ile spastik kasa elektriksel stimölasyon uygulanması, elektrik akımının kas kasılmasını ve duyuşal değişiklik oluşturarak, ödemi azaltmak, doku iyileşmesini hızlandırmak amacı ile kullanımını kapsar. Uygun şiddet ve atım durasyonu ile elektrik, siniri depolarize ederek ağrıyı azaltma, kas kuvveti ve kontrolünü arttırmaya yönelik duyuşal veya motor cevapları oluşturabilir (Havuç & ark., 2018). Spastisite tedavisinde elektrikselsel stimölasyon uygulamaları NMES, FES, TENS şeklinde yapılabilmektedir. Agonist kasa uygulanan elektriksel stimölasyonu, yorgunluk oluşturarak, golgi tendon organını uyarıp gevşeme sağlayarak spastisiteyi azaltır (Karakaya & ark., 2013).

Klinik çalışmalar, elektriksel stimölasyonun sinir onarımı sırasında akson büyümesini arttırdığını ve duyuşal motor iyileşmesini hızlandırdığını göstermiştir (Ni & ark., 2023). Elektrikselsel stimölasyon, spastik paralizinin egemen olduğu inme, serebral palsi, omurilik lezyonları gibi çeşitli merkezi sinir sistemi hastalıklarında spastisitenin azaltılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Ersöz, 2001). Havuç ve ark. (2018), spastik serebral palsili çocuklarda elektriksel stimölasyon uygulamasının, gastrokinemius kasının kas tonusu, elastisite ve sertlik üzerinde iyileştirici etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Qi ve ark. (2017) 100

spastik serebral palsili çocuk hastayla yaptıkları çalışmada güçlendirme egzersizleri ile birlikte, ayak bileği ekstansörleri üzerine yerleştirilen elektrotlar ile akım yoğunluğu kasılma oluşana kadar altı hafta ve haftada beş gün, elektriksel stimülasyon uygulanmasının spastisitede daha etkili iyileşmeye neden olduğunu rapor etmiştir. Yıldızgören ve ark. (2014), tek taraflı serebral palsili hastalarda yaptıkları çalışmada bütün gruplara konvansiyonel egzersiz, statik volar el bileği ortezi altı haftada beş gün uygulamışlardır. Bir gruba bu tedavilere ek olarak el bileği ekstansör kaslarına NMES 30 dakika uygulanmıştır. Konvansiyonel tedaviye ek olarak elektriksel stimülasyon uygulanan grupta aktif el bileği hareket açıklığında, spastisitede ve el fonksiyonlarına ilerleme daha etkili bulunmuştur. Pehlivan ve Armağan (2011) hemiparezik üst ekstremitede, omuz sublüksasyonunu önlemek, el ödemi azaltmak, motor ve fonksiyonel iyileşmeyi hızlandırdığı ve spastisiteyi azalttığını bildirmiştir.

Bazı merkezi sinir sistemi hastalıklarında spastisite gelişimine ve spastisiteye ilaveten yumuşak dokularda kontraktür gelişen olgularda eklem hareket kısıtlılığı meydana gelmektedir. Turczynski ve ark. (1984), elektriksel stimülasyonun özellikle orta veya ciddi derecede spastisitesi olan hastalarda, eklem hareket açıklığının korunmasında ve tedavisinde rapor etmiştir.

Literatürde elektriksel stimülasyon tedavisinin yara iyileşmesinde yararlı etkileri olduğu ve yara iyileşmesini hızlandırdığı sunulmuştur (Balakatounis & Angoules, 2008; Demir & ark., 2004; Mehmandoust & ark., 2007). Demir ve ark. (2004), elektriksel stimülasyonunun, yara tedavisi amacı ile kullanımında, yaranın iltihap, çoğalması ve olgunlaşması aşamalarında, nitelikli ve erken skar oluşumunda etkili olduğunu rapor etmiştir. Mehmandoust ve ark. (2007) yara iyileşmesi üzerine elektriksel stimülasyonu uygulamasının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, grupları karşılaştırdıklarında elektriksel stimülasyonu uygulanan grupta yara yüzeyinde azalma yüzdesinde ve yara kapanma oranında artış olduğunu bildirmiştir.

Sonuç

Elektriksel stimölasyon, sağlıklı insanlarda ve hayvanlarda kas eğitiminde atletik performansı artırmaktadır. Hekimlikte elektriksel simölasyonunun diagnostik, tedavi ve fonksiyonel amaçlı kullanımı bulunmaktadır. Elektriksel stimölasyonun ortopedik ve nörolojik rehabilitasyonda tedavi amaçlı kullanımı yaygındır. Nörolojik ve kas iskelet sistemi ile ilgili rahatsızlıkları olan hastalarda, hastaların fonksiyonlarını geliştirmek için de potansiyel olarak kullanılmaktadır. Elektriksel stimölasyonun periferik sinir hasarının nörolojik iyileşmesini hızlandırabileceğine, ağrıyı etkili bir şekilde giderebileceğine ve hastalarda kas kütlesini ve gücünü artırabileceğine ve hastaların gerçek durumuna göre uygun elektriksel stimölasyon yöntemlerinin ve parametrelerinin doğru bir şekilde seçilmesinin gerekli olduğuna inanılmaktadır. Sonuç olarak, insanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalara, kanıtlanmış klinik bulgulara dayanarak ve aynı zamanda tedavi etkinliğine bakılarak, elektriksel stimölasyonun iyi bir tedavi yöntemi olarak yüksek kullanım potansiyeline sahip olduğu düşünölmektedir.

KAYNAKÇA

Adidharma, W., Khouri, A. N., Lee, J. C., Vanderboll, K., Kung, T. A., Cederna, P. S., Kemp, S. W. P. (2022) Sensory nerve regeneration and reinnervation in muscle following peripheral nerve injury. *Muscle Nerve*, 66 (4), 384-396. Doi: 10.1002/mus.27661

Balakatounis, K. C. & Angoules, A. G. (2008) Low-intensity electrical stimulation in wound healing: review of the efficacy of externally applied currents resembling the current of injury. *Eplasty*, 8, e28.

Başar, G. (2006). *Hemiplejiye bağlı gelişen üst ekstremitte fleksör spastisitesinde elektrik stimülasyonun etkinliği*. Uzmanlık tezi, TC Sağlık Bakanlığı İstanbul 70. Yıl Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon 1. Klinik

Bergh, A., Nordlöf, H., Essén-Gustavsson B. Evaluation of neuromuscular electrical stimulation on fibre characteristics and oxidative capacity in equine skeletal muscles. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, 38, 671-675. Doi: 10.1111/j.2042-3306.2010.00180.x.

Bockstahler, B., Levine, D., Millis, D. L., Wandrey, S.O.N. (2004). In: B. Egner (editor). *Essential Facts of Physiotherapy in Dogs and Cats: Rehabilitation and Pain Management: a Reference Guide with DVD*. (First edit), Babenhausen: BEVet Verlag

Boyacı, A. (2015) Neuromuscular Electrical Stimulation. *Türkiye Klinikleri Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon - Özel Konular*, 8 (1), 44-50.

Buchner, H. H. & Schildboeck, U. (2006) Physiotherapy applied to the horse: a review. *Equine Veterinary Journal*, 38 (6), 574-580. Doi: 10.2746/042516406x153247

Cercone, M., Jarvis, J. C., Ducharme, N. G., Perkins, J., Piercy, R. J., Willand, M. P., Mitchell, L. M., Sledziona, M., Soderholm, L., Cheetham, J. (2019) Functional electrical stimulation

following nerve injury in a large animal model. *Muscle Nerve*, 59 (6), 717-725. doi: 10.1002/mus.26460

Chae, J., Triolo, R., & Kilmore, K. (2005). *Functional neuromuscular stimulation. physical medicine and rehabilitation principles and practice*, ed. J. Delisa and B. Gans. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.

Cho, H. Y., In, T. S., Cho, K. H., Song, C.H. (2013) A single trial of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) improves spasticity and balance in patients with chronic stroke. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 229 (3), 187-193. doi: 10.1620/tjem.229.187

Cooper, E. B., Jr Bunch, W. H., Campa, J. F. (1973) Effects of chronic human neuromuscular stimulation. *Surgical Forum*, 24, 477-479.

Çetin, H., Çetin, B., Yazar, C. (2018). *Sipinal kord yaralanmalarında rehabilitasyon: Elektrik stimülasyonu uygulamaları*, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon Bölümü, Ankara

Demir, H., Balay, H., Kirnap, M. (2004) A comparative study of the effects of electrical stimulation and laser treatment on experimental wound healing in rats. *Journal of Rehabilitation Research & Development*, 41 (2), 147-154. Doi: 10.1682/jrrd.2004.02.0147

Doucet, B. M., Lam, A., Griffin, L. (2012) Neuromuscular electrical stimulation for skeletal muscle function. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 85 (2), 201-215.

Dudley, G. A., Castro, M. J., Rogers, S., Apple, D. F. Jr. (1999) A simple means of increasing muscle size after spinal cord injury: a pilot study. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 80 (4), 394-396. Doi: 10.1007/s004210050609

Dursun, N. & Dursun, E. (1995). *Fonksiyonel nöromuskuler stimülasyon, Tibbi rehabilitasyon*, H. Oğuz, Editor. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri

Ersöz, M. (2001). *Spastik paralizilerde elektroterapi*, Tuna N, editor. *Elektroterapi*. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.

Gordon, T., Amirjani, N., Edwards, D. C., Chan, K. M. (2010) Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *Experimental Neurology*, 223 (1), 192-202. Doi: 10.1016/j.expneurol.2009.09.020.

Havuç, S., Aydeniz, A., Başaran S. (2018). Serebral palsili çocuklarda spastisitenin myotonometri ile değerlendirilmesi ve spastisitede elektrik stimülasyonun etkinliği. *Cukurova Medical Journal*, 43 (1), 56-62. Doi:10.17826/cumj.423848

Inns, T. B., McCormick, D., Greig, C. A., Atherton, P. J., Phillips, B. E., Piasecki, M. (2021) Factors associated with electrical stimulation-induced performance fatigability are dependent upon stimulation location. *Experimental Physiology*, 106 (4), 828-836. Doi: 10.1113/EP089204.

Johnson, J. M, Johnson, A. L., Pijanowski, G. J., Kneller, S. K., Schaeffer, D. J., Eurell, J. A., Smith, C. W., Swan, K.S. (1997) Rehabilitation of dogs with surgically treated cranial cruciate ligament-deficient stifles by use of electrical stimulation of muscles. *American Journal of Veterinary Research*, 58 (12), 1473-1478.

Johnson, M. (2007) Transcutaneous electrical nerve stimulation: Mechanisms, clinical application and evidence. *Reviews in Pain*, 1 (1), 7-11. Doi: 10.1177/204946370700100103

Johnson, M. I., Claydon, L. S., Herbison, G. P., Jones, G., Paley, C. A. (2017) Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for fibromyalgia in adults. *Cochrane Database of*

Systematic Reviews, 10 (10), CD012172. Doi: 10.1002/14651858.CD012172.

Johnson, M. I., Paley, C. A., Jones, G., Mulvey, M. R., Wittkopf, P. G. (2022) Efficacy and safety of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for acute and chronic pain in adults: a systematic review and meta-analysis of 381 studies (the meta-TENS study). *BMJ Open*, 12 (2), e051073. Doi: 10.1136/bmjopen-2021-051073

Johnston, K. D., Levine, P. T., Price, M. N., Schneider, N. H., Millis, D. L. (2005) *The effect of transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) on dogs with osteoarthritis of the stifle*, Conference Paper

Jung, K. S., In, T. S., Cho, H. Y. (2017) Effects of sit-to-stand training combined with transcutaneous electrical stimulation on spasticity, muscle strength and balance ability in patients with stroke: A randomized controlled study. *Gait Posture*, 54, 183-187. Doi: 10.1016/j.gaitpost.2017.03.007

Jung, R., Ichihara, K., Venkatasubramanian, G., Abbas, J. J. (2009) Chronic neuromuscular electrical stimulation of paralyzed hindlimbs in a rodent model. *Journal of Neuroscience Methods*, 183 (2), 241-254. Doi: 10.1016/j.jneumeth.2009.06.043

Kaçaloğlu, C. & Kale M. (2019) Elektrik kas uyarımlarının biyokimyasal, fizyolojik ve nöral mekanizması. *Spormetre*, 17 (1), 1-19.

Kahraman, T., Nazlı, B., Ergün, Ö. (2006) Elektrik stimülasyonunun et kalitesi üzerine etkileri, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32 (2), 23-30.

Kanchiku, T., Suzuki, H., Imajo, Y., Yoshida, Y., Moriya, A., Suetomi, Y., Nishida, N., Takahashi, Y., Taguchi, T. (2015) The efficacy of neuromuscular electrical stimulation with alternating currents in the kilohertz frequency to stimulate gait rhythm in rats

following spinal cord injury. *BioMedical Engineering OnLine*, 14, 98. Doi: 10.1186/s12938-015-0094-5

Karakaya, İ. Ç., Karakaya, M. G., Yılmaz, Ö. T. (2013) *İnme rehabilitasyonunda kullanılan elektrofiziksel ajanlar*. İçinde: Karaduman AA, Yıldırım SA, Yılmaz ÖT (Editörler). *İnme Sonrası Fizyoterapi ve Rehabilitasyon*. Ankara: Pelikan Yayıncılık

Keane, G. C., Pan, D., Roh, J., Larson, E. L., Schellhardt, L., Hunter, D. A., Snyder-Warwick, A. K., Moore, A. M., Mackinnon, S. E., Wood, M. D. (2022) The effects of intraoperative electrical stimulation on regeneration and recovery after nerve isograft repair in a rat model. *Hand (N Y)*, 17 (3), 540-548. Doi: 10.1177/1558944720939200

Keskin, Y. (2012). *Deneyisel yanık iyileşmesinde manyetik alan tedavisinin ve elektrik stimülasyonunun etkileri*. Uzmanlık Tezi, Edirne Trakya Üniversitesi

Knutson, J., Sheffler, L., Chae, J. (2014) *Fonksiyonel Nöromusküler Stimülasyon*. Ed. Frontera, W. Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon İlkeler ve Uygulamalar, İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri

Korkmaz, N. Ç., Kırdı, N., Meriç, A. (2016). *Fonksiyonel elektrik stimülasyonu*. İçinde: Şimşek, N. & Kırdı, N. (Editörler). *Elektroterapide Temel Prensipler ve Klinik Uygulamalar*, 2. Baskı, Ankara: Hipokrat Kitabevi

Kristensen, M. G. H., Busk, H., Wienecke, T. (2021) Neuromuscular electrical stimulation improves activities of daily living post stroke: A systematic review and meta-analysis. *Archives of Rehabilitation Research and Clinical Translation*, 4 (1), 100167. Doi: 10.1016/j.arrct.2021.100167

La, G., Zhou, M., Lim, J. Y., Oh, S., Xing, H., Liu, N., Yang, Y., Liu, X., Zhong, L. (2019) Proteomics and transcriptomics analysis reveals clues into the mechanism of the beneficial effect of electrical stimulation on rat denervated gastrocnemius muscle.

Cellular Physiology and Biochemistry, 52 (4), 769-786. Doi: 10.33594/000000054

Lake, D. A. (1992) Neuromuscular electrical stimulation. An overview and its application in the treatment of sports injuries. *Sports Medicine*, 13 (5), 320-336. Doi: 10.2165/00007256-199213050-00003.

Levine, D., Millis, D. (2002). *The effect of TENS on osteoarthritic pain in the stifle of dogs*. In: Proceedings of the Second International Symposium on Rehabilitation and Physical Therapy in Veterinary Medicine 14, Knoxville, TN

Liberson, W. T., Holmquist, M., Scot, D., Dolo, M. (1961) Functional electrotherapy: stimulation of the peroneal nerve synchronized with the swing phase of the gait of hemiplegic patients, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 42, 101-105.

Lucas, R. G., Rodríguez-Hurtado, I., Álvarez, C. T., Ortiz, G.(2022) Effectiveness of neuromuscular electrical stimulation and dynamic mobilization exercises on equine multifidus muscle cross-sectional area. *Journal of Equine Veterinary Science*, 113, 103934. Doi: 10.1016/j.jevs.2022.103934

Malmivuo, J. & Plonsey R. (1995). *Bioelectromagnetism: Principles and applications of bioelectric and biomagnetic fields*, USA: Oxford University Press, NY

Marquez-Chin, C. & Popovic, M. R. (2020) Functional electrical stimulation therapy for restoration of motor function after spinal cord injury and stroke: a review. *BioMedical Engineering OnLine*, 19 (1), 34. Doi: 10.1186/s12938-020-00773-4

McCulloch, K. L. & Nelson, C. M. (1995) *Electrical stimulation and electromyographicbiofeedback*, In: Umphred, D. A. (Ed.), *Neurological Rehabilitation*, (3rd edit), St. Louis: Mosby-Year Book

Mehmandoust, F. G., Torkaman, G., Firoozabadi, M., Talebi, G. (2007) Anodal and cathodal pulsed electrical stimulation on skin

wound healing in guinea pigs. *Journal of Rehabilitation Research & Development*, 44 (4), 611-618. Doi: 10.1682/jrrd.2007.01.0007.

Merrill, D. R. (2009) Review of electrical stimulation in cerebral palsy and recommendations for future directions. *Developmental Medicine Child Neurology*, 51 (4), 154-165. Doi: 10.1111/j.1469-8749.2009.03420.x

Mesci, N., Özdemir, F., Kabayel, D. D., Tokuç, B. (2007) İnmeli hastalarda nöromusküler elektrik stimülasyon uygulamasının yürüme hizi ve mesafesine etkisi. *Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 53 (4), 144-149.

Miller, L., McFadyen, A., Lord, A. C., Hunter, R., Paul, L., Rafferty, D., Bowers, R., Mattison, P. (2017) Functional electrical stimulation for foot drop in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis of the effect on gait speed. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 98 (7), 1435-1452. Doi: 10.1016/j.apmr.2016.12.007

Millis, D., & Levine, D. (2014). *Canine Rehabilitation and Physical Therapy*, (Second edit), Philadelphia: Elsevier Health Sciences

Mlacnik, E., Bockstahler, B. A., Müller, M., Tetrick, M. A., Nap, R. C., Zentek, J. (2006) Effects of caloric restriction and a moderate or intense physiotherapy program for treatment of lameness in overweight dogs with osteoarthritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229 (11), 1756-1760. Doi: 10.2460/javma.229.11.1756

Monaghan, C. C., Hermens, H. J., Nene, A. V., Tenniglo, M. J., Veltink, P. H. (2010) The effect of FES of the tibial nerve on physiological activation of leg muscles during gait. *Medical Engineering & Physics*, 32 (4), 332-338. Doi: 10.1016/j.medengphy.2010.01.003

Mysiw, W. J. & Jackson, R. D. (2000). *Electrical stimulation*, In: Braddom, R. L. (Ed.), *Physical Medicine and Rehabilitation*, (Second edit), Philadelphia: Saunders Co

Ni, L., Yao, Z., Zhao, Y., Zhang, T., Wang, J., Li, S., Chen, Z. (2023) Electrical stimulation therapy for peripheral nerve injury. *Frontiers in Neurology*, 14, 1081458. Doi: 10.3389/fneur.2023.1081458

Nicolas, N., Kobaiter-Maarrawi, S., Georges, S., Abadjian, G., Maarrawi, J. (2018) Motor Cortex Stimulation Regenerative Effects in Peripheral Nerve Injury: An Experimental Rat Model. *World Neurosurgery*, 114, e800-e808. Doi: 10.1016/j.wneu.2018.03.090

Pape, K. E., Kirsch, S. E., Galil, A., Boulton, J. E., White, M. A., Chipman, M. (1993) Neuromuscular approach to the motor deficits of cerebral palsy: A pilot study. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 13 (5), 628-633.

Pehlivan, Y. S. & Armağan, O. (2011) Effect of electrical stimulation combined with electromyographic biofeedback and exercise practices on upper extremity rehabilitation after stroke. *Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 57 (2), 66-72.

Pekindil, Y. (2000). *Nöromusküler elektrik stimülasyonu ve izometrik egzersizin kuadriseps kasına etkilerinin TC-99m MİBİ sintigrafisi ile değerlendirilmesi*, Edirne, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi

Petrofsky, J. S., Phillips, C. A., Stafford, D. E. (1984) Closed loop control for restoration of movement in paralyzed muscle. *Orthopedics*, 7 (8), 1289-302. Doi: 10.3928/0147-7447-19840801-12

Popovic, M. R., Popovic, D. B., Keller, T. (2002) Neuroprostheses for grasping. *Neurological Research*, 24 (5), 443-452. Doi: 10.1179/016164102101200311

Prydie, D. & Hewitt, I. (2015) *Practical physiotherapy for small animal practice*, (First edit) Chichester: Wiley

Qi, Y. C., Niu, X. L., Gao, Y. R., Wang, H. B., Hu, M., Dong, L. P., Li, Y.Z. (2018) Therapeutic effect evaluation of neuromuscular electrical stimulation with or without strengthening exercise on spastic cerebral palsy. *Clinical Pediatrics (Phila)*, 57 (5), 580-583. Doi: 10.1177/0009922817732619

Riedler, D. C., Zsoldos, R. R., Robel, M., Jobst, I. D., Licka, T. F. (2020) Movement caused by electrical stimulation of the lumbosacral region in standing horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 91, 103116. Doi: 10.1016/j.jevs.2020.103116.

Ryan, T. E., Brizendine, J. T., Backus, D., McCully, K. K. (2013) Electrically induced resistance training in individuals with motor complete spinal cord injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 94 (11), 2166-2173. Doi: 10.1016/j.apmr.2013.06.016

Samoy, Y., Van Ryssen, B., Saunders, J. (2016) *Physiotherapy in small animal medicine*, Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift

Singh, J. (2005). *Textbook of Electrotherapy*, Jaypee Digital, New Delhi, India.

Temelli, S. (2009) Karkaslarda elektriksel stimülasyon uygulamaları. *Uludag University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*, 28 (2), 1-9.

Tonye-Geoffroy, L., Mauboussin, C. S., Tuffet, S., Fromentin, H., Berard, L., Leblanc, J., Laroche, F. (2021) Efficacy of a combination of hypnosis and transcutaneous electrical nerve stimulation for chronic non-cancer pain: A randomized controlled trial. *Journal of Advanced Nursing*, 77 (6), 2875-2886. Doi: 10.1111/jan.14833

Tuncer, T. (2000). *Elektroterapi*. Beyazova, M., Kutsal, Y. G. (Editörler). *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon*, Ankara: Güneş Kitabevi

Tunç, Y. (2014) *Elektrik stimülasyonunda kullanılan farklı akımların derinin biyofiziksel özellikleri üzerine etkisi*, Yüksek lisans tezi, Ankara, Hacettepe Üniversitesi

Turczynski, B. E., Hartje, W., Sturm, W. (1984) Electromyographic feedback treatment of chronic hemiparesis: an attempt to quantify treatment effects. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 65 (9), 526-528.

Valenti, F. (1964) Neuromuscular electrical stimulation in clinical practice. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 15, 227-245.

Vance, C. G., Dailey, D. L., Rakel, B. A, Sluka, K. A. (2014) Using TENS for pain control: the state of the evidence. *Pain Management*, 4 (3), 197-209. Doi: 10.2217/pmt.14.13

Vanderthommen, M. & Duchateau, J. (2007) Electrical stimulation as a modality to improve performance of the neuromuscular system. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 35 (4), 180-185. Doi: 10.1097/jes.0b013e318156e785

Yavuzer, G., Geler-Külcü, D., Sonel-Tur, B., Kutlay, S., Ergin, S., Stam, H. J. (2006) Neuromuscular electric stimulation effect on lower-extremity motor recovery and gait kinematics of patients with stroke: a randomized controlled trial. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 87 (4), 536-540. Doi: 10.1016/j.apmr.2005.12.041

Yıldızgören, M. T., Nakipoğlu, Y. G. F., Ekiz, T., Özgirgin, N. (2014) Effects of neuromuscular electrical stimulation on the wrist and finger flexor spasticity and hand functions in cerebral palsy. *Pediatric Neurology*, 51 (3), 360-364. Doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2014.05.009

Yüceer, S. (2013). *Torakotomi sonrası uygulanan transkütan elektriksel sinir stimülasyonunun ağrı üzerine etkisi*, Doktora Tezi, Ankara, Hacettepe Üniversitesi