

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TAVŞANLARDA TOTAL PARENTERAL NÜTRİSYON UYGULAMASININ
GONADLARDAKİ HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr Ercan BAYRAKÇI
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof Dr Mehmet DEMİRCAN**

MALATYA, 2017

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**TAVŞANLARDA TOTAL PARENTERAL NÜTRİSYON UYGULAMASININ
GONADLARDAKİ HÜCRE YAŞLANMASI ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr Ercan BAYRAKÇI
ÇOCUK CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof Dr Mehmet DEMİRCAN**

MALATYA, 2017

Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 2016/60 proje numarası ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
RESİMLER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. TOTAL PARENTERAL NÜTRİSYON	2
2.1.1. Total Parenteral Nütrisyon Endikasyonları.....	3
2.1.2. Total Parenteral Nütrisyon Uygulama Yolu	3
2.1.3.Total Parenteral Nütrisyon Sıvılarının Kompozisyonu	5
2.1.4. Total Parenteral Nütrisyon Komplikasyonları.....	11
2.2.TELOMERAZ VE DÜZENLENMESİ	15
2.2.1. Telomer Nedir ve Tolemerin Görevleri	15
2.2.2.Telomerik Dizilerin Düzenlenmesi.....	17
2.2.3. Telomeraz ve Yapısı	19
2.2.4. İnsan Telomerazının Fonksiyonel Kurulumu	20
2.2.5. Normal ve Kanserli İnsan Hücrelerinde Telomeraz Etkinliği	25
2.2.6. İnsanlarda Telomeraz Aktivitesinin Düzenlenmesi	26
2.3. ANATOMİ.....	33
2.3.1. Over	33
2.3.2. Testis.....	35
2.4. EMBRİYOLOJİ.....	36
2.5. HİSTOLOJİ	40
2.6. FİZYOLOJİ	42
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	44
3.1. Yöntem.....	44
3.1.1. Deney Grupları	44
3.1.2. TPN Modeli	44
3.1.3. Doku Örneklerinin Alınması	45
3.2. HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM VE DEĞERLENDİRME	45

3.3. İSTATİKSEL ANALİZ	46
4. BULGULAR.....	47
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	55



TEŞEKKÜR

Bu projenin gerçekleŐtirilmesinde büyük gayret ve desteklerini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Kubulay GRNLOĞLU ile bu zorlu sürecimde beni sürekli destekleyen sevgili eŐim Ayten ve kocaman yürekleri ile beni anlamaya çalıŐan kızım Verda Naz'a ve oğlum Hüseyin Mert'e teşekkür ediyorum.



ÖZET

Amaç: Total parenteralnütrisyon (TPN) gastrointestinal sistemin kullanılmadığı durumlarda hayati fonksiyonların devamı için gerekli olan substratların periferik veya santral venözkompartmana verildiği bir tekniktir. TPN'un kullanımı ile cerrahi işlemler sonucunda mortalite önemli ölçüde azalmıştır. TPN uygulaması sırasında gelişen komplikasyonlar önemli bir mortalite nedeni olarak ortaya çıkmıştır. Hepatobilier disfonksiyon ve sepsis, üzerinde en fazla durulan ve pek çok araştırma yapılan en önemli komplikasyonlardır.

Telomerler birçok biyolojik fonksiyonun parçasıdır. DNA tahribinin tanınması, uc uca füzyonu ve rekombinasyonundan kromozomları korur. Kromozomların tam çoğalması için bir araç olarak işlev görür. Çekirdek içindeki kromozomların fonksiyonel organizasyonuna katkıda bulunur. Genifadesinin düzenlenmesinde rol oynar, hücrelerin çoğalma kapasitesini kontrol eder ve yaşlanmaya girmeleriyle ilgili bir moleküler saat olarak hizmet görür. Yaptığımız deneysel çalışma; TPN uygulaması yapılan tavşanların gonad dokularındaki yaşlanmaya olan etkisini araştırmaktı.

Materyal ve Metod: Çalışmada aynı yaşta ve eşit sayıda erkek ve dişiden oluşan, her biri ortalama 2600 ± 500 gr ağırlığında toplam 42 adet *Yeni Zellanda* tavşanı kullanıldı. Tavşanlar, İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden temin edildi. Çalışma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alındı. 12 saat gündüz ve 12 saat gece olacak şekilde 23°C de deney ortamı hazırlandı. Tavşanlar deneyden önce ve sonra tartıldılar.

Toplam 42 adet tavşan 3 gruba ayrıldı. Her grupta 14 tavşan vardı. Birinci ve ikinci gruptaki tavşanlara santral venözkateter yerleştirildi. Birinci gruba 10 gün TPN verilirken ikinci grupta ki tavşanlara 10 gün 50 cc/kg/gün serum fizyolojik verildi. Kontrol gruptaki 14 adet tavşana herhangi bir işlem uygulanmadı. Çalışma süresince gruplarda yer alan tavşanların hepsinin oral beslenmesine ve su içmelerine izin verildi. Deneysel periyodu sonunda testislerinden ve overlerinden örnekler alındı ve tavşanlar kurban edildi. Hemotoksinin ve eosin boyası ile boyandı ve Telomerase reverse transcriptaz ekspresyonu için immunohistokimyasal boyama yapıldı.

İstatistiksel analiz SPSS Version 12 kullanılarak yapıldı. Quantitative data Standard deviasyon (SD) \pm aracılığı ile sunuldu. Qualitative data yüzde ve sayı olarak sunuldu.

Bulgular: TERT aktivitesi açısından TPN, Serum Saline ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark vardı ($p<0.05$). Çoklu karşılaştırmalarda ise Gonad doku kesitlerinde TPN verilen gruptaki TERT aktivitesi Serum Saline ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir artış gösterdiği tespit edildi.

Sonuç: TERT aktivitesi kontrol grubunda ve serum saline grubunda mevcut ve TPN grubundan daha düşük olarak bulundu. Mevcut bulgularla TERT aktivitesindeki bu artışla TPN nun hücre yaşlanmasını gonad doku hücrelerinde deneysel olarak azalttığını tespit ettik. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda TPN'un apoptozisi mitokondrilerdeki membran permeabilitesini artırarak indüklediği tespit edilmiş olsa da, biz TPN 'un gonad hücre çekirdeğinde telomer kinetikleri üzerine olumlu etkiye sahip olduğu saptadık.

Anahtar kelimeler: Total parenteral nutrisyon, telomeraz reveres transkriptaz, over, testis.

ABSTRACT

Aim: Total parenteral nutrition (TPN) is a technique where the substrates required for the maintenance of vital functions are released into the peripheral or central venous compartment in cases where the gastrointestinal system can not be used. By the use of TPN, mortality rates were significantly reduced in surgical procedures.

Complications that arise during TPN administration have emerged as a significant cause of mortality. Hepatobiliary dysfunction and sepsis are among the most important complications that were predominantly investigated and several studies have been conducted on these complications.

Telomerase is a component of several biological functions. It preserves the chromosomes from the identification of DNA damage, end-to-end fusion and recombination. It acts as a mediator in the full proliferation of chromosomes. It contributes to the functional organization of the chromosomes in the nucleus. It plays a role in the regulation of gene expression, controls the cellular proliferative capacity and serves as a molecular clock related to senescence.

The aim of the present empirical study was to investigate the impact of TPN administration on ageing in rabbit gonad tissues.

Material and Method: 42 New Zealand rabbits that were at the same age and included equal number of males and females, each weighing 2600 ± 500 gr, were used in the study. The rabbits were obtained Inonu University Experimental Research Center. The study was approved by the of Inonu University Faculty of Medicine, Experimental Animals Ethics Committee. The experiment environment was designed at 23 santigrad degrees, with 12 hours day light and 12 hours darkness. Rabbits were weighed before and after the experiment.

Forty-two rabbits were divided into 3 groups. 14 rabbits in each group. Central venous catheters were applied to the rabbits in the first and second groups. TPN was administered to the first group for 10 days, the second rabbits were administered to 50 cc/kg/day saline for 10 days. No treatment was administered to 14 rabbits in the control groups. During the study, oral feeding and water were provided for all the rabbits in the groups. At the end of experiment, gonad and ovary tissue sample were obtained and the rabbits were sacrificed. The samples were stained with Hemotoxylin & eosin and the immunohistochemical staining was conducted for telomerase reverse transcriptase (TERT) ekspression.

Statistical analysis was conducted SPSS Version 12. Quantative data were presented via Standard deviation (SD)+/-. Qualitative data was presented as percentages and counts.

Findings: A significant difference was determined in TERT activity between TPN, Serum Saline and control groups ($p < 0.05$). In multiple comparisons, it was observed that TERT activity in the gonad tissue sections in the TPN group significantly increased when compared to Serum Salin and the control group.

Results: It was determined that TERT activity was lower in the control group and in the serum saline group when compared to the TPN group. The study findings demonstrated that TPN decreased cell senescence in gonad tissue cells experimentally based on the increase in TERT activity. Although it was observed in previous studies that TPN caused the same impact by increasing the apoptosis and membrane permeability in mitochondria, we identified that TPN had a positive effect on telomeres kinetics in gonad cell nuclei.

Key Words: Total parenteral nutrition, telomerase reverse transcriptase, over, testis.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALP	: Alkalen fosfataz
ARDS	: Acute respiratory distress syndromu
ATP	: Adenozin trifosfat
C ₃	: Kompleman 3
DNA	: Deoksiribo nucleic asid
ECMO	: Ekstra korporeal membranöz oksijenasyon
EDTA	: Ethylene daimine tetraaceticacid
EKG	: Elektro kardiyografi
FSH	: Folikül stimulan hormon
GIS	: Gastrointestinal sistem
GnRH	: Gonado tropin relasing hormon
Gr	: Gram
H&E	: Hemotoxylin and eosin
HSP	: Heat shock protein
hTERT	: Human telomerase reverse transkriptase
hTR	: İnsan telomerazı RNA kompenenti
IFN α	: İnterferon alfa
IHC	: İmmunohistokimyasal boyama
IL-1	: İnterlökin 1
IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
K.cal	: Kilo kalori
KL	: Korpus luteum
LCT	: Long-chain triglyserides
LH	: Lüteinizan hormon
Lt	: Litre
MCT	: Medium-chain triglyserides
MIF	: Müllerian inhibiting faktör
MPF	: Maturasyon uyarıcı faktör
M1	: Mortalite evresi 1
M2	: Mortalite evresi 2
PAF	: Platelet-chain triglyserides

PKC	: Protein kinase C
PUFA	: Polyunsaturated fatty acids
RNA	: Ribonücleic acid
SGOT	: Serum glutamat okzaloasetat transaminaz
SGPT	: Serum glutamat piruvat transaminaz
SHBG	: Seks hormon binding globulin
TERC	: Telomeraz RNA kompenenti(hTR)
TGF1	: Transforme growth faktor 1
TPI	: Telomeraz-bağımlı proteinler
TRAP	: Telomeric Repeat Amplification Protocol
TRF 1	: Telomerik protein terminal sınır fragmanı 1
TRF 2	: Telomerik protein terminal sınır fragmanı 2
UV	: Ultraviyole
°C	: Santigrat derece
α	: Alfa
β	: Beta
Γ	: Gama

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Hücresel yaşlanmanın ve ölümsüzleşmenin iki aşamalı hipotezi.	20
Şekil 2. hTERT geninin gen organizasyonu.	27
Şekil 3. Uterus, Vajina, Uterin Tüpler, Yumurtalıklar ve Destekleyici Bağlar.....	35
Şekil 4. Cinsiyet belirlenmesinin özeti	38
Şekil 5. Folikül gelişim aşamaları	39
Şekil 6. A. 3 Haftalık embriyoda yolk kesesi duvarında, allontosis bağlantısına yakın bir yerde primordial germ hücrelerini gösteren şematik çizim. B. Primordial germ hücrelerinin, son barsak ve dorsal mezenter boyunca genital kıvrıma doğru giden göç yolu	40
Şekil 7. A: Genital kabarıklık ve mezonefroz arasındaki ilişkiyi gösteren çizim. 7B. Mezonefroz ve genital kabarıklıktan A’da belirtilen seviyeden geçen transvers kesit.....	40
Şekil 8. Gruplar arası TERT aktivitesi grafiği.....	48

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1. Pediatrik yaş grubunda TPN endikasyonları	4
Tablo 2. TPN komplikasyonları	12
Tablo3. İnsan telomeraz ile ilişkili proteinler	23
Tablo 4. Tavşanlara uygulanan TPN'nun özellikleri	45
Tablo 5. Gruplar arası TERT aktivitesi.....	47



RESİMLER DİZİNİ

<u>Resim No</u>	<u>Sayfa No</u>
Resim A1. Kontrol grubu testis dokusu spermatoisitlerde TERT ekspresyonu soluk nükleer boyanma.....	48
Resim A2. Kontrol grubu testis dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin).....	48
Resim B1. Kontrol grubu over dokusunda non-spesifik stoplazmik TERT ekspresyonu.....	48
Resim B2. Kontrol grubu over dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin).....	48
Resim C1. Serum saline grubu over dokusunda non-spesifik stoplazmik TERT ekspresyonu.....	49
Resim C2. Serum saline grubu over dokusunun histopatolojik görünümü, (Hematoksilin ve eozin).....	49
Resim D1. Serum saline grubu testis dokusu germ hücrelerinde negative TERT ekspresyonu.....	49
Resim D2. Serum saline grubu testis dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin).....	49
Resim E1. TPN grubu testis dokusu spermatoisitlerde kuvvetli nükleer TERT ekspresyonu (ok başı)	49
Resim E2. TPN grubu testis dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin).....	49
Resim F1. TPN grubu over dokusunda kuvvetli nükleer TERT ekspresyonu (ok başı)	50
Resim F2. TPN grubu overdokusunun istopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin).....	50

1. GİRİŞ

Total Parenteral Nütrisyon (TPN); gastrointestinal sistemin, susama ve acıkma ile ilgili santral regülâtör mekanizmaların devre dışı bırakılarak, hayati fonksiyonların ve anabolik ortamın devamı için hastanın gereksinimi olan su, protein, karbonhidrat, lipit, elektrolit, vitamin ve eser element gibi substratların uygun preparatlar halinde periferik veya santral venöz kompartmana verilmesi ile yapılan bir beslenme tekniğidir (1). Birçok cerrahi veya tıbbi patolojide çok sık ihtiyaç duyduğumuz bir tedavi ve beslenme yöntemidir.

Telomerler, kromozomun baş ve son kısmının ilerleyişini stabilize eden DNA-protein kompleksidir (2). Bir hücrenin ne kadar bölüneceğini mevcut telomer uzunluğu gösterir. Her bölünmede telomer kısalır, telomeri progresif olarak kısalmış hücre yaşlı konuma geçer ve bölünemez (3). Telomeraz bir ribonükleoprotein kompleksidir (4). Telomeraz reverse transkriptaz (TERT) telomeraz kompleksinin katalitik komponentidir ve telomeraz aktivitesinin hız sınırlayıcı faktörüdür (5).

Bu deneysel çalışmada; TPN uygulanan tavşan gonad hücrelerinde immünohistokimyasal olarak dokulardaki TERT düzeyi ile telomeraz aktivitesini araştırdık ve TPN' un telomer dinamiklerini etkileyerek TERT aktivitesini nasıl etkilediğini araştırdık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. TOTAL PARENTERAL NÜTRİSYON

Total parenteral nütrisyon; gastrointestinal sistemin, susama ve acıkma ile ilgili santral regülatuar mekanizmaların devre dışı bırakılarak, hayati fonksiyonların ve anabolik ortamın devamı için hastanın gereksinimi olan su, protein, karbonhidrat, lipid, elektrolit, vitamin ve eser element gibi substratların uygun preparatlar halinde periferik veya santral venöz kompartmana verilmesi ile yapılan bir besleme tekniğidir (1).

Parenteral beslenmenin tarihçesi 1665'de Sir Christopher Wren'in köpeklere intravenöz yoldan şarap vermesiyle başladığı kabul edilir (6). Helfrick ve Abelson tarafından 1940'lı yıllarda bugünkü şekliyle olmasa da parenteral beslenme tanımlanmış, ancak klinik uygulama alanına 1970'li yıllarda girebilmiştir (7). İlk dönemlerde verilen aminoasitlerin anabolize olması ve yeterli kalorisinin sağlanamaması nedeniyle, enteral yoldan beslenemeyen hastalara yüksek konsantrasyonda dekstroz içeren sıvılar verilmiştir. Bu sıvıların periferik venlerin endotelini zedeleyerek, tromboflebite neden olduğu düşünülmüş. Bunun üzerine sıvı hacmi artırılarak, aynı miktardaki şekerin daha dilüe bir sıvı içinde verilmesine çalışılmıştır. Bu yaklaşım sonucunda da, hastalarda akciğer ödemi, kalp yetmezliği veya periferik ödem gibi komplikasyonlar olduğu görülmüştür (7). Daha sonra, sıvı miktarı sabit tutularak kalori miktarının artırılmasına düşünülmüş ve parenteral sıvılara 1 gramı 5-6 kcal içeren etanol eklenmiş ancak etanolünde, hepatotoksik olduğu görülmüştür. Parenteral beslenmeye yağ emülsiyonlarının ilk kez katılması 1869 yılında Menzel ve Perco tarafından deneysel olarak yapılmıştır (8). Yağ emülsiyonları insanlarda yaklaşık yüzyıl sonra 1950 'lerde kullanılmaya başlanmıştır. ABD'de Lipomul adlı ilk yağ emülsiyonu insanlarda kullanılmış; ancak toksik etkileri nedeniyle kısa süre içinde piyasadan toplatılmıştır. Wretlind, 1962 yılında soya fasülyesinden elde ettiği yağ emülsiyonlarının yeniden kullanım alanına girmesi ile hastalara istenilen miktarda kalorisinin verilmesi sağlanmıştır. Parenteral beslenme bugünkü popülaritesini, enteral yoldan yeterince beslenemeyen bebeklerin intravenöz aminoasit ve hipertonic glukoz sıvıları ile kilo alabileceğini ve büyüyebileceğini gösteren Dudrick ve arkadaşlarına borçludur (8).

Parenteral beslenme sıvılarının süperior vena kava gibi büyük santral venler içine verilebilmesini sağlayan kateterlerin üretilmeside parenteral beslenme konusunda

önemli bir gelişme olmuştur. Bu sayede konsantra sıvıların komplikasyonu olan tromboflebit insidansı azalmıştır (8).

Total parenteral nütrisyon uygulaması ile pediatrik yaş grubu ve özellikle yenidoğanlarda mortalite ve morbidite önemli derecede azalmıştır. Bununla beraber bu yöntem pahalı, invazif, fizyolojik olmayan ve birçok yan etkisi olan bir yöntemdir (9).

2.1.1. Total Parenteral Nütrisyon Endikasyonları

Pediatrik hastalarda TPN endikasyonları Tablo 1’de gösterilmiştir (10,11). Total parenteral nütrisyon; multipl gastrointestinal fistüller, kısa barsak sendromu, ağır Crohn hastalığı ve renal yetmezlikte primer tedavi yöntemiye inatçı diare ve malnütrisyonunda, kanser, sepsis, yanık ve konjenital gastrointestinal anomalili hastalarda destek tedavisidir (12-15).

2.1.2. Total Parenteral Nütrisyon Uygulama Yolu

Parenteral beslenme uygulanan hastalar da sıvılar çeşitli yollarla verilebilir. En çok kullanılanlar periferik venlere ve santral venlere yapılan uygulamalardır. Periferik venler 10-14 günden daha kısa süren parenteral beslenme uygulamalarında kullanılır. Periferik venlere takılan kateterler 2-3 günde bir değiştirilmelidir, değiştirilmediği durumlarda solüsyonun ven dışına sızmasına bağlı inflamasyon ve cilt nekrozu gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilir (7).

Santral venöz parenteral nütrisyon uygulaması 14 gün’den daha uzun süre parenteral beslenme uygulanacak hastalarda kullanılır. Bunun için iki tip kateter kullanılır (7). “Broviac” tip kateterler silastik yapıdadır, eksternal juguler ven, internal juguler ven basilic ven veya safen ven gibi bir ekstremitte venine “cut-down” uygulaması şeklinde cilt altı tünel hazırlanarak takılır. Broviac tip kateterlerde lokal veya genel anestezi gereklidir (7).

Parenteral nütrisyon uygulamasında kullanılan diğer bir santral kateter de perkütan intravenöz kateterlerdir. Bu kateterler çocuk ve erişkinler tarafından son derece iyi tolere edilirler. Bu kateterlerde internal juguler venlere, subklavian vene, femoral venlere minimal sedasyon altında yerleştirilir. Perkütan kateterlerin infeksiyon geliştirme ihtimali de daha düşüktür (14). Kateter giriş bölgesine her gün pansuman yapılmalıdır. İnfüzyon setleri, mikroorganizmalarla kontamine olmaması ve kalsiyum partiküllerinin birikmemesi için 72 saatte bir değiştirilmeli ve setlerin ucuna millipore filtresi takılmalıdır. Lipid verilen set 24 saatte bir değiştirilmelidir (7).

Kateterlerin bakımı ve kullanımı titizlikle yapılmalı ve temizliğe son derece önem verilmelidir. Bu şekilde infeksiyon ve sepsis gelişimi önlenebilir (14).

Tablo 1. Pediatrik yaş grubunda TPN endikasyonları (11).

Cerrahi Gastrointestinal Hastalıklar
-Gastroşizis, omfalosel
-Trakeoözefageal fistül
-Multipl intestinal atreziler
-Mekonyum ileus ve peritonitler
-Malrotasyon ve volvulus
-Enterokolitli Hirschsprung Hastalığı
-Diafragma hernisi, ekstrakorporeal membranöz oksijenasyon (ECMO), Düşük doğum ağırlıklı
bebekler
-Asfiksik bebekler, respiratuvar distres sendromu
-Çok düşük doğum ağırlıklı bebekler,
İnflamatuvar barsak hastalıkları
-Crohn hastalığı, ülseratif Kolit
Bebeklerin inatçı diareleri
Kronik idiopatik intestinal psödoobstrüksiyon sendromları
Kısa barsak sendromu
Ağır akut alimenter hastalık
-Pankreatit
-Psödomembranöz kolit
-Nekrotizan enterokolit
Ağır malabsorbsiyon
-İdiopatik villöz atrofi
Gastrointestinal fistüller
Hipermetabolik durumlar
-Ağır yanık ve travma
Renal yetmezlik
Malignensiler
-Özellikle abdominal irradiasyon alanlar (radyasyon enteriti)
-Ağır bulantı ve intestinal disfonksiyona neden olan kemoterapi
Kemik iliği ve organ transplantasyonları
Spesifik durumlar ve nadir hastalıklar
-Anoreksia nervoza, kistik fibrozis, kardiak kaşeksi, sepsis, şilotoraks yetmezlik

2.1.3.Total Parenteral Nütrisyon Sıvılarının Kompozisyonu

Parenteral beslenmede kullanılan sıvılar glukoz, aminoasit, yağ emülsiyonu, elektrolit, mineral, vitamin ve eser elementleri içerir.

Parenteral beslenmeyle verilecek kalori miktarı: 10 kg'a kadar 100-120 kcal/kg/gün, 10-20 arası, ilk 10kg için 1000+50 kcal/kg/gün, 20kg üstünde ise, 1500-1700 kcal/gündür (16).

İdeal bir parenteral beslenme sıvısının 1 mililitresinde 1 kcal olmalıdır. %20'lik glukoz solüsyonlarının 1 mililitresinde ancak 0.68 kcal vardır. Parenteral sıvılardaki monohidrat glukozun 1 gramı 3.4 kcal sağlar. Yüzde 10'luk yağ emülsiyonlarının 1 mililitresinde 1.1 kcal, %20'lik yağ emülsiyonlarının ise 1 mililitresinde 2.2 kcal enerji vardır. Bu nedenle tek başına şekerli sıvılarla hastaya ihtiyaç olan kaloringin verilebilmesi ancak verilecek sıvı hacminin yüksek tutulması ile mümkün olur. Bu sorun beslenme sıvıları içine yağ emülsiyonlarının eklenmesi ile çözümlenebilir (7).

Sıvı

Parenteral beslenme sıvıları her 1 kcal'e karşılık 1 ml veya 1500-1700 ml/m²/gün su içermelidir. Bebek ve çocuklarda alınan sıvıların %50'si böbrekler, %3-10'u sindirim kanalı yoluyla ve %40-50'si de hissedilmeyen kayıp şeklinde vücuttan atılır. Günlük alınan sıvının %0.5-3'ü kadar vücutta kalır (14).

37 derecenin üzerindeki, her bir derecelik ısı artışı için su miktarını%12, yanıklı hastalarda yanığın genişliği ve derinliğine göre, idame su gereksiniminin %100'üne kadar, sepsiste %40-50, büyük ameliyatlara geçirmiş hastalarda %20-30 kadar artırılması gerekir (7).

Glukoz

Hem enteral hem de parenteral beslenmenin önemli öğelerinden biri olan karbonhidratlar üç şekilde bulunurlar: monosakkaritler, disakkaritler veya bunların kompleks formudur. İnsan metabolizması, yeterince karbonhidrat alamadığı durumlarda yağ depolarını ve aminoasitleri şekere çevirebilme yeteneğine sahiptir. Katabolik durumlarda bu metabolik faaliyetler arzu edilmemektedir. Bu nedenle protein depolarının korunması amacıyla parenteral beslenme sıvıları içinde yeterince karbonhidrat bulunması şarttır. Parenteral beslenme sıvıları içinde yer alan karbonhidrat ve yağlardan sağlanan enerji sayesinde aminoasitlerin glukozla dönüşmesi yerine protein sentezine katılmasını sağlayarak, kas yıkımını ve üre yapımını azaltırlar. Santral sinir sistemi, eritrositler, retina, renal parankim ve intestinal mukoza glukozu enerji kaynağı

olarak doğrudan kullanırlar. 4 saat açlık sonrası, 8-12 saat boyunca vücudun enerji gereksinimi karaciğerde depolanmış olan glikojenden sağlanır. Yenidoğanların karaciğer glikojen depoları daha sınırlı olduğundan, daha kısa süreli açlıklarda bile kolayca hipoglisemiye girebilirler (17).

Sağlıklı bir çocuğun toplam kalori gereksiniminin %40-45'i karbonhidratlar tarafından karşılanmalıdır (17).

Glukoz konsantrasyonu %5'in üstünde olan parenteral sıvılar hipertondiktir. Prematüre bebeklerde, parenteral beslenmeye, önce %10 glukoz içeren sıvılarla başlanır ve daha sonra artırılır. Prematur bebeklerin hipertondik glukoz solusyonlarına karşı insülin cevabı yeterli değildir. Daha büyük çocuklarda glukozlu sıvıların konsantrasyonu %20-25'e kadar artırılabilir. Hipertondik glukoz infüzyonunun en önemli komplikasyonu, hastanın şoka dahi girmesine neden olabilen hiperosmolar diürezdir. Ayrıca aşırı karbonhidrat alınması kompleman sistemi inaktive ederek immün sistemin çökmesine neden olabilir (14).

Sıvı haldeki 1 gr glukoz 3.4 kcal/gr enerji verir. Normalde 6.25 gr proteinden 1 gr nitrojen açığa çıkar. Proteinlerin enerji olarak tüketilmesini engellemek için verilen her 1 gram nitrojene karşılık 135-150 kalorilik glukoz ve yağ verilmelidir (18).

Protein

Günlük enerji gereksiniminin %15'i proteinlerden karşılanmalıdır. Nitrojen bebeklerin vücut ağırlığının %2'sini, erişkinin ise vücut ağırlığının %3'ünü meydana getirir. Vücut nitrojenindeki artış büyük oranda ilk bir yaş içinde olur. Bu nedenle, yenidoğan ve süt çocuklarının protein ihtiyacı yetişkinlerden daha yüksektir. Büyüme, hücre sel onarım, yaraların iyileşmesi, vitamin ve enzimlerin sentezi için pozitif nitrojen dengesi içinde olmak zorundadır (19).

Erişkin stabil hastaların günlük alması gereken protein miktarı 1.5 gr/kg/gün iken, kritik hastalarda bu oran 2.5 gr/kg/gün'dü (19). Sağlıklı bir yenidoğanın alması gereken protein miktarı 2-2.8 gr/kg/gün'dür (20). Amerikan Pediatri Akademisinin önerisine göre 1800 gr'dan daha düşük ağırlıklı bebeklere verilmesi gereken günlük protein miktarı enteral yoldan 3.5-4 gr/kg, parenteral yoldan da 3 gr/kg'dır (21).

Parenteral beslenme sıvılarına protein kaynağı olarak veya plazma kolloidal basıncını idame ettirmek amacıyla albümin de eklenebilir (7).

Lipidler

Enteral beslenmenin yapılamadığı hastalarda yaşamı kurtaran bir strateji olmasına rağmen total parenteral beslenme, yüksek enfeksiyöz komplikasyonu

nedeniyle ciddi problemleri olan bir uygulamadır (22). Çoğunlukla bu enfeksiyonun giriş yeri verilmiş yolundaki kateterdir (23). Buna ek olarak klinik ve deneysel pek çok çalışmada TPN içeriğindeki lipidlerin immün sistemde oluşturduğu bozukluğunda bu komplikasyonun gelişmesinde temel rol oynadığı ileri sürülmüştür (24).

Klinik olarak ilk lipid emülsiyonu 1960 da soya yağından elde edilen uzun zincirli yağ asitlerinin (LCT) kullanımı ile başlamıştır. Bu LCT emülsiyonu başlıca çoklu doymamış yağ asidi (Polyunsaturated fatty acids, PUFA), büyük miktarda α -linoleik asit ve arakidonik asit prekürsörlerinden oluşmaktaydı (25). Yüksek oranda doymamış yağ asiti içeren LCT'nin kullanımı sırasında inflamasyon öncesi oluşan eikozanoid ürünleri arakidonik asid ve ondan üretilen prostanooidlerin ve lökotrienlerin yapımının bozulduğunun farkedilmesi lipid kullanımı sırasında immün sistemde bir bozukluk olduğundan şüphelenilmesine neden olmuştur. 1980 yılından itibaren uzun zincirli ve orta zincirli yağ asitleri ((medium-chain triglycerides)(MCT)) karışımı kullanılmaya başlanmıştır. Ayrıca LCT ve MCT'nin esansiyel yağ asitleri ile birlikte verilmediği durumlarda tamamen metabolize olmayıp metabolik artıklarının biriktiği gösterilmiştir (26). Bu artıklarında metabolize edilerek ortadan kaldırılabilmesi için sentetik yapıli lipidlerin LCT ve MCT ile birlikte verilmesi gerektiği öne sürülmüştür. Bunun üzerine sentetik yapıli lipidler LCT ve MCT'nin esterifiye edilmesiyle elde edilmiş ve gliserol adıyla kullanılmaya başlanmıştır (27).

Günümüzde bu emülsiyonların içine PUFA, zeytinyağı, tekli doymamış yağ olan oleik asid veya balık yağı da katılmaktadır. Bu solüsyonlardaki PUFA proinflamatuvar sitokinlerin yapımını sağlamakta ve oksidatif streste reaktif oksijen radikallerinin yapımını azaltmakta ve peroksizom proliferasyonunu aktive eden reseptörlerin down-regülasyonunu sağlamaktadır (25).

Günümüzde lipid emülsiyonlarında LCT, MCT, zeytinyağı ve balık yağı birlikte verilmektedir (25).

Uzun Zincirli Trigliseridler

Uzun zincirli trigliseridler çok sayıda n-6, n-3 bağları içerirler ve sepsis, travma gibi klinik durumlarda proinflamatuvar eikozanoidlerin fazladan yapımına neden olurlar (28).

Ayrıca lökosit fonksiyonlarını hücre membranındaki sıvı içeriğini veya hücre içi sinyalin iletimini değiştirerek kontrolsüz bir inflamatuvar yanıtı neden olduğu da iddia edilmiştir (29). Ancak LCT'nin çok önemli lökosit fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemediğine dair pek çok yayında literatürde bulunmaktadır (30).

LCT kanda nötrofillerin membran yüzeyindeki aktivasyonu sağlayan molekülleri azaltır. LCT infüzyonu kanın akışkanlığını bozmaz ve plazma vizkozitesi ile hücre hasarına etkisi yoktur (30).

Uzun Zincirli ve Orta Zincirli Trigliseridlerin Karışımı

MCT biyolojik olarak inerttir. Yapılan deneysel çalışmalarda MCT, LCT ile karşılaştırıldığında aktive lökositlerin kalsiyum modülasyonunu ve protein kinaz-C bağımlı hücre içi sinyal iletimini daha çok etkilediği iddia edilmiştir. MCT'nin lökosit fonksiyonunu değiştirmesi inflamatuvar cevabı artırır. Bu etki MCT'nin LCT ve yapısal tabanlı lipidler ile birlikte verilmesiyle yok olur. Bu değişiklik LCT / MCT oranının ve n-6/n-3 bağlarındaki oranın değişmesiyle gerçekleşir (26,31).

Plasebo ile kontrollü yapılan çalışmalarda ARDS'li (acute respiratory distress syndrome) hastalara LCT / MCT infüzyonunu takiben akciğer dokusundaki proinflamatuvar mediatörler olan fosfolipaz A₂ ve PAF salınımı artmış ve doku inflamasyonu şiddetlenmiştir (32). ARDS olmayan hastalara LCT / MCT verildiğinde bu etki görülmemiştir. ARDS'li hastalara LCT düşük infüzyon hızında verildiğinde bile benzer etkileri oluşturmuştur (33).

Yapısal Lipidler

Yapısal lipidler LCT ve MCT'nin uzunve orta zincirinin gliserol ile yeniden esterifikasyonu ile oluşur. Yapısal lipidler insanlarda iyi tolere edilir. MCT ve LCT ile karşılaştırıldığında insan metabolizması üzerine daha faydalı etkileri vardır. Ayrıca yapısal lipidler LCT ve MCT'den daha iyi metabolize olurlar (34). Deneysel çalışmalarda yapısal lipidler LCT veya LCT/MCT verilmesinin tersine nötrofil fonksiyonlarını önemli ölçüde etkilemez (35). Yapısal lipidler hücre içi sinyal iletimini ve membran akışkanlığında etkilemez (34).

Zeytinyağı Tabanlı Lipidler

Zeytinyağı tabanlı lipidler tekli doymamış yağ asidi olan oleik asidden oluşur. LCT'nin %80'nin zeytinyağı ile değiştirilmesi ile oluşan TPN lerde n-6/n-3 oranının değişip 9: 1 olmasına neden olur (26). Zeytinyağı tabanlı lipidlerin immün fonksiyonu PUFA ile membran fosfolipidlerine katılmakta yarışarak gösterir (24).

Yapılan çalışmalarda TPN alan 13 hastaya LCT/MCT yerine zeytinyağı tabanlı lipidlerin verilmesiyle inflamatuvar yanıt ürünlerinde bir değişim gözlenmemiştir (36). Başka bir çalışmada TPN deki LCT'nin oluşturduğu karaciğer hasarı zeytinyağı kullanılarak azaltılmıştır (37).

İmmün sistem açısından LCT veya LCT/MCT ile karşılaştırıldığında zeytinyağı insan lenfositleri ve fagositler üzerine zararlı bir etkisinin olmadığı saptanmıştır. Zeytinyağı tabanlı lipidlerin proinflamatuvar sitokin üretimini azalttığı düşünülmüştür (38).

Balık Yağı Tabanlı Emülsiyonlar

Artmış proinflamatuvar yanıtla karakterize otoimmün hastalıklar üzerinde diyetle alınan balık yağının olumlu etkileri olduğu kanıtlanmıştır (39). Enteral yoldan verilen balık yağının immüniteyi bozduğu iddia edilse de, parenteral verilen balık yağı bazı lipidler hakkında böyle bir iddia bulunmamaktadır (39). Parenteral verilen balık yağının, cerrahi girişim uygulanan hastalarda lökositlerden lökotrien üretimini azaltıp antiinflamatuvar etki gösterdiği bulunmuştur(40). Uzun zincirli trigliseridle karşılaştırıldığında inflamasyonda azalma, enfeksiyon gelişmesi durumunda düzelmeye gözlenmekle birlikte bağırsak cerrahisinden sonra verildiğinde inflamatuvar yanıtı artırdığı iddia edilmiştir (41). Balık yağı tabanlı lipidlerin, lökosit membranındaki n-6/n-3 oranını azaltarak proinflamatuvar sitokin üretimini baskıladığı tesbit edilmiştir (42).

Septik şok gelişmiş hastalara verilen balıkyağının nötrofillerin sinyalizasyonunu iyileştirdiği gözlenmiş ve LCT'nin sepsiste nötrofil fonksiyonlarını bozarak hastanın durumunu daha da kötüleştirdiği gözlenmiştir (43).

Retrospektif yapılan bir çalışmada cerrahi uygulanacak hastalarda balık yağı, LCT ve MCT ile karşılaştırılmış ve postoperatif ventilatör ihtiyacını ve mortaliteyi olumlu etkilediği bulunmuştur (44).

Parenteral lipidler ratlara ciddi pankreatit oluşturulup verildiğinde balık yağının inflamasyonu azalttığı, LCT ve zeytinyağının böyle bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir (37).

Karışık Emülsiyonlar

Karışık emülsiyonlar LCT'nin MCT ve balıkyağı tabanlı lipidler ile karıştırılmasıyla veya %30 MCT, %25 zeytinyağı + %15 balık yağı şeklinde birleştirilmesiyle oluşturulur. Tek başına MCT verildiğinde metabolize olamayan artıkları birikirken, karışık emülsiyonlarla verildiğinde dolaşımında artık ürün birikmez. Karışık emülsiyonlarda n-6/n-3 oranı 2.5:1 dir. Bu da insan gelişimini olumlu etkiler (26).

Karışık emülsiyonların akciğer ve karaciğer makrofaj fonksiyonunu olumlu etkilediği de gözlenmiştir (37).

Karışık emülsiyonların oksidatif streste karaciğer enzim anomalilerini azalttığı, antioksidanların seviyesini minimal artırdığı gözlenmiştir (45).

Sonuç olarak; TPN uygulaması sırasında TPN içeriğindeki lipidler tarafından oluşturulan immünmodülasyon dikkat edilmesi gereken önemli bir konudur. Parenteral uygulamada kullanılan lipidler immün cevabı kendi kimyasal yapısına bağlı olarak değiştirir (27,37). Özellikle balık yağı tabanlı emülsiyonlar bozulmuş inflamatuvar yanıtın rol aldığı otoimmün hastalıklarda yeni bir tedavi seçeneği olabilir (26).

Parenteral beslenme alan yetişkinlere 2 gr/kg/gün dozunda yağ emülsiyonları verilmesi gerekirken, çocuklara 0.5-4 gr/kg/gün dozunda yağ emülsiyonları verilmelidir (17,46). Trigliserid klirensini dengede tutabilmek amacıyla 2 gr/kg/gün dozunun üzerine çıkıldığında infüzyon 16-24 saat gibi uzun zamana yayılmalıdır (46).

Günlük lipid dozunun 4 gr/kg/gün 'ün üzerine çıkması lipid toksisitesine neden olur. Parenteral beslenme sırasında, hipertrigliseridemi ortaya çıktığı takdirde, her 100ml yağ emülsiyonu için 100 ünite heparin sıvılara eklenir. Heparin lipaz aktivitesini ve yağın klirensini artırır (47). Yağ asidi emülsiyonu alan hastaların çoğunda serum trigliserid ve kolesterol düzeyleri normal seyrederek. Esansiyel yağ asidi yetmezliğinin kimyasal bulguları, yağ içermeyen parenteral beslenmeden 2-3 hafta sonra ortaya çıkar. Bu hastalarda tipik olarak bacak, göğüs ve yüzde pul pul eritematöz, papüler döküntüler gelişir. Hastanın günlük kalori ihtiyacının en az %4'ü linoleik asit olarak verilirse klinik belirtiler düzelir (7).

Elektrolit ve Mineraller

Vücutta alıkoyulan her 1 gr protein için 0.3 gr mineral depo edilir. Vücudun ihtiyaç duyduğu en önemli katyonlar; Kalsiyum, Magnezyum, Potasyum ve Sodyumdur. En önemli anyonlar ise; Fosfor, Sülfür ve Klor'dur (48).

Parenteral beslenme sıvıları içinde 2-4 mEq/lt Sodyum, 3-6 mEq/lt Klor, 2-4 mEq/lt Potasyum, 0.5-1 mMol/lt Fosfor, 0.5-3 mEq/lt Kalsiyum ve 0.5-1 mEq/lt Magnezyum bulunması gereklidir (48).

Vitaminler

A,D,E ve K gibi yağda eriyen ve tiamin, riboflavin, folik asit, vitamin B₁₂, nikotinik asit, biotin, pantotenik asit ve vitamin C gibi suda eriyen vitaminler de hücre metabolizmasının için gerekli olan maddelerdir. Bu vitaminlerin uygun dozları; Askorbik asit 80 mg, Vitamin A 2300 IU, Vitamin D 400 IU, Tiamin 1.2 mg, Riboflavin 1.4 mg, Piridoksin 1 mg, Niasinamid 17 mg, Pantotenik asit 5 mg, Vitamin E 7 mg, Biotin 20 µgr, Folik asit 140 µgr, Vitamin B₁₂ 1 µgr, Vitamin K 200 µgr'dır (7).

Eser Elementler

Flor, çinko, bakır, manganez, krom ve selenyum gibi eser elementler enzim sistemleri, hücre bölünmesi, hücre zarının stabilitesi ve kollagen sentezi için gerekli olduğu bilinen maddelerdir (1). Eser elementlerin günlük miktarları; çinko 100-300 µg/gün, bakır 20 µg/gün, manganez 10 µg/gün, krom 0.05-0.2 µg/gün, selenyum 1.2-2 µg/gün'dür (7). Hazırlanan sıvıya flebitin önlenmesi amacıyla her 1ml için 0.5-1 ünite heparinin eklenmesi gereklidir (49).

Total Parenteral Nutrisyonda İzleme Protokolü

Parenteral beslenme başlamadan önce hastalardan Tam kan tetkiki, serum elektrolitleri, serum demir bağlama kapasitesi, SGOT, SGPT, ALP, bilirubin, protrombin zamanı, açlık kan şekeri, BUN, kreatinin, ürik asit, protein fraksiyonları, kolesterol, trigliserid, serum osmolaritesi, idrar tetkiki, PA akciğer grafisi, EKG çekilmelidir (50).

İlk gün 6-8 saat arayla idrarda şeker/keton tayini ve kan şekeri tayini yapılmalıdır (48). 5-7 günlere kadar: 6 saatte bir kan şekeri, serum elektrolitleri, alınan çıkarılan sıvıların tesbiti ve vücut ağırlığı tayini yapılmalıdır (50).

Hasta stabilize olduktan sonra her gün ağırlık kontrolü, alınan ve çıkarılan sıvılar, elektrolitler tesbit edilmeli, haftada bir trombosit, protrombin zamanı, BUN, kreatinin, SGOT, SGPT, bilirubin, ALP, kalsiyum, fosfor bakılmalıdır. Ayda bir, başlamadan önceki tüm tetkiklerin tekrarı yapılmalıdır (50).

Tromboflebit periferik ven kateterizasyonunun en önemli komplikasyonu olması nedeniyle 48-72 saatte bir değiştirilmelidir (49).

2.1.4. Total Parenteral Nutrisyon Komplikasyonları

Total parenteral beslenme uygulamasıyla gastrointestinal sistem devre dışı bırakılıp besin maddeleri doğrudan dolaşıma verilirken, aşırı alınan maddelerin kontrolü, diğer maddelerin üretilmesi, aktif şekillerine döndürülmeleri gibi birçok doğal mekanizmalar da ortadan kaldırılmış olur (51).

Prematüre ve hasta matur bebeklerin besin ihtiyaçları hakkında yeterli bilgi olmaması, kaynak olarak başvuru standart değerlerin normal matur bebeklerden sağlanmış olması ve bu normların prematüre ve hasta matur bebeklere uygunluk göstermemesi, hesaplanarak verilen miktarın bebek tarafından yeterince kullanılamaması, TPN'un organ sistemleri üzerine olan toksisite nedenlerinin aydınlatılamamış olması ve TPN'un reçetelendirilme, hazırlanma ve hastaya verilmesi

sırasındaki uygulamalar; bebeklerde TPN'a bağılı komplikasyonlara neden olan genel etkenler olarak sıralanabilir (51).

Total parenteral nütrisyon uygulaması sırasında ortaya çıkabilen komplikasyonlar Tablo II'de gösterilmiştir (52).

Tablo 2. TPN komplikasyonları (52).

<p>Kateter komplikasyonları</p> <ul style="list-style-type: none">-Sepsis-Mekanik komplikasyonlar<ul style="list-style-type: none">-Pnömotoraks-Malpozisyon-Hemotoraks-Trombozis / Tromboflebit <p>Sıvı dengesi ile ilgili komplikasyonlar</p> <ul style="list-style-type: none">-Sıvı yüklenmesi / Dehidratasyon <p>Metabolik komplikasyonlar</p> <ul style="list-style-type: none">-Hipo/Hiperglisemi-Metabolik asidoz-Hiperamonyemi-Azotemi-Akciğer komplikasyonları-Hepatobilyer komplikasyonlar-Elektrolit bozuklukları-Vitamin ve eser element eksikliği-Esansiyel yağ asitleri eksikliği
--

Metabolik Komplikasyonlar

İzlemin yetersiz yapıldığı durumlarda oldukça sık rastlanan bu tür komplikasyonlar, parenteral beslenmenin doğru ayarlanması ve dikkatli bir biçimde izlenmesiyle genellikle  z mlenir niteliktedir (7).

Hiperglisemi: Başlangıçta sık meydana gelir. Özellikle çok d şuk doğum ağırlıklı yenidoğanlar risk altındadır. Bu hastalarda insülin salınımı yetersizdir ve insüline karşı artmış direnç vardır (53). Glikozüri 4 pozitif olmadıkça ya da ciddi osmotik diürez gelişmedikçe müdahaleye gerek yoktur (54). Ciddi osmotik diürez, hiperozmolar-hiperglisemik- nonketotik dehidratasyon nedenidir. Parenteral beslenmede hasta stabil haldeyken kan şekeri düzeyinin 200mg/dl olması ya da artmış dozlarda insülin ihtiyaı ortaya çıkması durumunda öncelikle sepsis d ş n lmelidir (7). Çünkü sepsiste glukoz intoleransı gelişir (14).

Hipoglisemi: Total parenteral beslenmenin aniden sonlandırılması durumunda reaktif hipoglisemi sonucu terleme, çift görme, acitasyon ya da konfüzyon ortaya çıkabilir. Yüksek oranda glukoz içeren TPN sonlandırılmak istendiğinde, solüsyonun

dekstroz içeriği öncelikle %10'a indirilmeli ve infüzyon kademeli olarak azaltılmalıdır (7,14).

Hiperkalemi: Total parenteral beslenme uygulanan hastalarda anabolizma yetersizse, verilen potasyum tam olarak kullanılmıyorsa, böbrek fonksiyonları azalmışsa, metabolik asidoz ile birlikte düşük kardiyak output varsa, doku nekrozu ve sistemik sepsis mevcutsa potasyum yükselir (7).

Hipokalemi: TPN alan hastalarda yeni protein sentezi başlar. Bu aşamada intraselüler potasyum gereklidir. Potasyum günlük solüsyona uygun miktarda eklenir. Aksi takdirde hipokalemi gelişir (8).

Diğer nadir görülebilen elektrolit bozuklukları: hipo-hiperkalsemi, hipo-hiperfosfatemi, hipomagnezemi, hiperamonyemi, eser element eksikliğidir (14).

Metabolik Asidoz:

Genellikle klor tuzları içeren proteinlerin metabolize olması nedeniyle ortaya çıkar (14).

Hepatobiliyer Disfonksiyonu:

Total parenteral nütrisyon uygulaması sırasında gelişebilen hepatobiliyer disfonksiyon; şiddeti hastanın yaşıyla ilişkili olan, klinik gidişi ve oluşan patolojik değişiklikleri iyi bilinen, ancak etyopatogenezi tam olarak açıklanamamış majör bir problemidir (15). Bu sendromun hasta ve/veya TPN'ye bağlı faktörler nedeniyle oluştuğu, dolayısıyla patogenezinin multifaktöriyel olduğu kabul edilmektedir (15,55). Hepatobiliyer disfonksiyon TPN uygulanmasından hemen sonra başlayabilir ve erken dönemde klinik ve rutin biyokimyasal bulgu olmayabilir (56).

Yapılan çalışmalar immatür organizmada total safra tuzu havuzunun hacminin, safra tuzlarının karaciğere alımının ve intestinal lümeden safra asitlerinin emiliminin az olduğunu göstermiştir (57). Majör gastrointestinal sistem hastalığı olmayan, enteral beslenmeye eğilimli prematürelde bile TPN'a bağlı kolestaz gelişimi klinik olarak önemli bir problemidir. Bu probleme sahip bebeklerde TPN kesilip oral beslenme başlayınca hepatik disfonksiyon geriye döner (15).

Ancak pediatrik cerrahlar için, gastrointestinal sistem cerrahisi gerektiren yenidoğanlarda uzamış TPN zorunlu olduğundan, TPN'a bağlı kolestaz gelişimi majör klinik problem olarak kalır (56). Uzun süreli TPN (3 ay ve üzeri) uygulanan çocukların %43'ünde, erişkinlerin ise %45'inde kolelithiyazis geliştiği bildirilmiştir (58). Total parenteral nütrisyon uygulanan bebeklerde daha yaygın olarak kolestazis ortaya çıkar,

diğer hepatobiliyer bozukluklar fibrozis, mikronodüler siroz, abdominal psödötümör (şişmiş safra kesesi), safra çamuru, hepatosellüler karsinom ve kolelitiyazistir.

Erişkinlerde ise hepatosellüler hasar (steatozis ve steatonekrozis) baskınken, daha az olarak sırasıyla kolestazis, fibrozis, mikronodüler siroz, safra çamuru, kolelitiyazis, akalküloz kolesistitler gelişir (59).

Sepsis Komplikasyonu:

Sepsis organizmanın enfeksiyona verdiği şiddetli sistemik yanıttır. Bunun ilerlemiş şekline “sistemik inflamatuvar cevap sendromu” da denir. Eğer erken tanınıp tedavi edilmezse sepsis, septik şok, multiorgan yetmezliği ve ölümlerle sonuçlanabilir. Sepsiste oluşan sistemik inflamatuvar yanıtın gram negatif bakterilerin endotoksinlerine ya da gram pozitif bakterilerin lipoteikoik asit-peptidoglikan kompleksine karşı organizmanın verdiği yanıtın sebep olduğu doku hasarının yol açtığı düşünülmektedir. Bakteri ürünleri kana karıştığında daha sonra pek çok fizyolojik bozukluğa yol açacak olan sitokinler aktive olmaktadır. Bu sitokinler; tümör nekrozis faktör (TNF), interlökin 1, interlökin 6, interlökin 8, PAF, interferon- γ dır. TNF, IL 1 ve 6'nın yüksekliğinin sepsisli hastalarda yüksek mortalite ile birlikte olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak bakteri ürünleri ve oluşan sitokinler mikroorganizmaları durdurmak için kompleman ve koagülasyon sistemi aktive olmakta polimorfonükleer lökositler ve kallikrein-kinin sistemi aktive olmaktadır (60).

TNF ve diğer inflamatuvar mediatörler vasküler geçirgenliği artırıp, vasküler tonusu azaltırlar. Bunun sonucunda kapiller kaçak artar, doku perfüzyonu azalır yani şok ortaya çıkar. Olay ilerledikçe doku oksijen kullanımı doku oksijen sunumundan fazla olduğu için, doku hipoksisi, asidoz, myokard yetmezliği, periferik vazokonstriksiyon, solunum yetmezliği gelişir. Diğer sistemlerinde etkilenmesiyle yaygın intravasküler koagülasyon, akut böbrek yetmezliği, akut karaciğer yetmezliği ve santral sinir sistemi fonksiyonlarının bozulmasının ardından ölüm gelişir (14).

Uzun süre total parenteral beslenme uygulaması yapılan hastaların bazılarında sepsis gelişebilir. Sepsis parenteral beslenme uygulamasının en ciddi komplikasyonudur (61).

Parenteral beslenme uygulanan hastalarda sepsis gelişme riski %0,5-4 arasındadır (62). İmmünoşüpresif hastalarda bu rakam daha da yüksektir (63).

Sepsisli hastaların kliniği; ateş, lökositoz, açıklanamayan glukozüri ya da bunların kombinasyonu şeklindedir. Yenidoğanlarda ise letarji, ani gelişen glukoz intoleransı, apne ve bradikardi ataklarının sıklaşması gibi belirtiler gözlenir (15).

Parenteral beslenme uygulamasına başlamadan önce ateş kaynağı iyice araştırılmalıdır. Kontrolsüz bir enfeksiyonun erken dönemlerinde parenteral beslenmeye geçilmemelidir. Sepsisin karaciğeri kolestatik hasara daha duyarlı hale getirdiği gözönünde bulundurulursa, total parenteral beslenme uygulanan hastanın geçirdiği her sepsis atağı karaciğer harabiyeti olasılığını artırmaktadır.

Parenteral beslenme sırasında gelişen sepsisin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Parenteral beslenme uygulanan her hastada sepsis gelişmemekte, sepsis gelişen hastalarda da parenteral beslenme kesilip uygun antibiotik tedavisi verildiğinde hastalar iyileşmektedir.

Diğer Komplikasyonlar:

Kolelithiyazis: Uzun süreli TPN alan hastalarda %43 oranında kolelithiazis, %6-10 oranında da safra çamuru görüldüğü bildirilmiştir. Bu oran kısa barsak sendromunda %100'e yakın olduğundan, geniş barsak rezeksiyonu yapılan hastalara ameliyat sırasında kolesistektomi uygulanması da önerilmektedir (64).

Sonuç olarak, TPN solüsyonlarının steril şartlarda hazırlanması ve hastaya uygulanırken gereken özenin gösterilmesi oluşabilecek komplikasyonları en aza indirir (7).

2.2.TELOMERAZ VE DÜZENLENMESİ

2.2.1. Telomer Nedir ve Tolemerin Görevleri

Telomerler, kromozomların DNA ve protein içeren terminal (uç) bölgeleridir. Diğer kromozomal DNA dizilerinden hem yapısal hemde fonksiyonel olarak farklıdır. Telomerler; kromozomun baş ve son kısmının ilerleyişini stabilize eden DNA-protein kompleksidir (2). Bir hücrenin ne kadar bölüneceğini mevcut telomer uzunluğu belirler. Her bölünmede telomer kısalır, telomeri progresif olarak kısalmış hücre yaşlı konuma geçer ve bölünemez (3).

Telomer sentezinden telomeraz (telomer terminal transferaz veya revers transkriptaz) enzimi sorumludur (2). Telomeraz bir ribonükleoprotein kompleksidir (4). Telomeraz kompleksinin katalitik komponentidir ve Telomeraz aktivitesinin hız sınırlayıcı faktörüdür (5).

Telomer kavramı 1930'ların sonunda ortaya çıkmıştır. Muller ve Mc Clintock sitogenetik yaklaşımlar kullanarak doğal kromozom sonlarının, rastgele DNA kopmalarından farklı olarak, onları uç uca kaynaşmaya karşı koruyan özgün özelliklere

sahip olduklarını bağımsız olarak gözlemlemiştir. Son birkaç yıldır yapılan araştırmalar sayesinde, doğrusal kromozomların uçlarındaki yüksek oranda korunmuş telomer yapılarının tekrarlı DNA zincirleri ve ilişkili proteinlerden oluştuğunu artık bilinmektedir (65). Telomerlerin DNA zinciri, tipik olarak, tandem GT-zengin tekrarlarından, (TTAGGG) insan ve diğer omurgalılarda tek zincirli 3'-uç çıkıntından oluşur (66,67). Elektron mikroskobu ile yapılan gözlemler, tek zincirli 3'-uç çıkıntının çift yönlü telomerik DNA tekrar dizisini in vitro olarak bir D-döngüsü ve T-döngüsü yapısı oluşturmak amacıyla istila ettiğini ortaya koymuştur (68,69). Telomer bağlayıcı proteinler, bu özgün yapıyı koruma ve düzenleme işlevine sahiptir.

Telomerler iki problemi çözmek için bulunmaktadır. Birincisi; kromozom uçlarının replikasyonlarının tamamlanmasına olanak vermek, ikincisi ise bu uçların birbiri ile karışmasını ya da kromozomların iç kısımları ile reaksiyon vermelerini önlemektir (70,71).

Telomeraz enzimi ile gerçekleştirilen telomer sentezi kromozomların uç bölgesinin bütünlüğünü koruması için gereklidir. Telomer içermeyen kırık uçlar disentrik, halkalı veya diğer kararsız yapılar oluşturacak şekilde uç uca eklenebilirler. Bu kararlı ve kararsız yapılar arasındaki farklılıklar, telomerlerin normal kromozom uçlarında bulunan özel yapılar olduğunu göstermiştir. Telomerler DNA replikasyonun düzgünlüğü konusunda sentromer bölgeleri ile aynı derecede önemlidir. Ayrıca çekirdeğin üç boyutlu yapısının kurulmasında da etkili olduğu düşünülmektedir (70-72).

Telomer birçok temel biyolojik fonksiyonların bir parçasıdır. Kromozomları gen oluşumu, uç uca füzyon ve hasarlı DNA olarak tanınmaktan korur. Kromozomların tam çoğalması için bir araç olarak işlev görür. Çekirdek içinde kromozomların fonksiyonel organizasyonuna katkıda bulunur. Gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar ve insan hücrelerinin çoğalma kapasitesini kontrol eden ve yaşlanmaya girmeleriyle ilgili bir moleküler saat olarak hizmet görür (73-76).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda telomerler de bulunan G4-DNA yapıları keşfedilmiştir. G4-DNA yapıları guanin bakımından zengin nükleik asit dizileri olup G-kuadrupleks (G-tetred veya G4-DNA) adı verilen guaninlerin oluşturduğu dört zincirli bir yapıyı ifade etmektedir. G4-DNA'yı stabilize eden ve telomeraz aktivitesini durdurabilen bileşikler kanser tedavisinde ilgi çekmeye başlamıştır. Bu bileşikler G4

kuadrupteks yapıyı stabilize etmek suretiyle telomeraz enziminin telomerlere ulaşmasını engellemektedir (77).

Telomerlerin organizmada az miktarda bulunması nedeniyle total DNA' nın yaklaşık %0,003'ü telomerik DNA'dır. Hücre içinde telomer çekirdekleri zara yakın konumda olup sentromerlerle 180 derece açı oluştururlar. Telomerler homolog kromozomlarla homolog olmayan kromozomlar arasında geçiş sağlarlar (72).

Bugüne kadar çalışılan tüm organizmalarda kromozom uçlarının G ve T 'den oluşan kısa, basit ve tekrar eden zincirler olduğu bilinmektedir. Tekrar edilen bu zincirlerin sayısı kazanılan ve kaybedilen zincirlerle belirlenir (71,72).

Telomerik Proteinler

Kromozomal DNA'nın ucunda bulunan yapıları ile etkileşen kısımlar, telomeraz enzimi ve telomer yapısal proteinleridir. Telomerik DNA tekrarlarına tutunan özel aminoasit dizisine sahip olan proteinler, telomerik kararlılığın sağlanması ve telomer uzunluklarının düzenlenmesine yardım ederler. Telomerlerin, TTAGGG dizi tekrarları ve telomer bağlayıcı proteinlerden oluşan kısmına "telesom"denilmektedir (72).

2.2.2.Telomerik Dizilerin Düzenlenmesi

Telomerik Diziler: Aralarında önemli evrimsel farklılıklar bulunan ökaryotik organizmaların telomer bölgelerindeki DNA dizileri ve yapıları benzerdir. Bu telomer bölgeleri, oldukça basit olan ve arka arkaya tekrar eden özel diziler içerir.

DNA ipliklerden bir tanesi guanin yönünden zengindir; 5' yönüne doğru uzar ve sitozin yönünden olan iplikten daha uzundur. Dışarıya doğru uzantı yapan bu tek iplik kendi üzerinde kıvrılıp, Watson-Crick eşleşmesi göstermeyen, saç tokası şeklinde ve guanozin-guanozin eşleşmesi yapan bir yapı oluşturur (70-72).

Telomer Uzunluğu ve Telomer Kaybı

Telomer uzunluğunu etkileyen genetik ve fizyolojik birçok faktör vardır. Dengeleyici bir mekanizma olmasaydı yarı korumalı (semi konservatif) DNA replikasyonu sonucunda kromozomlar giderek uç kısımlarından kılalacaklar. Telomer uzunluğu ve yaşı arasındaki ilişkiyi aydınlatmak amacı ile farklı yaşlardaki insanlara ait hücrelerden, insan fibroblastlarının ön kültürlerinde ve bazı kanser hücrelerinde

çalışmalar yapılmış; telomer uzunluğunun artan hücre bölünme hızı veya yaşı ile azaldığı anlaşılmıştır (78).

1973 yılında Olovnikov adlı bir araştırmacı, telomer kısalmasının ileride ölüme yol açabileceğini, somatik hücrelerde çoğalmayı sınırlayıp hücre yaşlanmasına neden olabileceği bildirilmiştir (79). Normal memeli somatik hücreleri, *in vitro* koşullarda sınırlı sayıda çoğalır ve maksimum sayı Hayflick limiti olarak anılır (80). Normal insan hücrelerindeki bu kısalma, hücrelerin çoğalma öyküsünü izleyebilen bir moleküler saat olarak görev yapar (79, 81).

Hayflick limitinde, kritik olarak kısaltılmış bir veya daha fazla telomer, replikatif yaşlanma veya mortalite evresi 1 (M1) olarak bilinen kalıcı bir büyüme durmasını tetikler (82-84). Bu evrede telomerlerin kısalması ile kromozomlar kritik boya ulaşırlar. Bu olay hücre döngüsünü durdurur ve yaşlılık programını başlatır. M1 noktası replikatif hayat uzunluğunu temsil eder (80).

P53 gibi kritik bir hücre döngüsü kontrol noktası geninin inaktivasyonu ile replikatif yaşlanmadan kurtulan hücreler, ikinci bir proliferatif blok, noktası olan mortalite evresi 2'ye erişene kadar bölünmeye devam ederler ve telomer kaybı yaşarlar (85-87). Krizden kurtulan ender hücreler çoğu zaman telomerazın aktivasyonu ile telomer uzunluğunu muhafaza edebilmektedir ve bu da sınırsız bir çoğalma kapasitesine, yani hücre ölümüne yol açmaktadır.

Telomerik tekrarlar her hücre döngüsünde kaybedilir; ancak bu tekrarlar telomeraz enziminin etkisiyle kazanılır. Telomeraz, telomerik tekrarları 3' ucundan ekleyerek işlev görür. Telomeraz yokluğunda telomerlerde meydana gelen kayıpları azaltmak için kromozomların 3' ucundaki TnGn zincirlerinin DNA polimeraz enzimleri için iyi kalıp olmaları gereklidir (88).

Telomerlerin keşfi ile kromozom uçlarının kararlı yapıda olmadığı kesinleşmiştir. Kıyılan uçlar uç uca kaynaşabilirler ya da diğer kararlı olmayan kromozom formlarını meydana getirebilirler. Moleküler analizler telomerlerin her bir DNA zincirinin 5' ucunda terminal noktasında kayıp olmadan lineer kromozomal DNA ucunun replikasyonuna izin verdiğini göstermiştir (72).

Hücre bölünmesi sırasında meydana gelen telomerik zincirlerin kaybı kromozomal anomalilere sebep olabilir. Eşey hücreleri yavru hücrelere uzunluğu tam olan kromozomları transfer etmek zorundadırlar. Sperm hücreleri uzun telomer dizilerine sahiptir ve telomer uzunluğunu istikrarlı bir biçimde korumaktadır (89).

2.2.3. Telomeraz ve Yapısı

Telomeraz, telomerik DNA zincirlerini sentezleyen ve neredeyse evrensel olarak sınırsız proliferatif potansiyel için moleküler bir temel sağlayan RNA'ya bağımlı bir DNA polimerazıdır (90). Telomeraz kromozomal uçlarındaki TTAGGG tekrarlarının sentezinden sorumludur (89). İlk kez 1985 yılında *Tetrahymena thermophila*'da keşfedildiğinden bu tarafatelomeraz aktivitesinin çoğu normal insan somatik hücrelerinde bulunmadığı, ancak kanserli hücrelerin %90'dan fazlası ve *in vitro* ölümsüzleştirilmiş hücrelerde bulunduğu saptanmıştır (90-92).

Telomeraz, iki temel bileşenden oluşur: biri telomerik DNA sentezinin şablonu olarak işlev gören işlevsel RNA bileşenidir (insanlarda hTR veya TERC olarak adlandırılır); diğeri ise ters transkriptaz aktivitesine sahip bir katalitik proteindir (hTERT) (93-97). hTR, telomeraz aktivitesine bakılmaksızın tüm dokularda yüksek oranda ifade edilir, kanser hücrelerinde genellikle normal hücrelere göre beş kat daha fazla ifade edilir (98,99). Buna karşılık, insan katalitik bileşeni hTERT'in (mRNA), hücre başına 1 ila 5 örnekten daha az olduğu tahmin edilmektedir ve bu hücrelerdeki telomeraz etkinliği ile yakından ilişkilidir (99).

hTERT genellikle normal hücrelerde baskılanmış ve ölümsüz hücrelerde artmış ve bu da hTERT'in enzim aktivitesinin başlıca belirleyicisi olduğunu düşündürmektedir

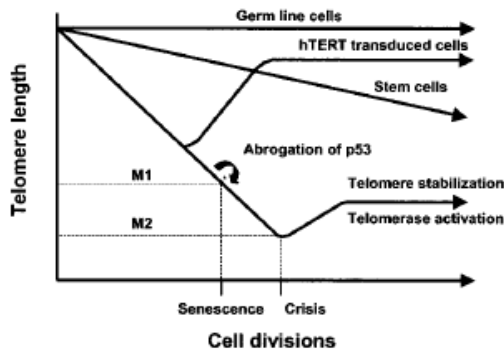
Telomerazın Fonksiyonu

Ökaryotik hücrelerdeki DNA replikasyonunda, lider zincirdeki sentez tek RNA primeri kullanılarak 5' yönünde kesintisiz olarak tamamlanırken, kesikli zincirdeki sentez 8-12 bp'lik RNA primerleri kullanarak "Okazaki fragmanları" şeklinde gerçekleşmektedir. Terminal RNA primerlerinin uzaklaşmasına bağlı olarak yeni sentezlenen yavru zincirin 5' ucunda, -12 bp'lik bir boşluk oluşturmaktadır. Bunu telafi edecek moleküler mekanizmaların yokluğunda, her hücre bölünmesinde kromozomal DNA'nın 3' ucunda, yaklaşık 50-200 nükleotidlik kayıp olmakta ve hücre yaşlanma

gelişmektedir. Telomerlerin 3' ucunda bulunan guanin ve timin yönünden zengin 12-16 nükleotidik uzantının, uzama evresinde kalıp görevi gördüğü düşünülmektedir. Kalıp DNA'nın 3' ucunun normal replikasyon mekanizmasıyla kopyalayamamasına "replikasyon sonu problem" denmektedir. İnsan telomeraz enzimi (hTR), telomerik DNA dizisine komplementer olan 8-30 bazlık kısa bir segmentini, zincirin 3' ucunun uzatılmasında kalıp olarak kullanmaktadır. Telomerazın katalitik alt birimi olan insan telomeraz katalitik alt ünitesi (hTERT), bu diziyeye komplementer GGTTAG dizi tekrarlarını sentezleyerek guanin yönünden zengin olan 3' ucuna ekler. RNA kalıbı, yeni sentezlenen telomerik dizinin 3' ucuna doğru kayar ve DNA polimeraz, telomeraz enziminin sentezlediği bu diziyi kalıp olarak kullanarak, karşı tamamlayan zincirin sentezini gerçekleştirir (67,100).

2.2.4. İnsan Telomerazının Fonksiyonel Kurulumu

Telomeraz aktivitesi, hTR eksprese eden telomeraz negatif hücrelerde, hTERT'nin ektopik ekspresyonu ile in vitro kopyalanmış hTR'den ve in vitro olarak kopyalanmış ve çevrilmiş hTERT den tavşan retikülosit lizatlarında yeniden oluşturulabilir (101,102). İnsan telomeraz aktivitesi hTR ve hTERT birlikte ifade edilerek *Saccharomyces cerevisiae*'de yeniden oluşturulabilir (103,104-106). Bu çalışmalar, hTR ve hTERT'nin telomeraz aktivitesi için asgari şart olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, telomer tekrarlanan amplifikasyon protokolü (TRAP) analizi ile ölçülen telomeraz aktivitesi her zaman in vivo telomerin idamesi anlamına gelmez (91). Fonksiyonel telomerazın kurulumu ve telomerlerin uzaması, muhtemelen diğer telomeraz bileşenlerini ve ilgili proteinleri içeren ve çok bölünmeli bir telomeraz holo enzimini oluşturmak amacıyla gerçekleşen çok basamaklı süreçlerdir.



Şekil 1. Hücresel yaşlanmanın ve ölümsüzleşmenin iki aşamalı hipotezi.

Telomer uzunluğunun telomeraz tarafından muhafaza edildiği germ hücrelerinin aksine, somatik insan hücrelerinin çoğunda telomeraz seviyesi daha düşüktür veya telomeraz negatiftir ve sonuç olarak her bir hücre bölünmesiyle telomer kısalmasına maruz kalır. Pluripotent kök hücreler telomeraz pozitif olmakla birlikte tam telomer uzunluklarını korumazlar. Telomer uzunluğu kök hücrelerde telomeraz negatif somatik hücrelerden daha yavaş kısalır. Kritik oranda kısalmış telomerler, hücrelere Hayflick sınırında veya M1 evresinde yaşlanmaya girme konusunda işaret gönderebilir. Bu proliferatif kontrol noktası pRB / p16 veya p53'ün inaktivasyonu ile aşılabilir. Bu hücreler telomer erozyonuna maruz kalmaya devam eder ve nihayetinde krize veya yaygın hücre ölümüyle karakterize olan M2 evresine girerler. Çok az sayıda yaşamayı sürdüren hücreler sınırsız çoğalma potansiyeli ve telomerazın aktivasyonu ile hemen hemen evrensel olarak istikrarlı telomer uzunluğuna sahip olurlar. Hücreler uygun koşullar altında kültürlendiğinde, hTERT'in ektopik ekspresyonu hücrelerin çoğalma engellerini aşip ölümsüzleşmelerine izin verir (106,107).

Telomerazın RNA Alt Birimi (hTR)

Telomerazın RNA alt bileşeni (hTR), telomerik tekrar sentezi için bir şablon sağlar. İnsanlarda hTR, RNA polimeraz II ile kopyalanır ve 451 nükleotidin olgun bir kopyasını üretmek için 3' ucunda işlenir (93).

Telomeraz ribonükleoprotein mimarilerinin memeli ve alt ökaryotik hücreler arasındaki farklılıkları, biyogenezdeki ve telomeraz birleşimindeki temel farklılıkları yansıtabilir. Görünüşe göre, hTR molekülü içindeki korunmalı alanlar, hTR bağlayıcı proteinlerin tanınma alanlarıdır. HTR molekülü içindeki iki alan (şablon alanları içeren 1 ila 209 nükleotidleri ve kutu H / ACA alanı ve CR4-CR5 alanı içeren 241 ila 330 nükleotidleri), işbirliği yapmaksızın telomerazın (hTERT) katalitik bileşeni ile bağımsız olarak etkileşime girer (108).

Telomerazın Katalitik Alt birimi (hTERT)

Telomerazın katalitik alt-birimi başta *Euplotes aediculatus*'tan p123 olarak biyokimyasal yöntemle saflaştırılmıştır (96). Dizilim analizi, p123'ün ters transkriptaz motifleri içerdiğini ve telomer idamesi için gerekli olan, başta indirgenmiş telomer uzunluğa sahip maya mutantlarının ve yaşlanma fenotipinin genetik taraması ile tanımlanan bir protein olan Est2p mayasına homolog olduğunu ortaya koymuştur (109).

Ters transkriptaz motiflerde tekli aminoasit dizilimlerinin başlaması, *S. cerevisiae*'de telomer kısalması ve yaşlanmaya yol açmakta ve bu motiflerin *in vivo* telomer uzamasının katalizi için önemli olduğunu göstermektedir (110). Telomeraz katalitik alt birimi birkaç özellik ile ayırt edilmektedir; tüm ters transkriptaz motifleri proteinlerin C-terminal yarısında bulunur, T motifi olarak adlandırılan korunmuş bir telomeraza özgü alan, ters transkriptaz motiflerinde sadece N-terminalde bulunur ve büyük bir N-terminal bölgesi muhafaza edilmiş, işlevsel olarak önemli alanlar ihtiva eder (111-114). Hem insanlar hem de *S. Cerevisiae* üzerinde yapılan deneyler telomerazın birden fazla katalitik ve bir RNA alt birimi içeren bir kompleks içinde işlev görebileceğini göstermektedir (108,109,115,116). Muhtemelen telomerlerin telomeraz ile uzatılması, çok adım içeren bir süreci gerektirmektedir ve hTR'nin olgunlaşması, işlenmesi ve biriktirilmesi, nükleer transport, hTERT'nin posttranslasyonel modifikasyonları, ribonükleoprotein birleşimi, substrat tanıma ve C-zincirinin eşgüdümlü sentezi dahil olmak üzere hassas bir biçimde düzenlenir. Bu işlemlerin her birine dahil olan telomeraz ile ilişkili proteinlerin, enzimin tam aktivitesi ve biyolojik fonksiyonu için gerekli olabileceği düşünülmektedir.

Telomerazla İlişkili Proteinler

Tavşan retikülositlerinde hTERT ve hTR'nin birlikte sentezlenmesi, temel telomeraz enzimatif aktivitesini yeniden oluşturmak için yeterli olsa da, bu *in vitro* yeniden yapılanma, aktif enzimin oluşması için gerekli olan diğer faktörlerin bazı *in vivo* gereksinimlerini açık bir şekilde ele almamaktadır, çünkü bu faktörlerin bazıları tavşan retikülositlerinde zaten mevcut olabilir. Gerçekten de, hTERT ile doğrudan ilişkili moleküler şaperonlar Hsp90 ve p23, tavşan retikülositlerinde bulunmaktadır ve telomeraz aktivitesi için gereklidir (103,104,107,117). Hem biyokimyasal hem de genetik araştırmalar, aktif telomerazın biyogenezinde veya birleşmesinde rol oynayabilen ve telomerazın alt tabaka telomerlerine erişmesine aracılık edebilecek veya düzenleyebilecek ek telomeraz alt birimlerinin varlığını ortaya koymuştur (Tablo 3).

Tablo3. İnsan telomeraz ile ilişkili proteinler

TABLE 1. Human telomerase-associated proteins^a

Protein	Interacting region	Function	Reference(s)
hTERT associated			
TEP1	aa 1-350, 601-927	Unknown	16
P23/p90	aa 1-195	Assembly/conformation	108
14-3-3	aa 1004-1132	Nuclear localization	206
hTR associated			
TEP1	nt 1-871	Unknown	97
hGAR1	hTR H/ACA domain	Stability, maturation, localization	55, 195
Dyskerin/NAP57	hTR H/ACA domain	Stability, maturation, localization	55, 167
hNOP10	hTR H/ACA domain	Unknown	168
hNHP2	hTR H/ACA domain	Stability, maturation, localization	195
C1/C2	nt 33-147	Stability, maturation, localization	195
La	nt 1 205, 250 451	Accessibility to telomeres?	68
A1/UP1	nt 1-208	Unknown	67
hStau	nt 64-222	Accessibility to telomeres?	65
L22	nt 64-222	hTR processing, localization?	140

^a aa, amino acids; nt, nucleotides.

hTERT ile ilişkili proteinler: ilk telomeraz ile ilişkili proteinler, *Tetrahymena thermophila*'dan telomeraz aktivitesinin biyokimyasal olarak kesitlenmesi ile tanımlanmıştır (118). İki protein, p80 ve p95, telomeraz aktivitesinin birlikte pürifikasyonu ve telomeraz RNA ile ilişkilendirilerek tanımlanmıştır. Yeni bir araştırmanın sonuçları, p80 ve p95'den yoksun *Tetrahymena* suşlarında, telomeraz aktivitesi ve telomeraz RNA seviyeleri tamamen normal şekilde çalıştığı için bu proteinlerin çekirdek telomeraz bileşenleri olmadığını ve telomeraz ile spontan olmayan şekilde birleşmiş ayrı ribonükleoproteinler olabileceğini düşündürmektedir (119). Bununla birlikte, bağımsız bir araştırmanın sonuçları p80 ve p95 içermeyen hücrelerin hem makro çekirdeklere hem de mikronukleusda telomereleri uzattığını ve mikronukleus genetik içeriklerinin kaybolduğunu göstermiş ve bu telomer uzunluğu idamesinde ve mikronükleer genetik istikrarda p80 ve p95'in bir rol oynadığını düşündürmüştür (117).

Bir maya çift-hibrid elekte yem olarak hTERT'in amino terminalini (amino asitler 1 ila 195) kullanarak, moleküler şeparon p23'ün ilk olarak hTERT ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Daha sonra hem p23 hem de p90, hTERT ile birlikte in vitro olarak memeli hücrelerinde tespit edilmiştir (117). İn vitro olarak sentezlenmiş telomeraz bileşenlerinden fonksiyonel telomerazın oluşturulması için p23 ve p90'un gerekli olduğunun gözlemlenmesi, bu etkileşimlerin işlevsel önemini ortaya koymaktadır. Hsp90 şeparon kompleksi, uygun ribonükleoprotein birleştirme ve aktif telomeraz enziminin oluşumuna yardımcı olmak için insan telomerazıyla fiziksel ve fonksiyonel olarak etkileşime giren ilk bilinen protein grubudur (117). Viral kökenli

diğer ters transkriptazların da hsp70, hsp90 ve p23 ile ilişkili olduğu bilinmektedir, ancak etkileşimleri geçici gibi görünmektedir. Bununla birlikte, son çalışmalar hsp90 ve p23'ün değil hsp70'in insan telomerazıyla kararlı biçimde ilişkili olduğunu göstermiştir (120).

İnsan telomerazı, şablon RNA alt birimi ile ilişkili kalması nedeniyle birçok diğer ters transkriptazdan farklıdır. Telomeraz, hTR şablon bölgesi ile ilişkisi nedeniyle telomerleri tanır ve uzatır ve daha sonra hTR bağı için bir sonraki mevcut konuma geçer. Bu yer değiştirme basamağı, kararlı bir ilişkiye sahip hsp90 ve p23 tarafından aracılık edilen, birleştirilmiş aktif telomerazın uyarılmasının düzenlenmesini gerektirebilir (120).

hTR ile ilişkili proteinler; hTR molekülü içindeki korunan alanların, hTR bağlayıcı proteinler için tanıma bölgeleri olduğu tahmin edilmektedir (121). Yapısal analize uygun olarak, birkaç RNA bağlayıcı proteinin hTR ile etkileşime girdiği gösterilmiştir.

Dört ortak bağ proteinin; hGAR1, diskerin / NAP57, hNOP10 ve hNHP2 hTR ve insan telomerazı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (122-125). Buna ek olarak, toplam nükleer hTR'nin %7 ila 8'i nükleolar fraksiyondan tekrarlanabilir şekilde geri kazanılabilir (126). İlginç bir şekilde, yakın tarihli bir araştırmada, hTERT'in kendisinin bir nükleolar lokalizasyon alanı içerdiğini ve aslında çekirdekçikte lokalize olduğunu gösterilmiştir (127). Nücleusda ki hTR ve hTERT'nin birlikte lokalizasyonu, nücleusun telomeraz ribonükleoprotein biyogenez alanı olabileceği fikrini desteklemektedir. hTR ve telomeraz ile etkileşime giren diğer RNA bağlayıcı proteinler de tespit edilmiştir. Örneğin, La antijeni spesifik olarak hTR ve telomeraz ile etkileşir ve telomer uzunluğunu *invivo* etkiler (128).

Telomerazla ilişkili proteinlerin listesi hâlâ büyümektedir, fakat hTR biyogenezi ve telomeraz montajının çok adımlı süreçlerinde ve telomeraz aktivitesini düzenleyen potansiyel işlevleri ve telomerazın telomerlere kooperatif G-zinciri sentezi için erişebilirliğindeki hassas etkileri henüz bilinmemektedir

2.2.5. Normal ve Kanserli İnsan Hücrelerinde Telomeraz Etkinliği

Telomeraz aktivitesinin varlığını ve seviyesini küçük numune boyutlarında algılayan ve ölçen son derece hassas TRAP analizi, telomeraz aktivitesinin çok farklı normal insan dokularında ve tüm insan tümörleri spektrumunda belirlenmesine imkan vermektedir (91,92). Normal insan hücrelerinde, gelişme sırasında telomeraz etkinliğinin sıkı bir şekilde düzenlendiği gözlemlenmektedir (129). Telomeraz aktivitesi, çoğu somatik hücrede embriyonik farklılaşma sırasında ortadan kalkar, ancak erkek germ hücreleri, aktive edilmiş lenfositler ve bazı kök hücre popülasyonu türleri gibi bazı dokularda aktif halini sürdürür (91,92 ve 129). Telomer hipoteziyle uyumlu bir biçimde, bu normal dokuların yüksek proliferatif potansiyeli, telomer uzunluğunu ve genetik istikrarı korumak amacıyla telomeraz için özel bir ihtiyaç duyacaktır. Telomeraz ekspresyonunun serbest bırakılması doğrudan insanlarda görülen hastalıklarla bağlantılıdır (130). İnsanlardan görülen *dyskeratosis congenita*, tümü sürekli yenilenmeyi gerektiren ve normal olarak yüksek rejeneratif olan cilt, bağırsak ve kemik iliği gibi dokuları etkileyen proliferatif eksikliklerden kaynaklanan çoklu sistem hastalığıdır. *Dyskeratosis congenita*'da oluşan moleküler bir kusur, ya hTR ya da telomeraz RNA ile ilişkili protein diskerin mutasyonları nedeniyle telomeraz işlev bozukluğu ile sonuçlanır (124,131). Etkilenen hastalar normal kişilere göre ciddi biçimde daha kısa telomere sahiptir. *Dyskeratosis congenita*, normal insan büyümesi ve gelişiminde telomerazın önemini doğrudan kanıttır.

Telomeraz bozuklukları hem p53 hem de telomerazdan yoksun geç nesil hayvan modellerinde görüldüğü gibi genetik istikrarsızlığa ve deri kanseri insidansında artışa neden olmaktadır (132,133). Genellikle telomeraz ifade eden hızla bölünen dokulardaki hücrelerin, telomeraz bozukluklarından en ciddi şekilde etkilenecekleri öngörülmektedir. Bu bozukluklarda, her hücre bölünmesiyle daha hızlı ve progresif telomer kaybı, özellikle p53 mutasyonları gelişen, güneşe maruz kalmış ciltte telomerlerin kritik derecede kılınmasına ve kromozom kararsızlığının indüklenmesine neden olur. Gerçekten de, uçtan uca kromozom füzyonları hem *dyskeratosis congenita* hem de geç nesil telomeraz yetersizliği olan farelerde tespit edilmiştir (134).

Bununla birlikte, normal insan somatik hücrelerinin çoğunluğu telomeraz negatiftir ve sınırlı çoğalma kapasitesine sahiptir (135-137). Hücrenin türüne ve kökenine bağlı olan bu sınıra ulaşıldığında, hücreler çoğalmayı kalıcı olarak

durdururlar. Bu tür hücreler bir dizi biyokimyasal ve morfolojik değişikliklere uğrar ancak kültürde uzun süre canlı kalabilirler (138). Yaşlanmanın, çok sayıda onkogenik mutasyon birikiminin önlenmesi için bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak işlev görebileceği öne sürülmüştür (137,139).

Normal insan büyümesi ve gelişimi sırasında, telomeraz aktivitesi spesifik hücre fonksiyonların çoğalma talebini karşılamak üzere düzenlenirken, aynı zamanda da tümör oluşumuna karşı proliferatif engelleri (yaşlanma) korumaktadır. Bugüne kadar, tümör numunelerinin yaklaşık % 90'nın da telomeraz aktivitesi tespit edilmiştir (91,92). Son zamanlarda elde edilen deneysel veriler telomerazın ekspresyonunun, hücrelerin iki proliferasyon engelinden (M1 ve M2) kaçması ve birçok hücre türünün ölümsüzleştirilmesi için yeterli olduğunu göstermektedir (140).

Çeşitli onkogenlerle işbirliği yaparak, telomeraz ekspresyonu, normal insan epitel hücrelerinin ve fibroblastlarının doğrudan karsinojenik dönüşümü ile sonuçlanmaktadır (145). Bu süreçte telomerazın spesifik rolü, sınırsız çoğalma potansiyeli sağlamasıdır. Yeterli miktarda proliferatif kapasiteye sahip genç hücreler kullanılırsa, buna gerek kalmayabilir. Ayrıca ölümsüz hücrelerde telomerazın baskılanması, telomer kısalma ve apoptotik hücre ölümüne yol açar (142-144). Bütün bu gözlemler telomeraz aktivitesinin kanser hücrelerinin hücre ölümsüzleşmesi ve sınırsız çoğalma özelliği için neredeyse evrensel olarak vazgeçilmez bir gereklilik olduğunu ortaya koymaktadır. Telomeraz düzenlenmesinin mekanizmalarının anlaşılması, insan kanserlerinin araştırılması ve yönetimi üzerinde kesinlikle önemli etkilere sahip olacaktır.

2.2.6. İnsanlarda Telomeraz Aktivitesinin Düzenlenmesi

Telomeraz aktivitesinin regülasyonu, transkripsiyon, mRNA birleştirme, hTR ve hTERT'nin olgunlaşması ve modifikasyonları, her bileşenin nakil ve hücre içi lokalizasyonu, aktif telomeraz ribonükleoproteininin birleştirilmesi ve telomerlerde telomeraz ribonükleoproteininin erişilebilirliği ve işlevi dahil olmak üzere çeşitli seviyelerde gerçekleşir. Telomeraz aktivitesinin, doku gelişimi ve homeostaz sırasında belirli fizyolojik koşullar altında modüle edildiğini gösteren birtakım çalışmalar mevcuttur (129,145 ve 146). Büyümeyle ilgili düzenlemeye ek olarak, telomeraz aktivitesi, UV ışınlanması, alfa interferon ve östrojen ve hücre içi sinyaller ile farklılaşma yoluyla düzenlemeye tabidir (97,147-153).

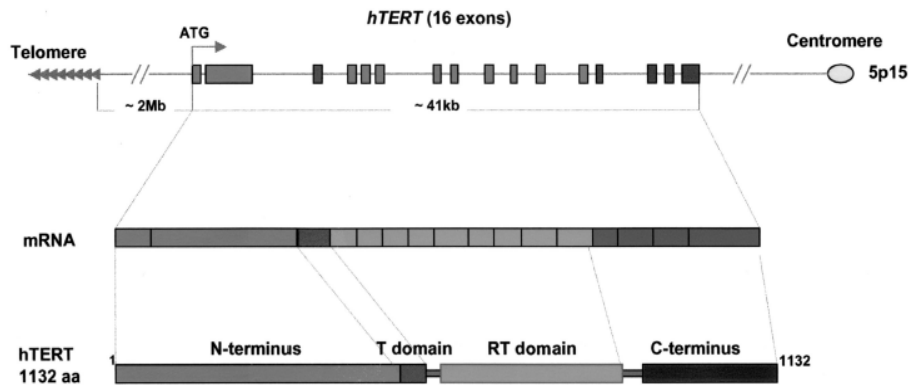
İnsan telomerazının temel bileşenleri arasında, sadece katalitik bileşen hTERT'in, telomeraz aktivitesinin sınırlayıcı belirleyicisi olduğu görülmektedir. Çoğu vakada, hTERT ekspresyonu telomeraz aktivitesi ve kanser başlangıcı ve ilerlemesi ile yakından ilişkilidir. Birçok normal hücrede transkripsiyonel olarak bastırılmış ve ölümsüzleştirme sırasında yeniden başlatılmış veya yukarı doğru düzenlenmiş olduğu görülmektedir. Önemli deneysel veriler, hTERT ekspresyonunun transkripsiyonel düzenlenmesinin, çoğu hücrede telomeraz aktivitesinin aktivasyonunda birincil ve hız sınırlayıcı basamağı temsil ettiğini göstermektedir (97,154-156).

HTERT Geninin Transkripsiyonel Düzenlenmesi

Telomeraz aktivitesi, embriyonik gelişim sırasında birçok dokuda sönük durumdadır (129). hTERT mRNA ve telomeraz aktivitesi arasındaki korelasyon, hTERT geninin transkripsiyonel düzenlenişini yansıtır. hTERT cDNA'sı ortaya çıktığında kısa süre sonra hTERT'in genomik düzenlenmesi sağlanır (154).

hTERT geninin lokalizasyonu ve organizasyonu; insan diploid hücrelerinde hTERT geni, kromozom 5p 'nin kısa kolu üzerindeki en uzak bant olan 5p15.33 kromozom bandında tek bir kopya olarak bulunur (97, 157), (Şekil 2).

Normal insan hücreleri her bir hücre bölünmesiyle oluşan progresif telomer kısalması nedeniyle giderek yaşlanır ve nihayetinde yaşlı konuma geçer. Ancak kanser hücreleri genelde göreceli olarak daha kısa fakat kararlı telomerlere sahiptir (158).



Şekil 2. hTERT geninin gen organizasyonu. İnsan hTERT geni, telomere yaklaşık 2 Mb mesafedeki kromozom 5'in (5p15.33) kısa kolunda bulunan 16 ekson ve 15 introndan oluşur. Centromere doğru kopyalanır. hTERT proteininin spesifik telomeraz alanı (T alanı), ters transkriptaz alanı (RT alanı) ve C-terminal bölgesi gösterilmiştir.

hTERT geni 16 ekzon ve 15 introndan oluşur (154,158). hTERT geni kademeli olarak uç uca eklenmiş ve insan hücrelerinde birçok örneği çıkartılmıştır (98,163-165). Tüm farklı transkriptler insan gelişimi sırasında doku bağımlı ve gebelik yaşına bağlı olarak ifade edilir, ancak sadece tam uzunlukta hTERT transkripti telomeraz aktivitesiyle ilişkilidir (159,160).

hTERT alternatif eklenmiş mRNA'ların işlevleri henüz bilinmemektedir. Bu alternatif eklenmiş transkriptlerin protein ürünleri, eklenmiş bir ürünün potansiyel dominant negatif fonksiyonu harici ekspresyon aracılığıyla gözlemlenmesine rağmen, hücrelerde tespit edilememiştir (162,163). HTERT geni sıklıkla insan tümörleri ve tümör hücre dizilerinde yüksek düzeyde görülür (157,164). Bu, hTERT geninin artmış bir kopya sayısının, ölümsüzleştirilen hücrelerdeki telomeraz ekspresyonunun yukarı düzenlenmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir. İlginçtir ki, ektopik hTERT ekspresyonu, normal insan hücrelerinde telomeraz aktivitesini ve habis fenotipi indüklemeden hücreleri ölümsüzleştirmektedir (101,165-167). Telomerlerin kromozom kararsızlığına katkıda bulunduğu ve anöploidi arttırdığı p53 mutasyonunun ardından telomerazın aktive olduğu tümörlerde hTERT gen amplifikasyonunun daha sık olduğu varsayılabilir.

hTERT transkripsiyon başlatıcısının özellikleri; hTERT'nin transkripsiyonel düzenlenmesinin, insan hücrelerinde telomeraz düzenlenmesinin ana mekanizması olduğu düşünülmektedir. hTERT başlatıcı-lusiferaz habercileri üzerinde yapılan geçici transfeksiyon deneyleri, hTERT başlatıcının normal ve dönüştürülmüş ölümsüzlük öncesi hücrelerde inaktif olduğunu, ancak telomeraz gibi ölümsüz hücrelerde aktive olduğunu göstermektedir (154,156).

HTERT Transkripsiyonunun Aktive Edilmesi

C-myc, proliferasyonu, büyümeyi ve apoptosu destekleyen, iyi tanımlanmış bir onkojendir (158). Yapısındaki veya ifadesindeki değişiklikler ile çok farklı insan kanseri arasında bağlantı bulunmuştur (168). Myc gen ailesi, N terminallerinde aktivasyon alanları ve bir C terminali bHLHZ (bazik-sarmal-döngü-helezon-fermuar) alan içeren transkripsiyonel faktörleri kodlar. Myc, başka bir bHLHZ proteini olan Max ile bir heterodimer oluşturur ve bu heterodimerler, bir E-kutusu olarak adlandırılan 5'-CACG TG sekansını veya hedef gen başlatıcıları üzerindeki ilgili sekansları tanır ve

bunlara bağlanır (169). Myc ailesi transkripsiyon faktörlerinin hedef genleri, hücre döngüsü, büyüme, farklılaşma ve ömür uzunluğunu içeren hücrel işlevlerin birçok yönüyle ilgilidir. Myc'nin transkripsiyonel aktivasyon işlevine, en azından kısmen, bir histon asetil-transferaz kullanımı tarafından aracılık edildiği düşünülmektedir (170). Aşırı ekspresyon, yükseltme, translokasyon ve mutasyon yoluyla c-myc fonksiyonunun serbestleşmesi insan kanserlerinde sıklıkla görülmekle birlikte, c-myc onkojenik fonksiyonunun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz açıklığa kavuşturulmamıştır. Birçok vakada, yüksek proliferatif ve ölümsüz hücrelerde yukarı düzenlendiği ve terminal farklılaşma sırasında aşağı düzenlendiği için, c-myc ekspresyonu hTERT ile paralel gibi görünmektedir. C-Myc'nin normal insan meme epitel hücresinde ve primer fibroblastlarda hTERT ekspresyonunu ve telomeraz aktivitesini indüklediği gösterilmiştir (171). C-Myc'nin hTERT gen ekspresyonunu ve telomeraz aktivitesini aktive etme kabiliyeti, c-myc'ye bağlı hücrel ölümsüzlüğe ve dönüşüme katkıda bulunabilir (172). Menstrüel siklus sırasında normal insan endometriyumunda telomeraz aktivitesi saptanmış ve bununla endometriyal hücrelerin proliferatif aktivitesi arasında sıkı bir korelasyon bulunmuştur (146,173).

Androjenlerin telomeraz etkinliği üzerindeki etkileri insan prostat kanseri hücrelerinde de incelenmiştir. Bu mekanizmalar hakkında araştırmalar devam etmektedir. Steroid hormonların insan telomerazını doğrudan hedeflediği bulgusu, hormon bağımlı dokulardaki tümör oluşumunun moleküler mekanizmalarına ve belki de gelecekte hormona bağımlı kanserlerin klinik yönetimine dair önemli bilgiler verebilir (174).

hTERT transkripsiyonunun baskılanması; Çoğu somatik insan hücresinde telomeraz aktivitesi eksikliğinin hTERT geninin transkripsiyonel olarak baskılanmasından kaynaklandığı ve bu baskının ortadan kalkmasının, çok aşamalı karsinogeneze sırasında görülen ve hücrel ölümsüzlükle ilişkili hTERT ekspresyonunun ve telomeraz aktivitesinin yukarı düzenlenmesiyle sonuçlandığı ileri sürülmüştür. Bu hipotezle uyumlu olarak, normal somatik hücreler ile bazı telomeraz-pozitif ölümsüz hücreler arasındaki hücre füzyonları, telomeraz aktivitenin bastırılmasına neden olur (175,176). Daha önemlisi, spesifik insan kromozomlarının kanser hücrelerine mikro hücreler aracılığıyla aktarılması, hTERT ekspresyonunun baskılanmasına ve telomeraz etkinliğinin aşağı düzenlenmesine neden olur (177). Bu gözlemler, normal hücrelerin hTERT 'ın işlevsel transkripsiyonel baskılayıcılarını eksprese ettiğini göstermektedir.

Belirli bir normal kromozomun bir telomeraz-pozitif hücreye transferinin hTERT ekspresyonunu ve telomeraz etkinliğini baskıladığı gözlemi normal insan hücrelerinin hTERT'nin transkripsiyonel baskılayıcılarını eksprese ettiğini ve bu baskılayıcıların bir tümör bastırma işlevine sahip olabileceğini güçlü bir şekilde öne sürmektedir (177).

hTERT Transkripsiyonunun Negatif Düzenleyicileri

Mad1. C-Myc / Max / Mad ağının üyeleri, normal hücre büyümesi ve gelişiminin kontrolünde merkezi işlevler taşımakta olup, hücresel transformasyon ve apoptozis gibi çeşitli süreçleri düzenlerler (169).

Analiz edilen bir dizi tümör numunesinde, Mad1 ekspresyonunun ya kaybolduğu ya da normal eşlenmiş dokulardaki seviyeye kıyasla saptanamayacak kadar düşük olduğu bulunmuştur (178).

Tümör baskılayıcı protein p53, çeşitli tür hücre hasarına yanıt olarak hücre siklusu arrestini veya apoptozisi indükleyerek tümör oluşumunu engeller (179). Bir transkripsiyon faktörü olarak p53, hücre siklusu, farklılaşma, yaşlanma ve apoptozis ile ilgili birçok spesifik hedef geni düzenlemektedir (180). P53 fonksiyonu, tüm insan kanserlerinin % 50'sinden fazlasında aktif değildir (181,182). Telomeraz aktivitesinin çoğu insan kanserinde ve yüksek proliferatif somatik hücrelerde yukarıya düzenlendiği ve hücre döngüsü sonlanmasında aşağı düzenlendiği ve farklılaşma gerçeği, hücre siklusu regülatörlerinin telomerazın düzenlenmesinde de rol oynayabileceğini göstermektedir.

Telomeraz etkinliği, hücre siklusu sırasında düzenlenmiyor görünse de hücre siklusundan çıkış ve hücresel farklılaşma genellikle insan telomeraz aktivitesinin aşağı düzenlenmesiyle ilişkilidir (183-185). Bunun moleküler temeli henüz anlaşılamamıştır. Birçok farklılaşma indükleyici ve antiproliferatif reaktifler, hTERT transkripsiyonunda doğrudan bir etkiye sahip gibi gözükmektedir (185).

İnterferon- α (IFN- α) iyi bilinen bir hücresel proliferasyon inhibitörüdür ve birçok malignitede antitümör aktiviteye sahiptir (186). IFN- α , hTERT transkripsiyonunu 4 saat içinde bastırmakta ve böylelikle habis ve habis olmayan insan hematopoetik hücre hatları, primer lösemik hücreler ve normal T lenfositlerinde telomeraz aktivitesini

inhibe etmektedir (148). hTERT transkripsiyonunun IFN- α ile baskılanması, IFN- α aracılı hücre büyüme arresti veya c-Myc ekspresyonunun inhibisyonuna bağlı olmadığından, hTERT geninin IFN- α sinyal yolağı için doğrudan transkripsiyonel bir hedef olduğunu düşündürmektedir (186).

Otokrin transforme edici büyüme faktörü 1'in (TGF-1) reseptörünün tekrar eksprese edilmesinden sonra insan kolon karsinoma HCT116 hücrelerinde hTERT ekspresyonunu inhibe ettiği ve TGF-1'in lusiferaz geri dönüşümcü testlerinde hTERT başlatıcı aktivitesini baskıladığı gösterilmiştir (187). TGF-1 mRNA'nın, *in vitro* trofoblast farklılaşması sırasında telomeraz aktivitesinin aşağı düzenlenmesiyle ilişkili olarak önemli ölçüde artar. Son olarak, TGF-1 ile tedavi BeWo insan koryokarsinoma hücrelerini hTERT transkripsiyonunu farklılaştırmak ve bastırmak üzere indükler (183).

Yeni sentezlenen D3 vitamini analogu 5,6-*trans*-16-ene-vitamin D3, prostat, göğüs ve miyeloid lösemik hücrelerin hücre proliferasyonunu ve siklin bağımlı protein kinaz inhibitörleri p21 ve p27'nin yukarı doğru düzenlenmesini engellemiş ve ayrıca hTERT de baskılandığı gözlemlenmiştir (188). U-87MG insan glioblastomalarının büyüme hormonu salınım hormonunun bir antagonisti ile tedavisi telomeraz aktivitesinde ve hTERT mRNA ekspresyonunda azalma ile sonuçlanmıştır (189). Farklılaşma sırasında telomeraz aktivitesinin postmitotik bir terminal duruma geçmesi, muhtemelen belirli gelişimsel yollara bağlanma sırasında ortaya çıkanlardan farklı mekanizmalar içerecektir. F9 embriyo karsinomu ve insan embriyonik kök hücreleri, farklılaşmaya indüklendikten sonra proliferasyonlarını sürdürürler ve bu soyların lusiferaz raportör analizlerinde hTERT ve hTERT başlatıcı aktivitesini baskıladıkları gözlenmiştir (190). Bu, birçok hücrel farklılaşma programının hTERT transkripsiyonel düzenlemeyle bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir (190). Bu ve benzeri transkripsiyon faktörlerinin belirlenmesi, insan telomerazının dokuya spesifik ve gelişimsel düzenlenmesinin mekanizmalarını anlamada faydalı olacaktır. Gerçekten de, kromozom transferi deneyleri, normal insan hücrelerinden alınan birçok insan kromozomunun, telomeraz pozitif kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesini ve hTERT ekspresyonunu baskılayabildiğini göstermektedir (191-193). Böylece, bu baskılayıcılar, telomeraz aktivasyonuna yol açan hücrel ölümsüzleştirme sırasında ekspresyonunu yitirmekte veya aktiviteleri değişmektedir. Genomun epigenetik modifikasyonu, memelilerin gelişimi için gerekli olan genlerin koordineli bir biçimde eksprese olmasını

sağlar. Neredeyse yaşlanmış somatik hücrelerin nükleer transferinden türetilen klonlanmış buzağılarda telomeraz aktivitesinin yeniden aktive edilmesi ve telomer uzunluğunun restorasyonu, yeniden yapılandırılmış embriyoda epigenetik yeniden programlamanın oluşabileceğini göstermektedir (194-196). hTERT'nin transkripsiyonel düzenlenmesi, kuşkusuz hücrelerdeki telomeraz aktivitesinin kontrol edilmesinde birincil mekanizmadır fakat ciddi oranda bulgular hTERT proteininin post-translasyonel modifikasyonlarının telomeraz aktivitesine ek bir katman sağlayabileceğini göstermektedir. Bu bağlamda, normal yumurtalık dokuları ve uterin leiomyoma hücrelerinin, hem hTR hem de tam uzunlukta hTERT mRNA'sını eksprese etmelerine rağmen tespit edilebilir bir telomeraz aktivitesine sahip olmadıkları gösterilmiştir (160). Buna ek olarak, hTERT mRNA'lar, telomeraz aktivitesinin durumundan bağımsız olarak, insan lenfositleri, bademcikler ve periferik kan T ve B hücrelerinde benzer seviyelerde bulunurlar (197). Telomeraz aktivitesi ile hTERT ekspresyonu arasındaki benzer uyumsuzluklar, insan kolon ve böbrek dokusunda ve tümörlerde ve hipoksik ve normoksik kültür koşullarında insan düz kas hücrelerinde de görülmektedir (198-200). Bu veriler, hTERT' nin ekspresyonunun bazı hücre tiplerinde aktif telomeraz üretmek için daima yeterli olmadığını ve hTERT'nin post-translasyonel modifikasyonunun insan telomeraz aktivitesinin aktif ve pasif durumlarını modüle etmede rol oynayabileceğini ortaya koymaktadır. Giderek artan kanıtlar telomeraz aktivitesinin hTERT fosforilasyonu ile düzenlenebildiğini göstermektedir (201).

Telomeraz Holoenzim'in Telomerlere Erişiminin Kontrolü

İnsan telomerleri, proteinlerle bağlı TTAGGG tekrarlarının uzun tandem dizilerinden oluşur (65). Bu yüksek derecede düzenlenmiş telomerik DNA-protein kompleksi, hücrelerin, sadece telomerleri hasar görmüş DNA'lardan ayırmasını, bozunum ve füzyona karşı korunmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda telomeraz erişilebilirliğini düzenleyerek telomerlerin algılamalarını ve kontrol etmelerini sağlar. İnsanlarda telomerler; 75-300 nükleotid uzunluğunda olabilen 3'tek zincirli çıkıntı ile sonlanır(67,202). Bu G-zengin tek zincirli çıkıntı, telomerik DNA dupleksinde, kromozom uçlarını stabilize eden ve koruyan bir yapı olan in vitro bir t-halkası oluşturmak üzere kenetlenir (68,69). In vitro çalışmalar, telomerazın de novo telomer sentezinin erişilebilir bir 3 'çıkıntı gerektirdiğini göstermektedir (203, 204). T döngüsünün oluşması, telomerleri korumak ve aynı zamanda telomerazın erişimini engellemek için yapısal bir çözüm sağlayacaktır. Son birkaç yılda, telomerle ilişkili

proteinlerin ve etkileşen partnerlerinin sayısı giderek artmaktadır (206-208). Toplu olarak, bu telomerik proteinler, telomer bütünlüğünü ve işlevselliğini korumak, DNA hasar onarım aşımını hücrel yaşlanma kontrolleriyle birleştirmek telomerazın telomerlere erişimini düzenlemek gibi işlevler görebilir. İnsan hücrelerindeki telomerlere telomeraz erişiminin nasıl düzenlendiği henüz tam olarak anlaşılammıştır. Son yıllardaki araştırmalar, telomerle ilişkili proteinlerin telomeraz erişimini olumlu ya da olumsuz yönde düzenleyebileceğini göstermektedir (206). İlk tanımlanan telomerik protein terminal sınır fragmanı 1 (TRF1) ve terminal sınır fragmanı 2 (TRF2) (TTAGGG tekrar bağlayıcı faktörler 1 ve 2) dupleks telomerik DNA'ya bağlanır ve t-döngüsü oluşumunda yer alır ve böylece telomer uzunluğunun negatif regülatörleri olarak işlev görür (69,208, 209). TRF1 veya TRF2'nin aşırı ekspresyonu, telomeraz-pozitif hücrelerde telomerin uzamasını engeller (208). Bu gözlem, telomer bütünlüğü ile DNA hasar onarım yolu arasındaki doğrudan etkileşim için moleküler bir temel sağlamaktadır. Telomerlerden endojen TRF1'i uzaklaştıran baskın negatif TRF1'in aşırı ekspresyonu, telomeraz-pozitif hücrelerde telomerin uzamasına neden olur, ancak bu telomeraz negatif hücrelerde görülmez (209, 210).

TRF1, çift zincirli telomerik DNA tekrarları boyunca bağlanır ve telomerazın telomerlere erişimini engelleyebilir. Daha uzun telomerler daha fazla TRF1'e bağlanacağından, telomer uzunluğunu kontrol eden olumsuz bir geri bildirim oluşturabilir ve en azından kısmen, insan telomerazının tercihen en kısa telomerleri nasıl uzatabileceğini açıklayabilir (211).

2.3. ANATOMİ

2.3.1. Over

Basık oval şekilli bir çift organdır. Pelvisin yan kısımlarında fossa ovaria içine yerleşmişlerdir. 2.5-5 cm uzunluk, 1.5-3 cm. genişlik, 4-8 gr ağırlığındadırlar. İç yüzü fimbrialarla örtülüdür ve yuvarlaktır (212). Overler asimetrik olup sağdaki soldakinden daha büyüktür. Pelviste“fossa ovarica” denilen çukurlarda yerleşir (213,214).

Ligamentleri: Overin asıl ligamenti olan utero-ovarian ligament, broad ligamentin arka tabakası ile kuşatılmış kordon şeklinde bir yapıdır. Düz kas ve bağ dokusundan oluşmuştur. Ovarian ligament, overin alt kutbundan uterus yan duvarına kadar uzanır. Mezosalpinkis ile mezoovarium arasında yerleşmiştir (215). Overin asıcı

ligamenti olan infundibulopelvik ligament, fibromüsküler bağ dokusundan oluşan yelpaze şeklinde bir banttır ve içinden overin üst kutbundan pelvis yan duvarına uzanan arter, ven, lenfatikler ve visseral sinirler de yer alır. Bu ligamentin karın boşluğundan pelvis boşluğuna girdiği yer pelvik giriş seviyesinde, ana iliak arter bifurkasyonundan daha yüzeysel, üreterin çaprazladığı yerin hemen lateralindedir (215). Mezoovarium, broad ligamentin arka yüzünden överin ön yüzüne uzanan bir periton kalıntısıdır. Overin damar ve sinirlerinin over hilusuna geçişini sağlar. Mezoovarium, infundibulopelvik ligament ve utero-ovarian ligament birlikte overi destekleyerek onun pelvis duvarındaki konumunu belirler (215,216).

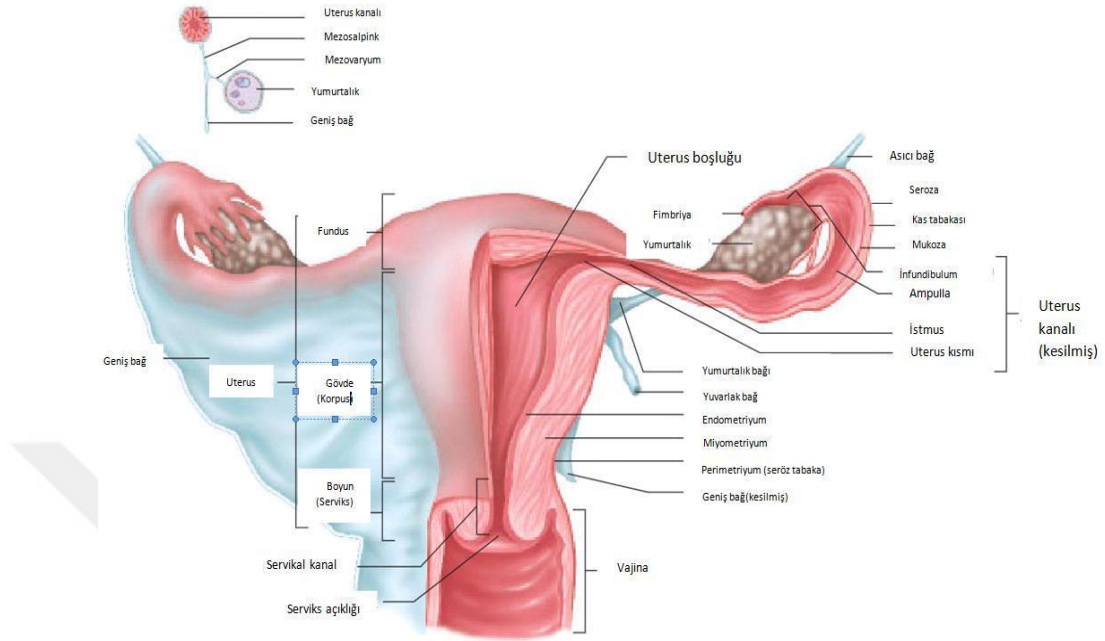
Arterleri: Overler, aortanın anterolateral yüzeyinde renal arterlerin daha altından çıkan ovarian arterler ve uterus arterinin ovarian dalı tarafından beslenirler. Over arterleri aynı zamanda tuba uterinayı, uterusun fundus ve gövdesinin üst bölümünü de beslerler ve uterusun lateral yüzeyinde uterus arteri ile anastomoz yaparlar. Retroperitonda aşağı doğru oblik bir hatta seyreden over arterleri beraberindeki ven, sinir, lenfatik kanal ve üzerindeki peritonla birlikte pelvik giriş seviyesinde infundibulopelvik ligamenti oluştururlar. Karın içerisinde üreterin medialinde ilerleyen bu damarlar pelvik girişinden itibaren üreterin anterolateralinde çok nadiren posteriorunda seyrederek (215,216).

Venleri: Overin venleri, mezoovarium ve infundibulopelvik ligament bölgesinde bir pleksus halinde başlarlar. Bu pleksuslardan önce, ovarian artere bitişik iki ven çıkar, bu iki ven de birleşerek tek ven haline gelirler. Sağdaki ven vena cava inferora, soldaki ven sol renal vene açılır (215,216).

Lenfatikleri: Overin lenfatikleri, teka eksternadan girerek stromayı geçmekte ve hilustaki daha büyük trunkuslara boşalarak pleksus yapmaktadır. Bunlar böbrek alt sınırı hizasında üst paraaortik lenf nodlarına, bir kısmı eksternal iliak, internal iliak ve interaortik lenf nodlarına, bir kısmı ise common iliak ve inguinal lenf nodlarına dökülmektedir (215,216).

İnnervasyonu: Over, sempatik visseral innervasyonunu aortikorenal pleksustan alır. Bununla birlikte, over pleksusu over damarları ile infundibulopelvik ligamente uzandığı için üst ve alt hipogastrik pleksustan da sempatik uyarı alabilir. Overin innervasyonundan sorumlu olan preganglionik sempatik liflerin, spinal T10 ve T11 seviyesinde intermediolateral hücrelerden köken almasına ve torasik splanik sinirlerin içinden karına geçtiğine inanılmaktadır (215). Bu sinirler süperior mezenterik arter

yakınlarındaki ganglionlarla sinaps yapar. Parasempatik lifler, inferior hipogastrik pleksusdan, dolayısı ile S2 ile S4 seviyesindeki pelvik splenik sinirlerde gelir (215).



Şekil 3. Uterus, Vajina, Uterin Tüpler, Yumurtalıklar ve Destekleyici Bağlar (Seeley RR, Anatomy and Physiology, 2004). 26

2.3.2. Testis

Erişkin bir erkeğin testisi 4x3.5x3 cm boyutlarındadır. Testisler ovoid şekilli gonadlardır. Her birinin hacmi 30 ml kadardır. Testisin anterolateral bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür. “Mediastinum testis” olarak adlandırılan krainoposterior kısmından, seminal taşıyıcılar çıkar (217). Testis, tunika albuginea adı verilen kompakt bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bu tabaka; fibroblastlar ve kollojenden yoğun bir yapıdadır. Tunika albuginea ‘nın altında nispeten daha gevşek bağ dokusu yapısında, tunika vasküloza adı verilen damarsal bir tabaka yer alır. Tunika albuginea testisin arkasında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Burada tunika albugineanın iç yüzünden çıkan fibröz septalar testisi yaklaşık 250 adet, piramit biçimli lobullere ayırır. Herbir lobülün içinde bir ile dört arasında değişen sayıda kıvrımlı seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller ise rete testis diye isimlendirilen kanal ağına açılırlar. Tunika albuginea’nın üzerinde peritonun uzantısı olan tunika vaginalis yer almaktadır. Tunika vaginalis iki yapraklıdır. Anteriorda, testise yakın olan ve epididimi çevreleyen kısmına visseral tabaka, daha dışta yer alan kısmına ise pariyetal tabaka adı verilir. Bunların dışında sırasıyla “fascia spermatica

interna”, ”musculus cremaster”, “fascia spermatica externa”, tunika dartos ve cilt yer alır (218). Tüm bu oluşumlar birbirlerine gevşek bağ dokusu ile bağlanmıştır (218). Testisin ana damarı aortanın ön yüzünden ve böbrek arterinin yaklaşık 2-3 cm altından çıkan testiküler arterdir. Bu damar iç kasık halkasına kadar retroperitonda ilerleyip spermatik kord yapıları arasına katılır. Tek veya dallara ayrılan testiküler arter, testis arka yüzünü oblik olarak geçer. Sonra ana dallar bölünerek ilerler ve seminifer tübüller arasında yer alan interlobüler arteriollerini oluşturur. Ana damar, testiküler arter olmasına karşın, kremasterik, vazal ve epididimal arterlerle testiküler arter arasında birçok anastomoz görülebilmektedir (217,218)

Testisin venöz drenajı kapiller ile başlar ve testis dışında “*plexus pampiniformis*”i meydana getirirler. Çoğunlukla iç kasık halkası seviyesinde bu venler birleşerek testiküler veni oluştururlar. Sağ testiküler ven, sağ böbrek veninin 4-5 cm kadar altından vene cava inferiora, sol testiküler ven sol böbrek venine açılır. Testisin innervasyonu asıl olarak sempatik postganglionik ve viseral afferent sinirlerle olmaktadır. Sinirler genelde damarları takip ederek testise ulaşırlar. Testis lenfatikleri, seminifer tübüller etrafında görülmeyen lenfatik kapillerle interlobüler septadan başlar. Daha sonra spermatik kordu takip ederek paraaortik, interaortokaval ve perikaval lenf düğümlerine açılırlar (217,218).

2.4. EMBRİYOLOJİ

Dişi Üreme Sistemi: Embriyoda 7. haftaya kadar gonadda cinsiyet ayrımı yapılamamaktadır. Gonadlar üç kaynaktan gelişmektedir. Çölemik epitelyum, bunun altındaki mezenşim ve primordial germ hücreleri. Beşinci haftada mezonefrozun medialinde çölemik epitelin kalınlaşması ve alttaki mezenşimin proliferasyonu ile plika genitalis meydana gelmektedir. 6. haftada primer seks kordonları denen parmaklı epitelyum kordonları, alttaki mezenşime uzanmakta ve bu dönemde henüz differansiye olmamış gonadda dışta korteks, içte medulla seçilmektedir. 5.ayda seks kordonları, korteksi çok sayıda primitif kortikal lobüllere bölmektedir. Araştırmacıların bir kısmı granuloza hücrelerinin bu seks kordonlarından, diğerleri ise mezenşiminden geliştiğini ileri sürmektedir. Teka interna ve eksterna gibi stromal hücreler ise medulla mezenşiminden köken almaktadır (213,214).

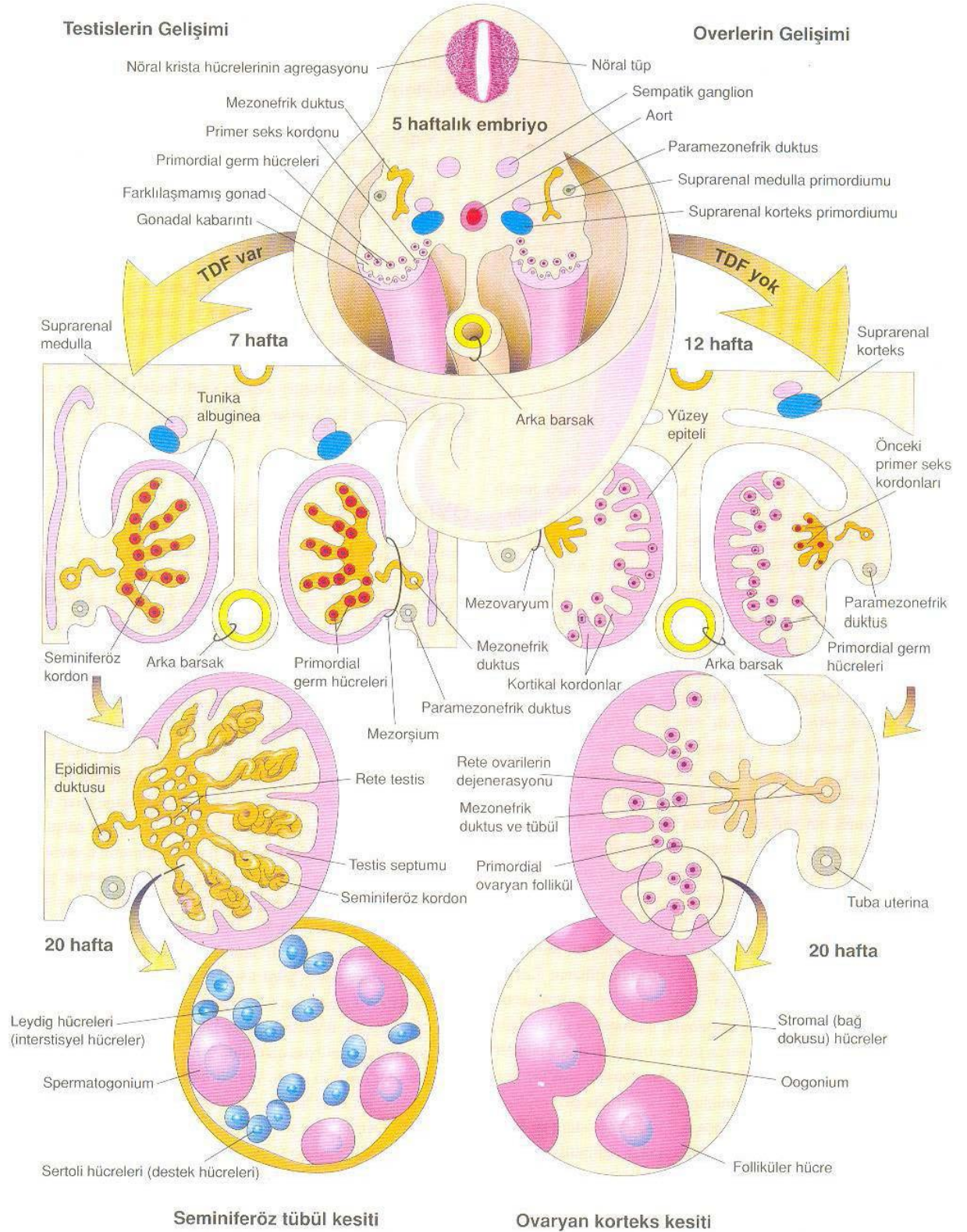
4. Haftada kaudal mezoderm için doğru giren yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki enodermal hücrelerin farklılaşması ile primordial germ hücreleri

oluşmaktadır. Bu hücreler ameboid hareketlerle son barsağın dorsal mezenterinden plika genitalise göç etmektedir (213,214).

Altıncı haftada primordial germ hücreleri mezenşime girmekte, buradaki pregranüloza hücreleri germ hücrelerini sarmakta ve primordial foliküller ortaya çıkmaktadır. Daha sonra oogonia'ya dönüşen germ hücreleri sürekli olarak mitozla çoğalarak, 7-9. Ayda primitif kortikal lobülleri doldurmaktadırlar (213,214).

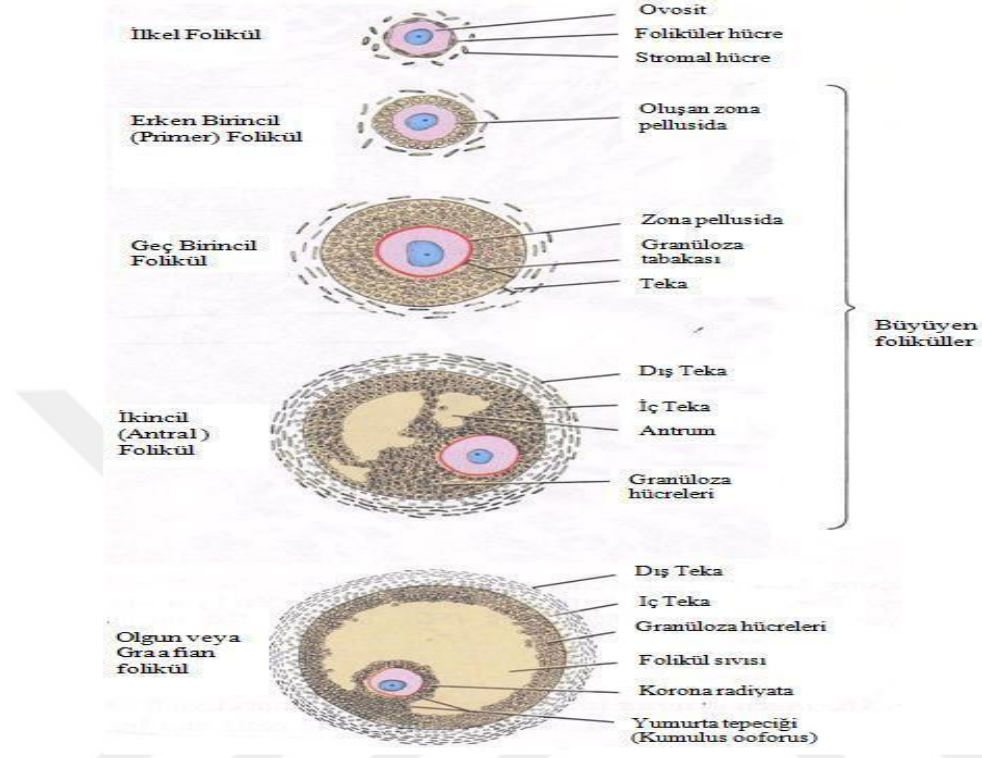
Oogonia, oosite dönüşerek doğumdan önce 1. Mayotik bölünmeye girmekte, ancak puberteye kadar profaz safhasında kalmaktadır. Pubertede, ovulasyon ile 2. mayotik bölünmenin metafaz safhasına kadar ulaşmakta, döllenme olursa 2. mayoz bölünme tamamlanmaktadır.





Şekil 4. Cinsiyet belirlenmesinin özeti (Jameson ve ark., Battle of sexes: new insights into genetic pathways of gonadal development, Trans Am Clin Climatol Assoc., 114: (51-63), 2003)

Overlerde, intrauterin hayatın 6. Haftasında 600 bin germ hücresi, yenidoğanda 2 milyon primer oosit bulunmaktadır. Pubertede ise 30-40 bine düşmekte, bunların sadece 400'ü sekonder oosit haline gelmekte ve ovulasyonla atılmaktadır (213,214).



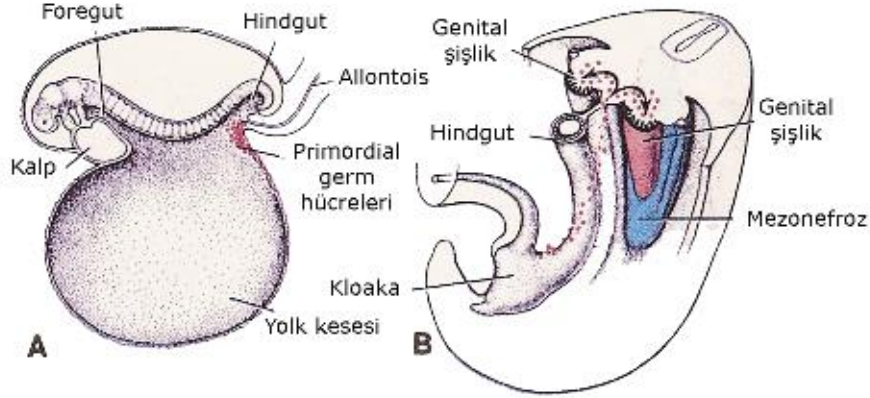
Şekil 5. Folikül gelişim aşamaları (Ross MH, Histology A Text And Atlas, 1995).

Erkek Üreme Sistemi: Embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmakla beraber, gonadların erkek ve dişi morfolojik özellikleri, ancak 7 haftadan sonra gözlenebilir. Primordial germ hücreleri, embriyonik gelişimin erken devrelerinde yolk kesesi duvarında, allontozise yakın bir yerde, endoderm hücreleri arasında belirir; amebik hareketlerle son barsak mezenterinin dorsali boyunca ilerler. 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6 haftada da genital kıvrımları işgal eder. Gonadların over veya testise farklılaşmasında primordial germ hücrelerinin belirleyici etkisi vardır (219).

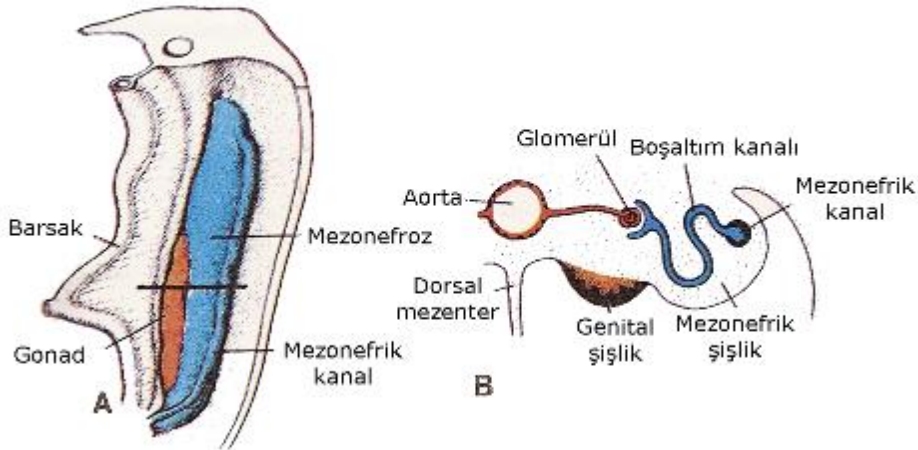
Dördüncü ayda testis kordonları at nalı şeklini alır ve bu at nalının uçları rete testis ile devam eder. Bu durumda artık testis kordonları, primitif germ hücreleri ile bezin yüzeyel epitelinden kaynaklanan Sertoli hücrelerinden oluşmuştur. Fötal Sertoli hücrelerinden salınan “Müllerian İnhibiting Faktör” (MIF)’in yardımıyla paramезonefrik yapılar (Müller kanalı) ortadan kaybolur. (219)

İnterstisyel Leyding hücreleri, gonadal şişkinliğin orijinal mezenşiminden köken alır ve spermatik kordlar arasında yer alarak, bu kordların farklılaşmasından hemen

sonra gelişmeye başlar. Gebeliğin 8. Haftasında, Leyding hücrelerinden testosteron salınımı başlar ve testosteronun etkisiyle mezonefrik yapılar (Wolf kanalı) epididim, seminal bez, vas deferens ve ejakülatör kanal olarak farklılaşır (219,220).



Şekil 6. A. 3 Haftalık embriyoda yolk kesesi duvarında, allontosis bağlantısına yakın bir yerde primordial germ hücrelerini gösteren şematik çizim. B. Primordial germ hücrelerinin, son barsak ve dorsal mezenter boyunca genital kıvrıma doğru giden göç yolu. (Langman's Medikal Embriyoloji'den alınmıştır.)



Şekil 7. A: Genital kabarıklık ve mezonefroz arasındaki ilişkiyi gösteren çizim. B: Mezonefroz ve genital kabarıklıktan A'da belirtilen seviyeden geçen transvers kesit. (Langman's Embriyoloji'den alınmıştır.)

2.5. HİSTOLOJİ

Over: Overin dış yüzü tek sıralı kübik, yer yer psödostratifiye, modifiye peritoneal hücrelerle döşelidir. Kortikal ve medüller stroma sınırı seçilememektedir. İğsi şekilli, vimentin ve aktine karşı immünreaktif stroma hücreleri tipik olarak girdaplar ve stariform patern yapmakta, hücrelerin arasında kortekste daha yoğun olmak üzere retikulum ağı ve kollojen demetleri bulunmaktadır. Stromal hücrelerde yağ, düz kas ve desidual hücre metaplazisi meydana gelebilmektedir (213,214).

Doğumda primordial foliküler korteksi doldurmakta olup erişkinde ise kortekste düzensiz kümeler halindedir. Bunlar tek sıralı ve yassı ve inaktif granuloza hücreleri ile çevrili primer oositin meydana gelmektedir. Oositin nükleusu iri, ince granüler kromatin yapısına sahip, bir veya daha fazla nükleollüdür. Her siklusta folikül stimulan hormon (FSH)'ın etkisi ile 5-12 primer folikül maturasyona başlamakta, ancak bunlardan sadece birisi matür folikül haline gelmektedir. Kalan foliküller dejenere olarak corpus atreticum adı verilen bağ dokusu ile yer değişmektedir (213,214).

Foliküler matürasyonda, ilk olarak oositi çevreleyen granuloza hücreleri kolumnar hale gelerek primer folikül oluşmaktadır. Granuloza hücreleri dar, soluk sitoplazmalı, küçük, yuvarlak veya oval, hiperkromatik nükleuslu olup sitoplazmaları vimentin, sitokeratin ve desmopolkine karşı immünreaktiftir. Bu hücrelerdeki mitotik aktivite sonucu oosit çevresinde 3-5 sıralı konsantrik tabakalanma ortaya çıkmakta, sekonder ve preantral folikül oluşmaktadır. Preantral folikülde granuloza hücrelerinin ürettiği mukopolisakkaritten zengin sıvı ile hücreler arasında küçük boşluklar ortaya çıkmakta, bunlar birleşerek tek bir büyük kavite veya antrum oluşturur (213,214).

Sonuçta tersiyer, antral veya veziküler folikül meydana gelir. Bu dönemde oosit belli bir büyüklüğe ulaşır, folikülün bir kenarına itilmektedir. Granuloza hücreleri "Cumulus Oophorus" u oluşturmak üzere çoğalarak matür folikülü meydana getirirler. Ovulasyondan önce folikül, stigma adı verilen avasküler bir alanda over yüzeyinde dışarı doğru protrüde olmaktadır. Ovulasyonda luteininin hormonun (LH) etkisi ile stigma patlamakta, preovuluar foliküldeki oosit ve çevresindeki hücreler sıvı ile birlikte peritoneal boşluğa atılmaktadır (213,214).

Ovulasyonu takiben folikül kollabe olarak korpus luteum (KL) adı verilen glandüler yapıya dönüşmektedir. KL makroskopik olarak ortalama 1.5-2.5 cm çapında, yuvarlak, ortası gri, yer yer kanamalı kistik kavite halinde, çevresi açık sarı olarak izlenmektedir. KL 'un iki veya daha fazla nükleollü yuvarlak nükleusları bulunmaktadır. Bu hücreler tipik olarak hormon üretmektedir. Teka interna hücreleri büyüyüp, sitoplazmaları genişlemekte ve teka lutein hücreleri adını almakta ve bu hücrelerde hormon üretmektedir (213,214). Fertilizasyon meydana gelirse korpus luteum, gebelik korpus luteumuna dönüşmekte, ovum fertilize olmazsa ovulasyonu takiben 8-9. günde KL dejenere olup corpus albicans adı verilen fibröz skarlara dönüşmektedir (213,214).

Over hilusunda, testisin Leyding hücrelerine benzeyen, çeşitli şekil ve büyüklüklerde kümeler halinde, karakteristik olarak non medullar sinirlere komşu,

sitoplazmalarında homojen, eozinofilik boyanan spesifik Reinke kristloidleri içeren hilus hücreleri bulunmaktadır.

Testis: Testis tunika albuginea adı verilen beyaz, sert ve yoğun fibröz bir doku ile sarılıdır. Bu bağ doku testisin üst yüzeyinde epididim ile testisin birleşim yerinde (mediastinum testis) testis içine uzanan septalar verir. Bu septalarla testis yaklaşık 250 adet lobülusa ayrılır. Her testis lobülusunda sayıları bir ile dört arasında değişen kıvrımlar yapmış seminifer tübüller bulunur. Bu tübüller arasında bağ ve destek dokusundan zengin interstisyel aralık vardır.

Seminifer tübüller mediastinum testiste birleşerek rete testisi yaparlar. Rete testisler de birbiri ile birleşerek eferent duktusları oluşturup kaput epididimise dökülürler. Seminifer tübüller elastik liflerden zengin bağ dokusundan yapılmış bazal membran ile bunun iç yüzünü döşeyen germinatif epitel ve Sertoli hücrelerinden oluşur. Sertoli hücreleri bazal membrana oturmuş ve birbirine sıkı bağlarla tutunmuştur. Bu hücreler sabit sayıda çoğalmayan hücrelerdir. Bazal membran, peritübüler kontraktıl hücreler ve birbirine sıkıca bağlanmış Sertoli hücreleri ile arada kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer spermatogenetik hücrelerin immün sistem hücreleri ile karşılaşmasını önler (221-223).

Sertoli hücreleri tübül lümenine doğru filamentöz sitoplazmik dallanmalar gösterirler ve germ hücreleri bu filamentöz dallanmalar arasında bulunur. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin enerji ihtiyacını karşıladıkları gibi, gelişimin çeşitli evrelerinde oluşan germ hücrelerinin artıklarının fagosite ederler ve folikül uyaran hormon (FSH) reseptörleri taşırlar. Salgıladıkları ürünler ile lümen içinde spermatogenezi kolaylaştırıcı kimyasal bir ortam sağlar (221-223).

Seminifer tübül içinde yer alan ikinci önemli yapı ise germ hücreleridir. Bunlar bazalden lümeneye doğru değişik olgunlaşma aşamalarında dırlar.

İnterstisyumda ise kan damarları, lenfatik kanallar, fibroblastik destek hücreleri, makrofajlar, mast hücreleri ve Leydig hücreleri vardır. Leydig hücreleri lüteinizan hormon (LH) etkisi ile kolesterolden testesteron sentezler (221-223).

2.6. FİZYOLOJİ

Preovulatuvar folikül ve bunun ardından ortaya çıkan KL, en başta östrojen ve progesteron olmak üzere over hormonlarının siklusunu sağlar. Bu hormonlar, ovumun olgunlaşmasını ve endometriumun döllenmiş ovumun yerleşebileceği şekilde hazırlanmasını düzenler. Bu ovarian döngü, gonadotropin relasing hormon (GnRH),

folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) üzerinden yaptığı pozitif ve negatif geri bildirimlerle hipotalamik-hipofizer ve over aksını düzenler (225).

Erkek üreme fonksiyonlarında önemli 3 steroid hormon; testesteron, dihidrotestesteron ve östradioldür. Bunlardan en önemlisi testesterondur. Leydig hücreleri mevcut testosteronun %95 den fazlasının yaparlar. Kalan %5'lik kısım adrenal bezden salgılanır. Testisler, testesterondan başka az miktarda az güçlü androjen olan dihidrotestosteron, zayıf androjen dehidroepiandrosteron ve androstenedion da salgırlar. Leydig hücreleri aynı zamanda az miktarda östradiol, östron, pregnolon, progesteron, 17alfa-hidroksipregnenolon ve 17 alfa-hidroksiprogesteron da salgırlar. Dihidrotestosteron ve östradiol sadece testisten salgılanmaz, periferik dokularda testis ve adrenal glandın yaptığı androjen ve östrojen prekürsörlerinden dönüşerek de oluşurlar. Dolaşımdaki miktarın %80 'i periferik dönüşüm ürünüdür (225).

Androjenler ve östrojenler kanda serbest halde veya serum proteinlerine bağlı halde bulunurlar. Testesteron %38 oranında albümine ve çoğunlukla da "seks hormon binding globülin'e" (SHBG) bağlıdır. SHBG karaciğerden sentezlenir.

Testesteronun % 2'lik kısmı serbesttir. Hücelere girerek metabolik etkilerinin gösterir (224,225).

Erkeklerde androjenlerin birçok etkileri vardır. Fötal hayatta internal ve eksternal genital organların farklılaşmasından sorumludur. Pubertal dönemde skrotum, epididim, vas deferens, seminal vesiküller, prostat ve penis gelişimini sağlarlar. Bu organların fonksiyonel ilişkileri yine androjenlerin etkisiyle oluşur (224,225).

Hipotalamus "Gonadotropin relasing hormon" (GnRH) adında bir peptit salgırlar. Her 90-120 dakikada bir hipotalamo-hipofiziel portal vene salınır. Hipofiz ön lobuna etki ederek,"Luteinizing hormone" (LH) ve daha az olarak da "Follicle stimulating hormone" (FSH) 'in dolaşıma salgılanmasını sağlar. Artan androjen sekresyonu hem hipotalamus hem hipofiz üzerinden LH'nin sekresyonunu inhibe eder. Hipotalamus ve hipofizde androjenler ve östroje için reseptörler vardır (224,225).

Literatürde TPN uygulaması sırasında oluşan komplikasyonlar ve yeni durumlar hakkında çalışmalar mevcuttur ancak TPN ile yaşlanma arasındaki ilişkiyi, gösteren çalışmalara rastlanılmadı. Bu çalışmada TPN nin hücre yaşlanması üzerine olan etkisini göstermek amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada aynı yaşta ve eşit sayıda erkek ve dişiden oluşan, her biri ortalama 2600 ± 500 gr ağırlığında toplam 42 adet yeni *Zellanda* tavşanı kullanıldı. Tavşanlar, İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışma için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alındı. 12 saat gündüz ve 12 saat gece olacak şekilde 23°C de deney ortamı hazırlandı. Tavşanlar deneyden önce ve sonra tartıldı.

3.1. Yöntem

3.1.1. Deney Grupları

Çalışmada kullanılan toplam 42 adet tavşan 3 gruba ayrıldı.

Grup 1: TPN grubu: Bu gruptaki 14 adet tavşana santral venöz kateter yerleştirilip 10 gün TPN verildi. (Tablo IV)

Grup 2: Serum fizyolojik grubu: Bu gruptaki 14 adet tavşana santral venöz kateter yerleştirilip 10 gün 50 cc/kg/gün serum fizyolojik verildi.

Grup 3: Kontrol grubu: Bu grupta bulunan 14 adet tavşana herhangi bir işlem uygulanmadı.

3.1.2. TPN Modeli

Çalışma süresince gruplarda yer alan tavşanların hepsinin oral beslenmesine devam edildi ve su içmelerine izin verildi. Grup 1, Grup 2 daki tavşanların her birinin internal juguler venlerine cut-down yoluyla kateter 0.5×0.5 mm, 45 cm polyethylen catheter (Cavafix, Certo, Braun, Melsungen Germany) yerleştirildi. İşlem ketamin (35 mg/kg İM) (ketalar, Parke-Davis, Ann Arbor, MI, USA) + Xilazin (5 mg/kg İM) (Rompun, Bayer AG, Leverkusen, Germany) anestezisi altında gerçekleştirildi (91).

TPN içeriğindeki ürünler; %10 lipid (Intralipid[®], Fresenius Kabi, Uppsala, Sweeden), %6 aminoacids (Trophamin[®], Eczacıbaşı-BAXTER, İstanbul, Türkiye), %20 Dekstroz[®] (Eczacıbaşı-BAXTER, İstanbul, Türkiye), Addamel TMN (Fresenius Kabi, Uppsala, Sweeden)' den oluşmaktaydı.

Birinci gruptaki tavşanlara kateter takıldıktan 1 gün sonra başlayarak 10 gün boyunca günde 8 saat sürekli infüzyon şeklinde TPN uygulandı.

İkinci gruptaki tavşanlara kateter takıldıktan 1gün sonra 50cc/kg/gün serum fizyolojik 10 gün süresince günde 8 saat infüzyon şeklinde verildi.

Üçüncü gruptaki tavşanlara herhangi bir işlem yapıldı ve normal beslenmelerine devam edildi ve kontrol grubu olarak kabul edildi.

Tablo 4. Tavşanlara uygulanan TPN'nun özellikleri.

Solüsyonlar	Doz (g/kg/g)	Volüm (ml)	Enerji (kcal/g)	Ozmolalite (mOsm/L)
%6 TrophAmine®	4	160	40	525
%20 Dextroz®	18	250	170	1250
%10 İntralipid	2	50	55	280
%0.9 NaCl	(3 mEq/kg)	50	-	310
KCl	(3 mEq/kg)	3	-	-
Mg	(1 mEq/kg)	1	-	-
Eser elementler	-	1	-	-
Ca	(1 mEq/kg)	1	-	-
Total TPN Karışımı		516	365	825

3.1.3. Doku Örneklerinin Alınması

Çalışma sonunda testislerden ve overlerden örnekleri alındı ve tavşanlar sakrifiye edildi. Alınan dokular transversal kesitler olarak iki parçaya bölündü. Doku materyalleri 24 saat süresince %10'luk formalin solusyonu içerisinde fikse edildi. Bu süre içerisinde makroskopik örnekleme ve rutin doku takibi yapıldı ve ondan sonra parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesilerek hazırlanan preparatlar deparafinize edildi, hemotoksilin & eosin ile boyandı ve telomeraz reverse transcriptase ekspresyonu için immunohistokimyasal boyama yapıldı. İmmünohistopatolojik inceleme materyallerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı laboratuvarında iki patolog tarafından yapıldı.

3.2. HİSTOPATOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM VE DEĞERLENDİRME

Over ve testis dokuları %10 buffered formalin ile fiske edildi. Parafine gömüldü ve rutin doku takibi yapıldı. 5 mikronluk kesitler alındı. Slide'ler etüvde 70 derecede 1 saat bekletildi ve xylene'de deparafinize edildi.

Histopatolojik inceleme için hemotoxylin and eosin (H&E) ile boyandı. Telomeraz reverse transcriptase antigen ekspresyonu için TERT antikoru (Biorbyt,

Midland, ON, Canada, polyclonal, orb 11463, 1:300 dilution) ile immünohistokimyasal (IHC) boyama yapıldı

İmmünohistokimyasal boyamada slideslar 5 dakika boyunca peroksidaze giderici (quenching) solüsyonda bırakıldı. Ethylene daimine tetra acetic acid (EDTA) ile ısıtılmadan önce mikrodalgaın içine yerleştirildi. Daha sonra 20 dakika ısıtılmış EDTA içine immüno boyama prosedürü için her bir slidese reagent 4 damla eklenip 15 dakika inkübe edildi ve ondan sonra boşaltıldı.

İnkübe edilmiş slideslere 200 mikrolitre primer antibody solüsyonu (Telomerase reverse transcriptase antibody) (Biorbyt, Midland, ON, Canada, polyclonal, orb 11463, 1:300 dilution) eklendi ve bir gece bekletildi. Slidesler daha sonra yıkandı. 4 damla ikincil kit (üniversal kit) her bir slidese eklendi ve 1 gece bekletildi. Slidesler daha sonra yıkandı ve 4 damla ikincil antibody (üniversal kit) her bir slayta eklendi ve 1 saat inkübe edildi. Son olarak slidesler hemotoksilen ile karşı boyama yapıldı.

Over ve testis doku kesitinde TERT için sadece nüklear veya nükleolar boyama pozitif kabul edildi. IHC skorumla 3 katogoriye ayrıldı ve şu şekilde yapıldı; boyama yoksa negatif, zayıf noktasal nüklear/nükleolar boyanma +1 pozitif, kuvvetli nükleolar boyanma +2 pozitif olarak kabul edildi (Resim1A-D).

3.3. İSTATİKSEL ANALİZ

İstatiksel analiz SPSS Version 12 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) kullanılarak yapıldı. Quantitative data Standard deviasyon (SD)+/- aracılığı ile sunuldu. Qualitative data yüzde ve sayı olarak sunuldu. Qualitative data arasındaki farklar analiz edildi. One-way analysis of variance (ANOVA) multiple quantitative değişkenler arasında karşılaştırmak için kullanıldı. Pearson's correlation coefficient test iki değişkenin çizgisel şekilde birbiriyle olan ilişkisini göstermek için kullanıldı. The chi-squared test teorik veya beklenen oranların dağılımından birtek serideki gözlenen farkların oranların boyutunu belirlemek için kullanıldı. Farklar; $p < 0,05$ önemli, p values $> 0,05$ önemsiz ve $p < 0,01$ yüksek oranda önemli kabul edildi.

4. BULGULAR

Total parenteral beslenme uygulaması sonrası gonadlardaki telomeraz aktivitesindeki değişiklikler, TPN 'nin yaşlanma üzerindeki etkisi ve elde ettiğimiz bulgular aşağıda sunulmuştur.

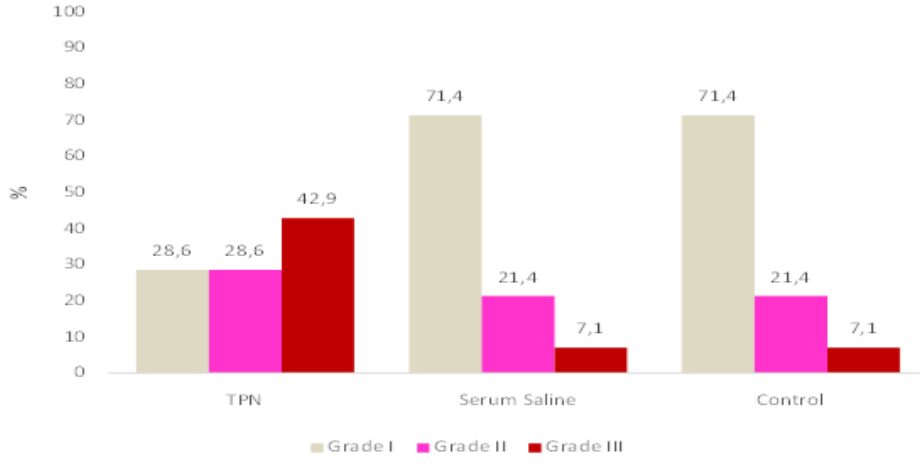
Tüm gruplardaki tavşanların deney başlangıcındaki ağırlıkları (2600 ± 500 gr) ile ve bitimindeki (2550 ± 475) gr ağırlıkları arasında istatistiksel olarak fark yoktu ($p>0.05$).

TERT aktivitesi açısından TPN, Serum Saline ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark vardı ($p<0.05$). Çoklu karşılaştırmalarda ise gonad doku kesitlerinde TPN verilen gruptaki TERT aktivitesi Serum Saline ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli bir artış gösterdiği saptandı (Grade I; %28, %71.4 ve %71.4 Grade 2; %28, %21.4 ve %21.4 Grade 3; %42.9, %7.1 ve %7.1).

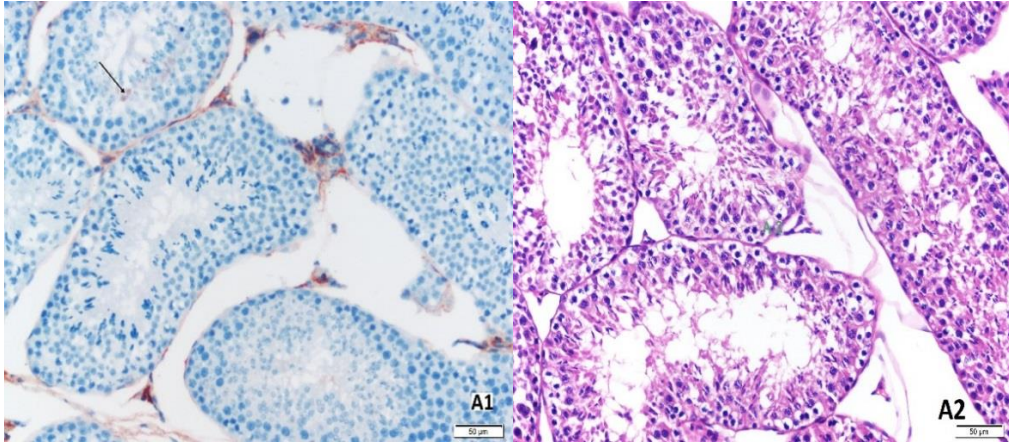
Tablo 5. Gruplar arası TERT aktivitesi

TERT Activity Paint Grade	Groups			P Value
	TPN	Serum Saline	Control	
Grade I	4 (28.6) ^a	10 (71.4) ^b	10 (71.4) ^b	0.048
Grade II	4 (28.6) ^a	3 (21.4) ^b	3 (21.4) ^b	
Grade III	6 (42.9) ^a	1 (7.1) ^b	1 (7.1) ^b	

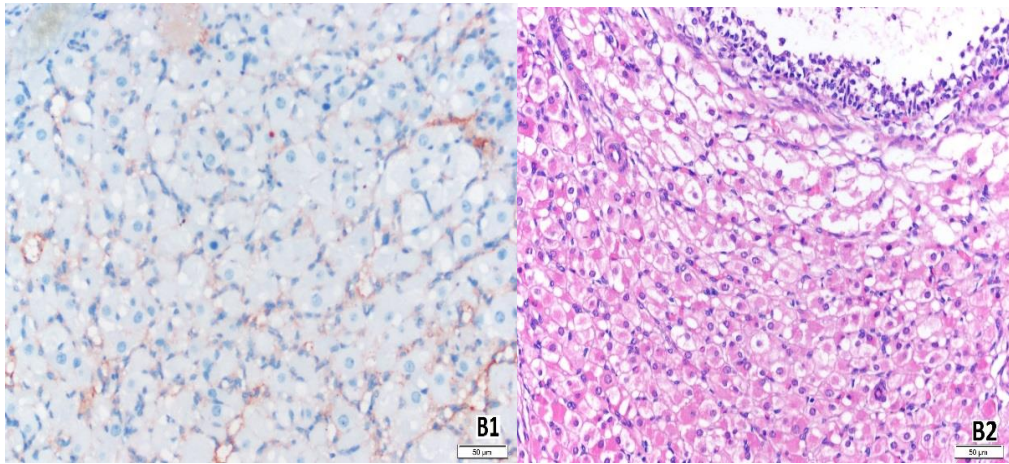
a,b: Different superscript letters indicate significant difference in each row ($p<0.05$); The data are given as n(%).



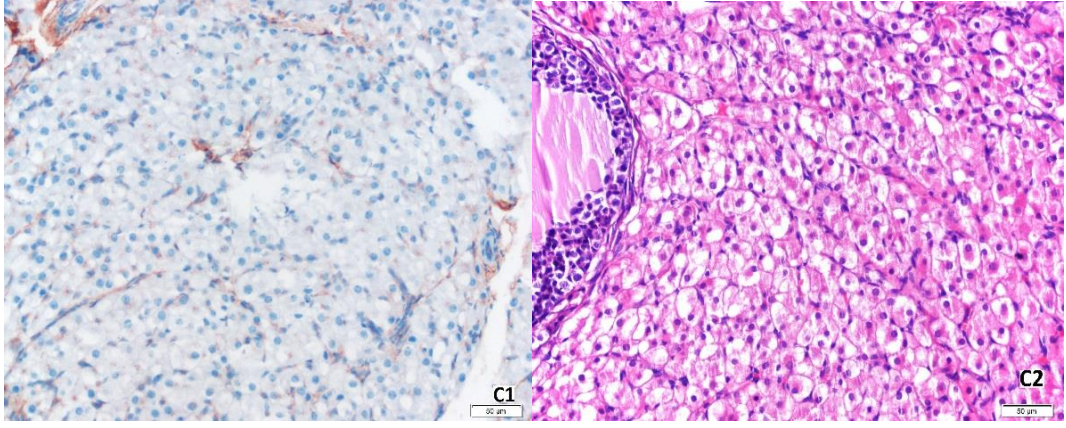
Şekil 8. Gruplar arası TERT aktivitesi grafiği



Resim A1. Kontrol grubu testis dokusu spermatositlerde TERT ekspresyonu soluk nükleer boyanma.
Resim A2. Kontrol grubu testis dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin)

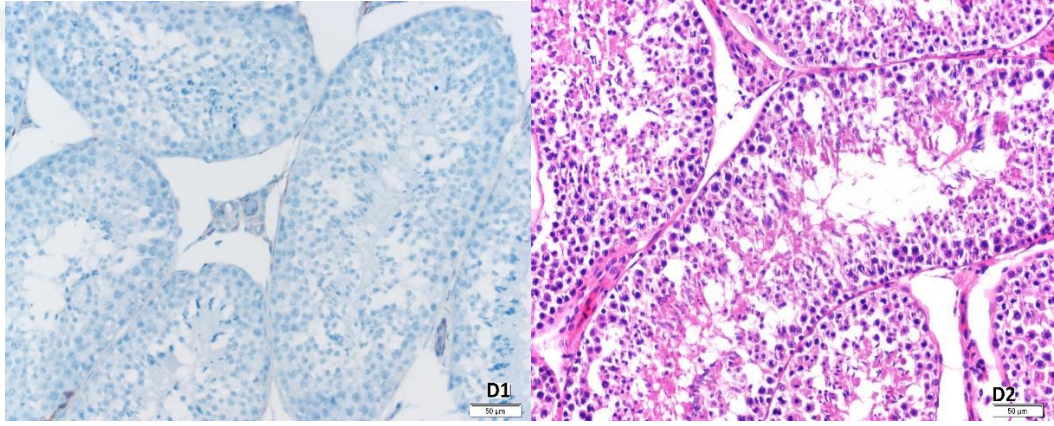


Resim B1. Kontrol grubu over dokusunda non-spesifik stoplazmik TERT ekspresyonu.
Resim B2. Kontrol grubu over dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin)



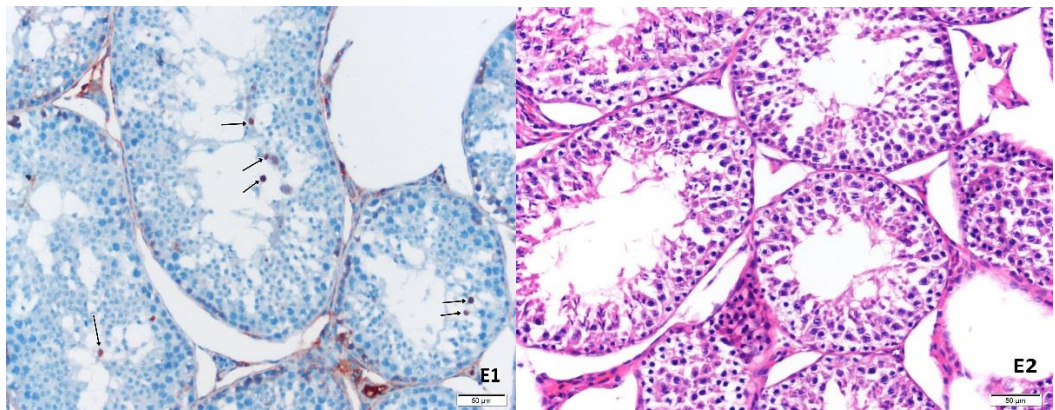
Resim C1. Serum saline grubu over dokusunda non-spesifik stoplazmik TERT ekspresyonu.

Resim C2. Serum saline grubu over dokusunun histopatolojik görünümü, (Hematoksilin ve eozin)



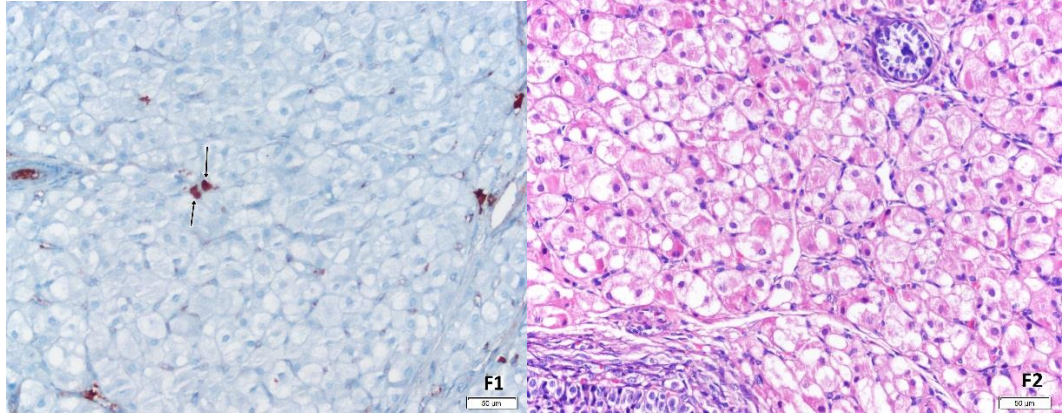
Resim D1. Serum saline grubu testis dokusu germ hücrelerinde negative TERT ekspresyonu.

Resim D2. Serum saline grubu testis dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin)



Resim E1. TPN grubu testis dokusu spermatositlerde kuvvetli nükleer TERT ekspresyonu (ok başı)

Resim E2. TPN grubu testis dokusunun histopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin)



Resim F1. TPN grubu over dokusunda kuvvetli nükleer TERT ekspresyonu (ok başı)

Resim F2. TPN grubu overdokusunun istopatolojik görünümü (Hematoksilin ve eozin)



5. TARTIŞMA

Total parenteral beslenme uygulamasının yaygın bir şekilde kullanılmaya başladığı 1969'dan bu yana enteral yoldan beslenemeyen hastaların mortalitesinde önemli bir düşüş gözlenmiştir (62). Bu düşüş TPN'un popülaritesini artırmakla birlikte uygulama esnasında gelişen komplikasyonlar önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır (15).

Hepatobilyer disfonksiyon en önemli komplikasyonlardan biri olarak vurgulanmıştır (15). Yapılan araştırmalar sonucunda bu etkinin TPN solüsyonunun içeriğinden kaynaklandığı düşünüldü (15).

TPN alan hastalarda mortalite ve morbiditeyi artıran bir diğer önemli komplikasyonda sepsis olarak tesbit edildi (62).

TPN 'nin hücresel düzeyde olan bazı etkileri halen aydınlatılmamıştır. Hücre yaşlanmasını belirleyen telomerler bunlardan biridir.

Telomer birçok biyolojik fonksiyonun parçasıdır. DNA tahribinin tanınması, uc uca füzyonu ve rekombinasyonundan kromozomları korur. Kromozomların tam çoğalması için bir araç olarak işlev görür, çekirdek içindeki kromozomların fonksiyonel organizasyonuna katkıda bulunur, gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar ve hücrelerin çoğalma kapasitesini kontrol eden ve yaşlanmaya girmeleriyle ilgili bir moleküler saat olarak hizmet görür (226).

Telomer kısalmasının replikatif yaşam uzunluğunu kontrol edebileceği ilk kez Olivkinov tarafında 1973'de tespit edilmiştir (74).

Normal dokularda telomerin uzatılmasından sorumlu sistemler bölünme sırasında etkinliklerini sürdüremezler. Bu nedenle telomerler hücre bölünmesi sırasında kısalırlar. Telomer uzunluğu hücrelerin replikatif yaşama süresini belirler. Telomerler kritik uzunluğa kadar kısaldıklarında yaşlanma programı aktive olur (70).

Telomer aktivitesini belirleyen hTERT geninin gen organizasyonu Cong'un çalışmasında gösterilmiştir (226). Telomerler ile ilgili çalışmalar çoğunlukla tümörleri kapsayan çalışmalardır (66,158 ve 226). Telomeraz aktivitesinde artış ve kanser ilişkisi araştırılmış ve kanser de hTERT geninin tek bir hTERT kopyasını taşıyan artan sayıda kromozomlar oluştuğu tesbit edilmiştir (158).

Human papilloma virüsünün keratinosit hücreleri ve meme epitelyum hücrelerinde telomeraz aktivitesini başlatıp artırdığı gösterilmiştir (183).

Steroid hormonların menstrüel siklus sırasında normal insan endometriyumunda Telomeraz aktivitesini artırdığı ve bununla bağlantılı endometrial hücre proliferasyonun artışı arasında sıkı bir korelesyon olduğu iddia edilmiştir (117,125).

Göğüs kanseri, kolon kanseri ve meme kanseri tedavisinde kullanılan nonsteroid bir antiöstrojen ilaç olan Tamoksifen'in telomeraz aktivitesini azalttığı iddia edilmiştir (226).

Andojenelerin telomeraz aktivasyonu yaptığı iddia edilmiş ancak altta yatan mekanizma bilinmemektedir (162).

Çalışmalarda Telomeraz aktivitesinin hTERT in ters protein fosforilasyonu ile düzenlenebileceği periferik kan mononükleer hücrelerinde telomeraz etkinliği protein kinase C (PKC) aktivatörü phorbol miristat asetat ile artırılırken, PKC inhibitörü bisindolymeimid 1 tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (227).

Sigara içmenin deri de telomeraz aktivitesini azalttığı ve deri yaşlanmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (228).

TPN'un hücre yaşlanmasıyla ilgili çalışma yapılmamış olmasına rağmen doku rejenerasyonu ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. TPN ve apoptozis arasındaki ilişkiyi araştıran birçok çalışma vardır.

TPN içindeki lipidler yaşam için gerekli olan yağ asitlerini sağlar. Bununla birlikte lipidler özellikle karaciğer dokusunda hepatositlerde Bcl-2 aracılığıyla mitokondrial etkileşimde bulunup bu yolla apoptozisi indüklediği iddia edilmiştir (155).

Apoptozisi indükleyen 3 ana yol vardır. Bunlar: ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, mitokondrial hasar, hücre çekirdeği kromozomunun tahribidir (228).

Katayama ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada immatür ratlara sürekli TPN verilmesi sonucu hepatik mitokondrilerin oksidatif fosforilasyonunun azaldığı tespit edilmiştir. Bunun sonucunda infantlardaki hepatik disfonksiyona yol açan hepatik apoptozisi indükleyen mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun yol açabileceği yorumu yapılmıştır (85). Wang ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada TPN verilmesi sonrasında karaciğer hücrelerindeki mitokondrilerden Cytochrome C nin salınımının gerçekleşip apoptozisin arttığını tespit etmişlerdir (100). Ayrıca immünohistokimyasal olarak mitokondrial yaralanmanın indirekt markırı olan *ubiquitin* salınımının artışı göstermişlerdir (229).

Bulunan bu sonuçlar TPN nin hücre çekirdeğinde gösterdiği etkilerle ilgili olmayıp mitokondriler üzerinden oluşan apoptozisin indüklenmesi ile alakalıdır. Bu yüzden bizim sonuçlarımızla çelişmemektedir.

TPN'un telomer uzunluğunu etkileyip etkilemediği daha önceden araştırılmamıştır. Bu nedenle biz bu çalışmada TPN uygulamasının telomer fonksiyonlarının çok etkin olduğu gonad dokusu üzerine olan etkisini araştırdık.

Bu çalışmada; hücrelerdeki nükleer ve nükleolar TERT in ekspresyonu, Telomeraz aktivitesi nükleus ve nükleolusta belirgin olduğu için pozitif düşünöldü (66). Sectionların tümünde TERT için sitoplazmik boyanma çalışılıp gösterildi. Buda hücrelerdeki nükleer ve nükleolar lokalizasyondaki TERT proteini barındıran sinyalin yanı sıra mitokondrial olarak bulunan telomerazın aktivitesini de gösteren Saretzki'nin bulgularıyla uyumludur (66).

Bu deneysel çalışmanın sonucunda TPN 'un testis ve over doku hücrelerinde TERT aktivitesini önemli şekilde artırdığı bulduk. TERT aktivitesi kontrol grubunda ve serum saline grubunda mevcut ve TPN grubundan daha düşük olarak tesbit edildi. Mevcut bulgularla TERT aktivitesindeki bu artışla TPN' un hücre yaşlanmasını gonad doku hücrelerinde deneysel olarak azalttığını tesbit ettik. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda TPN un apoptozisi mitokondrilerdeki membran permeabilitesini artırarak bu vasıtaıyla artırdığı bulunmuşsa da biz TPN in gonad hücre çekirdeğinde telomer kinetikleri üzerine olumlu etkiye sahip olduğunu tespit ettik.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Bu deneysel çalışmanın sonucunda TPN'un testis ve over doku hücrelerinde TERT aktivitesini önemli şekilde artırdığı tespit edildi.

2. TERT aktivitesi kontrol grubunda ve serum saline grubunda mevcut ve TPN grubundan daha düşük olarak saptandı.

3. TERT aktivitesindeki bu artışla TPN nin hücre yaşlanmasını gonad doku hücrelerinde deneysel olarak azalttığı bulundu.

4. TPN'nun gonad hücre çekirdeğinde telomer kinetikleri üzerine olumlu etkiye sahip olduğu bulundu.



KAYNAKLAR

1. Demircan M, Ergun O, Coker C. Aluminum in total parenteral nutrition solutions produces portal inflammation in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998, 26 (3): 274-8.
2. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 2001,10:661-73
3. Wright WE, Shay JW. Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet*, 1992, 8: 193-7.
4. Chan CR, Blackburn EH. Telomeraz and Telomeraz. *PhilosTrans R Soc, London B.* 2004, 359: 109-21.
5. Makarov VL, Hirose Y, and Longmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*,1997, 88: 657-66.
6. Buess H. Christopher Wren and the discovery of intravenous injections. *Z Krankenhpf*, 1973, 66: 274-5.
7. Teitelbaum DH, Coran AG. Nutrition. In O'Neill JA, Rowe MI, Grosfeld JL (eds): *Pediatric Surgery*, Mosby, St. Louis, vol 1, ch.10, pp, 1998: 171-96.
8. Kurdoğlu G, Saner G, Sökücü S, Demirkol M, Günöz H. Beslenme ve beslenme bozuklukları.In: Neyzi O, Ertuğrul T, editors. *Pediatric*, 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1993: 2: 431-55.
9. Abina J, Mmelnik G. Fluids, Electrolytes And Body Composition. In: Rombeau JJ, Caldwell MD, ed (s). *Parenteral Nutrition*. Philadelphia: WB Saunders, 1986: 138-43.
10. Kerner J. Parenteral nutrition. In: Walker WA, Durie PR, Hamilton JR, ed (s). *Pediatric Gastrointestinal Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. St Louis MO. Mosby, 1991: 1645-75.
11. Wesley J, Coran A. Intravenous nutrition for pediatric patient. *Seminars inPediatr Surg*, 1992, 3: 212-30.
12. Pereira G, Glassman M: Parenteral nutrition in the neonate. In Rombeau JL, Caldwell MD (eds): *Parenteral Nutrition*. Vol 2. Chap:41, Philadelphia, PA. WB Saunders Company, 1985: 702-20.
13. Quigley E, Marsh M, Shaffer J. Hepatobiliary complications of total parenteral nutrition. *Gastroenterology*, 1993, 104: 286-301.

14. Başaklar C. Çocuklarda parenteral beslenme. *Bebek ve Çocukların Cerrahi ve Ürolojik Hastalıkları*. Palme yayıncılık, 2006: 173-94.
15. Demircan M, Uguralp S, Mutus M, Gurer EL, Atik E, Turhan F, Gursoy MH. The effects of acetylsalicylic acid, interferon-alpha, and vitamin E on prevention of parenteral nutrition-associated cholestasis: an experimental study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1999, 28: 291-5.
16. Gross S, David R, Bauman L. Nutritional Composition of milk produced by mothers delivering preterm. *J Pediatr*, 1980, 96: 641-4.
17. Teitelbaum D, Coran A: Nutritional Support of the Pediatric Surgical Patient. In Ashcraft KW. *Pediatric Surgery*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 2000: 17-37.
18. Jeegeboy K: Enteral and Parenteral nutrition. In Ciretta JM, Taylor RW, Kirby RR. (eds). *Critical Care*, Philadelphia, Lippincot Comp. 1992: 541-62.
19. Gündoğdu H: Total Parenteral Nutrisyon. In İliçin G, Ünal S, Biberoglu K. Akalın S, Süleymanlar G. *Temel İç Hastalıkları Cilt 2*, Ankara, Güneş Kitabevi, Mosby, 1996: 1644-57.
20. Gross S, David R, Bauman L, et al. Nutritional composition milk produced by mothers delivering preterm. *J Pediatr*, 1980,96: 641-4.
21. Zlotkin S, Byran M, Anderson G: Intravenous nitrogen and energy intakes required to duplicate in-utero nitrogen accretion in prematurely born infants. *J Pediatr*, 1981, 99: 115-20.
22. Howard L, Ashley C. Management of complications in patients receiving home parenteral nutrition. *Gastroenterology*, 2003, 124: 1651–61.
23. Freeman J, Goldmann D, Smith N. Association of intravenous lipid emulsion and coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care units. *N Engl J Med*, 1990, 323: 301–8.
24. The Veterans Affairs Total Parenteral Nutrition Cooperative Study Group. Perioperative Total parenteral nutrition in surgical patients. *N. Engl. J. Med*, 1991, 325: 525-32.
25. Grimble R. Fatty acid profile of modern lipid emulsions: scientific considerations for creating the ideal composition. *Clin Nutr*, 2005, 1: 9–15.
26. Yaqoob P. Lipids and the immune response: from molecular mechanisms to applications. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 6: 133-50.

27. Yaqoob P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. *Proc Nutr Soc*, 2004, 63: 89–104.
28. Frukawa K, Yamamori H, Takagi K. Influences of soybean oil emulsion on stress response and cell-mediated immune function in moderately or severely stressed patients. *Nutrition*, 2002, 18: 235-40.
29. Reimund J, Rahmi G, Escalin G. Efficacy and safety of an olive oil-based intravenous fat emulsion in adult patients on home parenteral nutrition. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005, 21: 445–54.
30. Kessler U, Poeschl J, Raz D. Effects of intralipid infusion on blood viscosity and other haemorheological parameters in neonates and children. *Acta Paediatr*, 2004, 93: 1058-62.
31. Wanten G, Kusters A, van Emst-de Vries SE. Lipid effects on neutrophil calcium signaling induced by opsonized particles: platelet activating factor is only part of the story. *Clin Nutr*, 2004, 23: 623–30.
32. Lekka M, Liokatis S, Nathanail C. The impact of intravenous fat emulsion administration in acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169: 638–44.
33. Simirniotis V, Kostopanagiotou G, Vassiliou J. Long chain versus medium chain lipids in patients with ARDS: effects on pulmonary haemodynamics and gas exchange. *Intensive Care Med*, 1998, 24: 1029-33.
34. Wanten G, Roos D, Naber A. Effects of structurally different lipid emulsions on human neutrophil migration. *Clin Nutr*, 2000, 19: 327-31.
35. Naber A. Sense and nonsense of lipids in artificial nutrition. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 2003, 239: 11–14.
36. Thomas-Gibson S, Jawhari A, Atlan P. Safe and efficacious prolonged use of an olive oil-based lipid emulsion (ClinOleic) in chronic intestinal failure. *Clin Nutr*, 2004, 23: 697–703.
37. Wanten G. An update on parenteral lipids and immune function: only smoke, or is there any fire. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2006, 9: 79-83.
38. Reimond J, Scheer O, Muller C. In vitro modulation of inflammatory cytokin production by three lipid emulsions with different fatty acid compositions. *Clin Nutr*, 2004, 23: 1324-32.
39. Calder P. N-3 Polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids*, 2003, 38: 343–352.

40. Morlion B, Torwesten E, Lessire H. The effect of parenteral fish oil on leukocyte membrane fatty acid composition and leukotriene-synthesizing capacity in patients with postoperative trauma. *Metab Clin Exp*, 1996, 45: 1208–13.
41. Scheinichen D, Jankowski M, Ruschulte H. Lack of influence of omega-3 fatty acid-enriched lipids on apoptosis and secondary necrosis of cultured human lymphocytes. *Nutrition*, 2003, 24: 492-501.
42. Schauder P, Rohn U, Schafer G. Impact of fish oil-enriched total parenteral nutrition on DNA synthesis, cytokine release and receptor expression by lymphocytes in the postoperative period. *Br J Nutr*, 2002, 87:103–10.
43. Mayer K, Meyer S, Reinholz-Muhly M. Short-time infusion of fish oil-based lipid emulsions, approved for parenteral nutrition, reduces monocyte proinflammatory cytokine generation and adhesive interaction with endothelium in humans. *J Immunol*, 2003, 171: 4837–43.
44. Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167: 1321–28.
45. Antebi H, Mansoor O, Ferrier C. Liver function and plasma antioxidant status in intensive care unit patients requiring total parenteral nutrition: comparison of 2 fat emulsions. *J Parenter Enteral Nutr*, 2004, 28: 142-48.
46. Greene MG: The Harriet Lane Handbook, 12th ed, ST. Louis. *Mosby Year Book*, 1991, 26: 366-77.
47. Spear M: Effects of heparin 58ort and infusion rate on lipid clearance and bilirubin binding in 58ort he58e infants receiving intravenous fat emulsions. *J Pediatr*, 1988, 112: 94-8.
48. Karabulut B. *Çocuklarda Total Parenteral Nutrisyon Klinik Pediatri* 2003, 2 (1): 17-21.
49. Fabri P. Clinical effects of nonthrombotic total parenteral nutrition catheters. *J Paren Enter Nutr*, 1984, 8: 705-11.
50. Değerli Ü. Emre A. *Genel Cerrahi. Cerrahide Beslenme*, 5. Baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi. 1995: 103-10.
51. Guteher G, Cutz E. Complication of parenteral nutrition. *Seminars in Perinatology*, 1986, 10: 196-9.
52. Bowyer B, Fleming C, Ludwig J. Does long-term home parenteral nutrition in adult patients cause chronic liver disease? *Gastroenterology*, 1984, 86: 1030-3.

53. Varma S, Nickerson H, Cowan J. Homeostatic responses to glucose loading in newborn and young dogs. *Metabolism*, 1973, 23: 1367-75.
54. Hennessey P, Black C, Andrassy R. Nonenzymatic glycosylation of immunoglobulin G impairs complement fixation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 1991, 15: 60-4.
55. Bos A, Tibboel D, Hazebroek F. Total parenteral nutrition associated cholestasis: a predisposing factor for sepsis in surgical neonates? *Eur J Pediatr*, 1990, 149: 351-3.
56. Moss R, Das J, Raffensperger J. TPN-Associated Cholestasis: Clinical and Histopathologic Correlation. *J Ped Surg*, 1993, 28: 1270-75.
57. Russell J, et al. Cholestasis associated with TPN. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986, 5: 9-22.
58. Sitzmann J, Pitt H, Steinborn H. Cholecystokinin prevents parenteral nutrition induced biliary sludge in humans. *Surg Gynecol Obstet*, 1990, 170: 25-31.
59. Fisher R. Hepatobiliary Abnormalities Associated with TPN. *Gastroenterology Clinics of North America*, 1989, 18: 645-67.
60. Anderson M, Blumer J. Advances in the therapy for sepsis in children. *Ped Clin North Am*, 1997, 44 (1): 179-205.
61. Cercenado E, Ena J, Rodriguez-Creixems M. A conservative procedure for the diagnosis of catheter-related infections. *Arch Intern Med*, 1990, 150: 1417-20.
62. King DR, Komer M, Hoffman J, Ginn-Pease M, Stanley ME, Powell D, Harmel RP. Broviac catheter sepsis: the natural history of an iatrogenic infection. *J Pediatr Surg*, 1985, 20: 728-33.
63. Caniano D, Starr J, Ginn-Pease M. Extensive short-bowel syndrome in neonates: outcome in the 1980s. *Surgery*, 1989, 105: 119-24.
64. Nezu R, Takagi Y, Okada A. Role of zinc in surgical nutrition. *J Nutr Sci Vitaminol*, 1992, 26: 530-3.
65. Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 2001, 106: 661-3.
66. Saretzki G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Exp Gerontol*. 2009, 44: 485-92.
67. Wright WE, Tesmer VS, Huffman KE, Levene SD, and Shay JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev*, 1997, 11: 2801-9.
68. Greider CW. Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell*, 1999, 97:419-22.

69. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 1999, 97: 503-14.
70. Atlı K, Bozcuk AN. Telomerler ve Hücresel Yaşlanma. *Geriatrics*, 2002, 5: 11-4.
71. Blasco MA. Telomeres and Human Disease: Aging, Cancer and Beyond. *Nature Reviews; Genetics*, 2005, 6: 611-22.
72. Blackburn E. Structure and Function of Telomeres. *Nature*, 1991, 350: 569-72.
73. De Lange T, Shiu L, Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, and Varmus HE. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol. Cell. Biol*, 1990, 10: 518-27.
74. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres Shorten During Ageing of Human Fibroblasts. *Nature*, 1990, 345: 458-60.
75. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, and Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*, 1990, 346: 866-8.
76. Lindsey J, Mc Gill NI, Lindsey LA, Green DK and Cooke HJ. 1991. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res*, 256: 45-48.
77. Smith JS, Johnson FB. Isolation of G-Quadruplex DNA Using NMM-Sepharose Affinity Chromatography. In Baumann P. (eds), *G-Quadruplex DNA: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Humana Press; 2010, 10.1007/978-1-59745-363-9:13.
78. Olovnikov A. *Theory of Marginotomy*. *J Theor. Biol*, 1973, 41:181-90
79. Harley CB, Vaziri H, Counter C, and Allsopp RC. 1992. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol*, 27: 375-82.
80. Hayflick L, Moorhead PS. The Serial Cultivation of Human Telomerase Activity Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 1961, 25: 585-621.
81. Wright WE, and Shay JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp. Gerontol*, 1992, 27: 383-9.
82. Hara ET, Shinozaki A, Nakada S, and Oda K. 1991. Cooperative effect of antisense-RB and antisense-p53 in the regulation of cellular senescence. *Exp. Cell. Res*, 1991, 179: 528-34.
83. Shay JW, Peirera-Smith O, and Wright WE. A role for both RB and p53 in the regulation of the cellular senescence. *Exp. Cell. Res*. 1991, 196: 33-9.

84. Wright WE, Pereira-Smith OM, and Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell Biol*, 1989, 9: 3088-92.
85. Counter CM, Avilion AA, LeFevre CE, Stewart NG, Greider CG, Harley C, Band Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which Express Telomerase activity, *EMBO J*, 1992, 11: 1921-29.
86. Shay JW, Wright WE, Brasiskyte D, and Van der Haegen BA. E6 of human papillomavirus type 16 can overcome the M1 stage of immortalization in human mammary epithelial cells but not in human fibroblasts. *Oncogene*, 1996, 8: 1407-13.
87. Shay JW, Wright WE. Quantitation of the frequency of immortalization of normal human diploid fibroblasts by SV40 large T-antigen. *Exp. Cell Res*, 1989, 184:109-18.
88. Murray A. *All's Well That Ends Well*, Nature, 1990: 797-8.
89. Morin GB. *Telomere Control of replicative Lifespan*. *Exp Gerontol*. 1997, 32: 375-82.
90. Greider CW, and Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 1985, 43: 405-13.
91. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, and Shay JW. Specific association of human Telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994, 266: 2011-15.
92. Shay JW, and Bacchetti S. A survey of Telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 1997, 33: 787-91.
93. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, et al. The RNA component of human telomerase. *Science*, 1995, 269: 1236-41.
94. Harington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, Bass MB and Robinson MO. Human Telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev*, 1997, 11: 3109-15.
95. Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR and Jefferson RA. Isolation of a candidate human Telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol. Genet*. 1997, 2011-19.
96. Lingnert J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of Telomerase. *Science*, 1997, 276: 561-567.

97. Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, Bacchetti S, Haber DA, and Weinberg RA. hEST2, the putative human Telomerase catalytic subunit gene, is upregulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, 1997, 90: 785-95.
98. Avilion AA, Piatyszek MA, Gupta JL, Shay JW, Bacchetti S and Grider CW. Human Telomerase RNA and Telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.* 1996, 56: 645-50.
99. Yi X, Tesmer VM, Savre-Train I, Shay JW, and Wright WE. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human Telomerase template RNA levels. *Mol. Cell. Biol*, 1999, 19: 3989-97.
100. Dikmen G, Doğan P. *Telomerase ve Kanser*. *Turkiye Klinikleri J. Med. Sci*, 2003, 32: 375-82.
101. Vazir H, and Benchimol S. Reconstitution of Telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol*, 1998, 8: 279-82.
102. Wen J, Cong YS, and Bacchetti S. Reconstitution of wild-type or mutant Telomerase activity in Telomerase-negative immortal human cells. *Hum. Mol. Genet*, 1998, 7: 1137-41.
103. TL Beattie, Zhou W, Robinson MO and Harrington L. Reconstitution of human Telomerase activity in vitro. *Curr. Biol*, 1998, 8: 177-80.
104. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Tayler RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB and Morin GB. Reconstitution of human Telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat. Genet*, 1997, 17: 498-502.
105. Bachand F and Autexier C. Functional reconstitution of human Telomerase expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol. Chem*, 1999, 274: 38027-31.
106. Bachand F, Triki I and Autexier C. Human Telomerase RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 3385-93.
107. Tesmer VM, Ford LP, Holt SE, Frank BC, Yi X, Aisner DL, Ouellette M, Shay JW and Wright WE. Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active Telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. *Mol. Cell. Biol*, 1999, 19: 6207-16.

108. Mitchell JR and Collins K. Human Telomerase activation requires two independent interactions between Telomerase RNA and Telomerase reverse transcriptase. *Mol. Cell*, 2000, 6: 361-71.
109. Lendvai TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B and Lundblad V. Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics*, 1996, 144: 1399-412.
110. Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Weinberg RA. The catalytic subunit of yeast Telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1997, 94: 9202-7.
111. Armbruster BN, Banik SS, Guo C, Smith AC and Counter CM. N-terminal domains of human Telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo. *Mol. Cell. Biol*, 2001, 21: 7775-86.
112. Friedman KL, and Cech TR. Essential functions of aminoterminal domains in the yeast Telomerase catalytic subunit revealed by selection for viable mutants. *Genes Dev*, 1999, 13: 2863-74.
113. Moriarty TJ, Huard S, Dupuis S and Autexier C. Functional multimerization of human Telomerase requires an RNA interaction domain in the N-terminus of the catalytic subunit. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 1253-65.
114. Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, and Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science*, 1997, 277: 955-9.
115. Beattie TL, Zhou W, Robinson MO and Harrington L. Functional multimerization of the human Telomerase reverse transcriptase. *Mol. cell. Biol*, 2001, 21: 6151-60.
116. Wenz C, Enenkel B, Amacker M, Kellher C, Damm K, and Lingner J. Human Telomerase contains two cooperating Telomerase RNA molecules. *EMBO J*. 2001, 20: 3526-34.
117. Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE and White MA. Functional requirement of p23 and Hsp90 in Telomerase complexes. *Genes Dev*, 1999, 13: 817-26.
118. Collins K, Kobayashi R and Grider CW. Purification of *Tetrahymena* Telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell*, 1995, 81: 677-86.
119. Mason DX, Autexier C and Grider CW. *Tetrahymena* proteins p80 and p95 are not core Telomerase components. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 12368-73.

120. Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, Elmore LW and Holt SE. Stable e of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human Telomeraz. *J. Biol. Chem*, 2001, 276: 15571-4.
121. Chen JL, Blasco MA, and Greider CW. Secondary structure of vertebrate Telomeraz RNA. *Cell*. 2000, 100: 503-14.
122. Dez C, Henras A, Faucon B, Lafontaine D, Caizergues-Ferrer M and Henry Y. Stable expression in yeast of the mature form of human Telomeraz RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29: 598-603.
123. Dragon F, Pogacic V and Filipowicz W. In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar ribonucleoproteins reveals unique features of U17 and Telomeraz RNAs. *MolCellBiol*, 2000, 20: 3037-48.
124. Mitchell JR, Wood E and Collins K. A Telomeraz component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, 1999, 402: 551-5.
125. Pogacic V, Dragon F and Filipowicz W. Human H/ACA small nucleolar ribonucleoproteins and Telomeraz share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol. Cell. Biol*. 2000, 20: 9028-40.
126. Mitchell JR, Cheng J and Collins K. A box H/ACA small nucleolar RNA -like domain at the human Telomeraz RNA 3' end. *Mol. Cell Biol*, 1999, 19: 567-76.
127. Etheridge KT, Banik SS, Armbruster BN, Zhu Y, Terns RM, Terns MP and Counter CM. The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human Telomeraz. *J. Biol. Chem*. 2002, 15: 15.
128. Ford LP, Shay JW and Wright WE. The La antigen associates with the human Telomeraz ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. *RNA*. 2001, 7: 1068-75.
129. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byred W and Shay JW. Telomeraz activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet*, 1996, 18: 173-9.
130. Marciniak R and Guarente L. Human genetics. Testing Telomeraz. *Nature*, 2001, 413: 370-371-3.
131. Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, and Dokal I. The RNA component of Telomeraz is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*, 2001, 413: 432-5.

132. Blasca MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdrop PM, DePinho RA and Greider CW. Telomere shortening and tumor formation by Mouse cells lacking Telomeraz RNA. *Cell*, 1997, 91: 25-34.
133. Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, Greider CW, and DePinho RA. Essential role of Mouse Telomeraz in highly proliferative organs. *Nature*. 1998, 392:569-74.
134. Artandi SE, and DePinho RA. Mice without Telomeraz: what can they teach us about human cancer? *Nat. Med.* 2000, 6: 852-5.
135. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*, 1965, 37: 614-36.
136. Shay JW and Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol Cell Biol*, 2000, 1: 72-6.
137. Wright WE and Shay JW. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev*, 2001,11: 98-103.
138. Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*,1990, 249: 1129-33.
139. Sager R. Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ Health Perspect*, 1991, 93: 59-62.
140. Harley CB. Telomeraz is not an oncogene. *Oncogene*, 2002, 21: 494-502.
141. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW and WeinbergRA. Creation of human tumour cell with defined genetic elements. *Nature*. 1999, 400: 464-8.
142. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, and Weinberg RA. Inhibition of Telomeraz limits the growth of human cancer cells. *NatMed*, 1999, 5: 1164-70.
143. Herbert B, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW and Corey DR. Inhibition of human Telomeraz in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 14276-81.
144. Zhang X, Mar V, Zhou, Harrington L and Robinson MO. Telomere shortening and apoptozis in Telomeraz-inhibited human tumor cells. *Genes Dev*, 1999, 13: 2388-99.
145. Hiyama K, Hirai Y, Kyoizumi S, Akiyama M, Hiyama E, Piatyszek MA, Shay JW, Ishioka S and Yamakido M. Activation of Telomeraz in human lymphocytes and hematopoietic cells. *J.Immunol*, 1995, 155: 3711-5.

146. Kyo S, Takakura M, Kohama T and Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res*, 1997, 57: 610-4.
147. Hande MP, Balajee AS and Natarajan AT. Induction of Telomerase activity by UV-irradiation in Chinese hamster cells. *Oncogene*, 1997, 15: 1747-52.
148. Xu D, Erickson S, Szeps M, Gruber A, Sangfelt O, Einhorn S, Pisa P and Grandt D. Interferon alpha downregulates Telomerase reverse transcriptase and Telomerase activity in human malignant and nonmalignant hematopoietic cell. *Blood*, 2000, 96: 4313-8.
149. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y, Orimo A, and Inoue M. Estrogen activates Telomerase. *Cancer Res*, 1999, 59: 5917-21.
150. Misiti S, Nanni S, Fontemaggi G, Cong YS, Wen J, Hirte HW, Piaggio G, Sacchi A, Pontecorvi A, Bacchetti S and Farsetti A. Induction of hTERT expression and Telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 3764-71.
151. Greenberg RA, Altopp RC, Chin L, Morin GB and De RA. Expression of Mouse Telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*, 1998, 16: 1723-30.
152. Xu D, Gruber A, Bjorkholm M, Peterson C, and Pisa P. Suppression of Telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in differentiated HL-60 cells: regulatory mechanisms. *BrJ Cancer*, 1999, 80: 1156-61.
153. Zhang W, Piatyszek A, Kobayashi T, Estey E, Andreeff M, Deisseroth AB, Wright WEA and Shay W. Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: inhibition of Telomerase activity by differentiation-inducing agents. *Clin Cancer Res*, 1996, 2: 799-803.
154. Cong YS, Wen, and Bacchetti S. The human Telomerase catalytic subunit hTERT: organization of gene and characterization of the promoter. *Mol Genet*, 1999, 8: 137-42.
155. Horikawa I, Cable PL, Afshari C, and Barrett JC. Cloning and characterization of the promoter region of human Telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res*, 1999, 59: 826-30.
156. Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M and Inoue M. Cloning of human Telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res*, 1999, 59: 551-7.

157. Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Muir S and Keith WN. Mapping of the gene for the human Telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia*, 2000, 2: 197-201.
158. Wick M, Zubov D and Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human Telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*, 1999, 232: 97-106.
159. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC and Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human Telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res*, 1998, 58: 4168-72.
160. Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Oruganti H, Giudice LC, and Hoffman AR. Regulation of Telomerase by alternate splicing of human Telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int. J. Cancer*, 2000, 85: 330-5.
161. Yokoyama Y, Wan X, Takahashi Y, Shinohara YA, and Tamaya T. Alternatively spliced variant deleting exons 7 and 8 of the human Telomerase reverse transcriptase gene is dominantly expressed in the uterus. *Mol. Hum. Reprod*, 2001, 7: 853-7.
162. Colgin LM, Wilkinson C, Englezou A, Kilian A, Robinson MO and Reddel RR. The hTERT alpha splice variant is a dominant negative inhibitor of Telomerase activity. *Neoplasia*, 2000, 2: 426-32.
163. Yi X, White DM, Aisner DL, Baur JA, Wright WE and Shay JW. An alternate splicing variant of the human Telomerase catalytic subunit inhibits Telomerase activity. *Neoplasia*, 2000, 2: 433-40.
164. Zhang A, Zheng C, Lindvall C, Hou M, Ekedahl J, Lewensohn R, Yan Z, Yang X, Henriksson M, Blennow E, Nordenskjold M, Zetterberg A, Bjorkholm M, Gruber A and Xu D. Frequent amplification of the Telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res*, 2000, 60: 6230-5.
165. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S and Wright WE. Extension of life span by introduction of Telomerase into normal human cells. *Science*, 1998, 279: 349-52.
166. Jiang XR, Jimenez G, Chang E, Frolkis M, Kusler B, Sage M, Beeche M, Bodnar AG, Wahl GM, Tlsty TD, and Chiu CP. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat. Genet*, 1999, 21: 111-4.

167. Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE and Shay JW. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with Telomerase. *Nat. Genet*, 1999, 21: 115-8.
168. DePinho RA, Schreiber-Agus N and Alt FW. myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. *Adv. Cancer Res*, 1991, 57: 1-46.
169. Grandori C, Cowley SM, James LP and Eisenman RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu. Rev Cell Biol*, 2000, 16: 653-99.
170. McMahon SB, Wood MA and Cole MD. The essential cofactor TRAP recruits the histone acetyltransferase hGCN5 to c-Myc. *Mol. Cell Biol*, 2000, 20: 556-62.
171. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D and Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev*, 1998, 12: 1769-74.
172. Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, Ariga H and Inoue M. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human Telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 669-77.
173. Tanaka M, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Sagawa T, Yamashita K, Okada NY, Hiyama E and Inoue M. Expression of Telomerase activity in human endometrium is localized to epithelial glandular cells and regulated in a menstrual phase-dependent manner correlated with cell proliferation. *Am J Pathol*, 1998, 153: 1985-91.
174. Soda H, Raymond E, Sharma S, Lawrence R, Davidson K, Oka M, Kohno S, Izbicka E and Von Hoff DD. Effects of androgens on telomerase activity in normal and malignant prostate cells in vitro. *Prostate*, 2000, 43: 161-8.
175. Ishii Y, Tsuyama N, Maeda S, Tahara H, and Ide T. Telomerase activity in hybrids between Telomerase-negative and Telomerase-positive immortal human cells is repressed in the different complementation groups but not in the same complementation group of immortality. *Mech Ageing Dev*, 1999, 110: 175-93.
176. Wright WE, Brasiskyte D, Piatyszek MA and Shay JW. Experimental elongation of telomeres extends the lifespan of immortal x normal cell hybrids. *EMBL J*, 1996, 20: 3526-34.
177. Oshimura M and Barrett JC. Multiple pathways to cellular senescence role of Telomerase repressors. *Eur. J. Cancer*, 1997, 33: 710-5.

178. Gunes C, Lichtsteiner S, Vasserot AP and Englert C. Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res*, 2000, 60: 2116-21.
179. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 1997, 88: 323-31.
180. El-Deiry WS. Regulation of p53 down stream genes. *Semin Cancer Biol*, 1998, 8: 345-57.
181. Asker C, Wiman KG and Selivanova G. p53-induced apoptosis as a safeguard against cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265: 1-6.
182. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hoving E, Smith-Sorensen B, Montesano R and Harris CC. Database of p53 gene somatic mutation in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*. 1994, 22: 3551-5.
183. Buchkovich KJ and Grider CW. Telomerase regulation during entry into the cell cycle in normal human Tcells. *Mol. Biol Cell*, 1996, 7: 1443-54.
184. Greider CW. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Aca.Sci*, 1998, 95: 90-2.
185. Holt SE, Aisner DL, Shay JW and Wright WE. Lack of cell cycle regulation of Telomerase activity in human cells. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94: 10687-92.
186. Pfeffer LM, Dinarello CA, Herberman RB, Williams BR, Borden EC, Borden R, Walter MR, Nagabhushan TL, Trotta PP and Pestka S. Biological properties of recombinant alpha-interferons:40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res*, 1998, 58: 2489-99.
187. Yang H, Kyo S, Takaturai M and Sun L. Autocrine transforming growth factor beta suppresses Telomerase activity and transcription of human Telomerase reverse transcriptase in human cancer cells. *Cell Growth Differ*, 2001, 12: 119-27.
188. Hisatake J, Kubota T, Hisatake Y, Uskokovic M, Tomoyasu S and Koeffler HP. 5,6-trans-16-ene-vitamin D3: a new class of potent inhibitors of proliferation of prostatic, breast, and myeloid leukemic cells. *Cancer Res*, 1999, 59: 4023-9.
189. Kiaris H and Schally AV. Decrease in Telomerase activity in U-87MG human glioblastomas after treatment with an antagonist of growth hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci*, 1999, 96: 226-31.
190. Tzukerman M, Shachaf C, Ravel Y, Braunstein I, Cohen-Barak O, Yalon-Hacohen M, and Skorecki KL. Identification of a novel transcription factor binding element involved in the regulation by differentiation of the human Telomerase (hTERT) promoter. *Mol Biol Cell*, 2000, 11: 4381-91.

191. Cuthbert AP, Bond J, Trott DA, Gill S, BroniJ, Marriott A, Khoudoli G, Parkinson EK, Cooper CS and Newbold RF. Telomeraz repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91: 37-45.
192. Nakabayashi K, Ogino H, Michishita E, Satoh N and Ayusawa D. Introduction of chromosome 7 suppresses Telomeraz with shortening of telomeres in a human mesothelial cell line. *Exp CellRes*, 1999, 252: 376-82.
193. Steenbergen RD, Kramer D, Meijer CJ, Walboomers JM, Trott DA, Cuthbert AP, Newbold RF, Overkamp WJ, Zdzienicka MZ, and Snijders PJ. Telomeraz suppression by chromosome 6 in a human papillomavirus type 16-immortalized keratinocyte cell line and in a cervical cancer cell line. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93: 865-72.
194. Betts D, Bordignon V, Hill J, Winger Q, Westhusin M, Smith L and King W. Reprogramming of Telomeraz activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 1077-82.
195. Lanza RP, Cibelli JB, Blackwell C, Cristofalo VJ, Francis MK, Baerlocher GM, Mak J, Schertzer M, Chavez EA, Sawyer N, Lansdorp PM and West MD. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science* 2000, 288: 665-69.
196. Rideout WM, Eggan K and Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, 293: 1093-8.
197. Liu K, Schoonmaker MM, Levine BL, June CH, Hodes RL and Weng NP. Constitutive and regulated expression of Telomeraz reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad Sci*. 1999, 96: 5147-52.
198. Minamino T, Mitsialis SA and Kourembanas S. Hypoxia extends the life span of vascular smooth muscle cells through Telomeraz activation. *Mol. Cell Biol*. 2001, 21: 3336-42.
199. Rohde V, Sattler HP, BundT, Bonkhoff H, Fixemer T, Bachmann C, Lensch R, Unteregger G, Stoeckle M and Wullich B. Expression of the human Telomeraz reverse transcriptase is not related to Telomeraz activity in normal and malignant renal tissue. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 4803-9.

200. Tahara H, Yasui W, Tahara E, Fujimoto J, Ito K, Tamai K, Nakayama J, Ishikawa F and Ide T. Immuno-histochemical detection of human Telomerase catalytic component, HTERT in human colorectal tumor and nontumor tissue sections. *Oncogene*, 1999, 18: 1561-7.
201. Li H, Zhao LL, Funder JW, and Liu JP. Protein phosphatase 2A inhibits nuclear Telomerase activity in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 1997, 272: 16729-32.
202. McElligott R and Wellinger RJ. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J*, 1997, 16: 3705-14.
203. Lingner L and Cech TR. Purification of Telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93: 10712-7.
204. Wang H and Blackburn EH. De novo telomere addition by Tetrahymena Telomerase in vitro. *EMBO J*, 1997, 16: 866-79.
205. De Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 2002, 21: 532-40.
206. Evans SK and Lundblad V. Positive and negative regulation of Telomerase Access to the telomere. *J. Ceinert, Sci.* 2000, 113: 3357- 64.
207. Pandita TK. ATM function and telomere stability. *Oncogene* 2002, 21: 611-8.
208. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G and T.de Lange. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 1659-68.
209. Van Steensel B, and T.de Lange. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, 1997, 385: 740-3.
210. Karlseder J, Smogorzewska A and T.de Lange. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science*, 2002, 295: 2446-49
211. Steinert S, Shay W and Wright WE. Transient expression of human Telomerase extends the life span of normal human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273: 1095-98
212. Dere F. *Anatomi*. 3. Baskı. Adana. Okullar Pazarı Kitabevi: 1994, 699-70
213. Moore K. The developing human. *Clinicaly oriented embryology*. WB Saunders Company, Philadelphia, 3rd ed, Chapter 1982: 2-13.
214. Scully RE. Tumors of ovary and maldeveloped gonads. "Atlas of the tumorpathology, Ed W Hartman, Second edition, AFIP, Washington, 1982" serisinden Fasikül 16.
215. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji* (6th ed), Editör: Başaklar C, Ankara Palme Yayıncılık, 1993:261.

216. Kuran O (editör). *Sistematik anatomi*. 1.Baskı. İstanbul: Filiz Kitabevi: 1983, 512-4.
217. Skandalaksis JE. *Cerrahi Anatomi* (1st ed): Dişi Genital Organları. Editör: Başaklar C, Ankara, Palme Yayıncılık, 2008: 1483.
218. Snell RS. *Clinical anatomy* (3rd ed). Boston: Brown and Company: 1986, 168-75.
219. Sadler TW. Urogenital system. *Langman's Medical Embryology*. 6th ed. Williams&Wilkins, Baltimore 1990, 257-78.
220. Williams PL, Warwick R. Embryology. *Gray's Anatomy*. 36th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh 1980, 1410-1417.
221. Janetschek G, Schreckenber F, Mikuz G, Marberger M. Experimental testicular torsion: effect on endocrine and exocrine function and contralateral testicular histology. *Urol Res*, 1988, 16: 43-7.
222. Hutson JM, Chow CW, Ng WD. Persistent Müllerian duct syndrome with transverse testicular ectopia. An experiment of nature with clues for understanding testicular descent. *Pediatric Surg Int*, 1987, 2: 191-3.
223. Albano RM, Arkell R, Beddington RSP, Smith JC. Expression of inhibin subunits and follistatin during postimplantation Mouse development: decidual expression of activin and expression of follistatin in primitive streak, somites, and hindbrain. *Development*, 1994, 120: 803-13.
224. Braunstein GD: Testes In: Greenspan FS. *Basic and Clinical Endocrinology*. 3th ed. Lange Medical Publication, California, 1991, 407-441.
225. Griffin JE, Wilson JD. Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. *Williams Textbook of Endocrinology*. 9th ed. Saunders Company, Philadelphia 1998, 819-75.
226. Nakayama Y, Sakamoto h, Satoh K. Tamoxifen and gonadal steroids inhibit colon cancer growth in association with inhibition of thymidylate synthase, surviving and Telomerase expression through estrogen receptor beta mediated system. *Cancer Lett*, 2000, 161:63-71.
227. Bodnar AG, Kim WN, Effors BR. Et al. Mechanism of Telomerase induction during T cell activation. *Exp Cell Res*, 1996, 228: 58-64.
228. Ferri KF, Kromer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 255-63.
229. Wang H, Khaoustov IV, Krishnan B. et al. Total Parenteral Nutrition Induces Liver Steatosis and Apoptosis in Neonatal Piglets. *J Nutr*, 2006. 136:2547-52.