



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-YL-2007-0002

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN
FİBROSARKOMALARDA PROGRAMLANMIŞ HÜCRE
ÖLÜMÜNÜN ÇEKİRDEKTEKİ DNA PARÇALANMASI
TAYİNİ ve İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
GÖSTERİLMESİ**

Araş. Gör. Hasan AKŞİT

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK**

AYDIN - 2007

ÖNSÖZ

Fibrosarkomlar bağ dokunun kötü huylu tümörlerinden olup başlıca kedi ve köpeklerde görülmektedir.

Kanserlerde erken teşhis yanında prognozun tayini, hastanın yaşamını uzatmada ve daha uygun tedavi şekillerinin tespit edilmesinde büyük önem taşımaktadır. Özellikle kedilerde aşı yerlerinde gelişen fibrosarkomlar önemli bir problem oluşturmakta ve bunun en başta gelen sebebi olarak ise aşı yerlerinde oluşan kronik yangılar ileri sürülmektedir.

Son dönemlerde kanser üzerine yapılan çalışmalarda apoptozisin önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yapılacak olan çalışmada ratlarda deneysel olarak 3-metilkolantren ile oluşturulacak olan fibrosarkomalarda programlı hücre ölümü iki ayrı metotla gösterilecektir. Böylece fibrosarkom ile programlı hücre ölümü arasındaki ilişki incelenecektir. Aynı zamanda ELISA yöntemiyle DNA hasarı tespiti ve programlanmış hücre ölümünün immunohistokimyasal olarak saptanması karşılaştırılacaktır. Elde edilen bulgular kanser tedavisine ışık tutabileceği gibi apoptozis ve kanser ile ilgili yapılacak olan çalışmalarda referans olarak da kullanılabilir.

Araştırma, “Deneysel olarak oluşturulan fibrosarkomalarda programlanmış hücre ölümünün çekirdekteki DNA parçalanması tayini ve immunohistokimyasal olarak gösterilmesi” isimli ve VTF-06016 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLO ve RESİMLER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1. 1. Apoptozis ve Oluşumu	4
1. 1. 1. Apoptozis ve tarihçesi	4
1. 1. 2. Apoptozisin Görüldüğü Hücre Çeşitleri	5
1. 1. 2. 1. İnce Bağırsaklar	5
1. 1. 2. 2. Deri	5
1. 1. 2. 3. Timus	6
1. 1. 2. 4. Uterus	6
1. 1. 2. 5. Beyin	6
1. 1. 2. 6. Göz	6
1. 1. 2. 7. Diğer.....	6
1. 1. 3. Apoptozisin Morfolojisi	8
1. 1. 4. Apoptozisin Bozulduğu Hastalıklar	12
1. 1. 4. 1. Viral Enfeksiyonlar	12
1. 1. 4. 2. Nörodejeneratif Hastalıklar	15
1. 1. 4. 3. Organ Transplantasyonları	15
1. 1. 4. 4. İnsüline Bağımlı Tip Diabet	15
1. 1. 4. 5. AIDS (Acquired Immundeficiency Syndrome)	15
1. 1. 4. 6. Malign Hastalıklar	16
1. 1. 5. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar	16
1. 1. 6. Apoptozis Mekanizmaları	20
1. 1. 7. Apoptozun Sitotoksik Regülasyonu	26

1. 1. 7. 1. Granzim veya Perforin Sistemi	26
1. 1. 7. 2. Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu	26
1. 1. 8. Apoptotik Süreç	28
1. 1. 9. Apoptozisin Modülatör (mediatör) leri	28
1. 1. 10. Apoptozisin İndüklenmesi	30
1. 1. 11. Apoptoziste Mitokondrinin Rolü	32
1. 1. 12. Kaspazların Substratları	33
1. 1. 13. Apoptozisin Özet Olarak Belli Başlı Aşamaları	34
1. 2. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	34
1. 2. 1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	35
1. 2. 1. 1. Işık Mikroskobu Kullanımı	35
1. 2. 1. 1. 1. Hematoksilen Boyama	35
1. 2. 1. 1. 2. Giemsa Boyama	36
1. 2. 1. 2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı	36
1. 2. 1. 3. Elektron Mikroskobu	37
1. 2. 1. 4. Faz Kontrast Mikroskobu	38
1. 2. 2. Histokimyasal Yöntemler	39
1. 2. 2. 1. Anneksin V Yöntemi	39
1. 2. 2. 2. TUNEL Yöntemi	39
1. 2. 2. 3. M30 Yöntemi	40
1. 2. 2. 4. Kaspaz-3 Yöntemi	40
1. 2. 3. Biyokimyasal Yöntemler	41
1. 2. 3. 1. Agaroz Jel Elektroforezi	41
1. 2. 3. 2. Western Blotting	41
1. 2. 3. 3. Flow Sitometri	41
1. 2. 4. İmmunolojik Yöntemler	42
1. 2. 4. 1. ELISA	42
1. 2. 4. 2. Fluorometrik Yöntem	43
1. 2. 5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	43
1. 3. Tedavide Apoptoz	43
2. GEREÇ VE YÖNTEM	46

2.1. Gereç	46
2. 1. 1. Materyal ve Deneysel Fibrosarkoma Oluşturulması	46
2. 1. 2. Kullanılan Cihazlar	49
2. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	49
2. 2. Yöntemler	50
2. 2. 1. Fibrosarkomalarda Apoptotik Hücrelerin İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi	50
2. 2. 2. Fibrosarkomalarda Apoptotik Hücrelerin Çekirdeklerindeki DNA Kırılmalarının ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	50
2. 3. İstatistiksel Analizler	51
3. BULGULAR	52
3. 1. İmmunohistokimyasal Bulgular	52
3. 2. ELISA ve İstatistik Bulguları	55
4. TARTIşMA	57
5. SONUÇ	68
ÖZET	69
SUMMARY	71
KAYNAKLAR	73
ÖZGEÇMİş	83
TEşEKKÜR	84

SİMGELER ve KISALTMALAR

Fas	Hücre Ölüm Reseptörü
FasL	Hücre Ölüm Reseptörü Ligandı
bp	Baz çifti
TNF	Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktörü)
HIV	Humon İmmunodeficiency Virus
AIDS	Acquired İmmunodeficiency Syndrome
TNFR - 1	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü -1
CSF	Koloni Uyarıcı Faktörler
NGF	Nöron Büyüme Faktörü
İGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL – 2	İnterlökin – 2
NBF	Neutral Buffered Formaline (Tamponlu Nötr Formalin)
Apaf – 1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
AIF	Apoptozis İndükleyici Faktör
ATP	Adenozin trifosfat
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-İnducing Ligand
IAP	Inhibitors of Apoptosis
FADD	Fas associated death domain
RIP	Receptör Interacting Protein
TRADD	TNFR–1 associated death domain
ICAD	Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz İnhibitörü
CAD	Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz
FLICE	Kaspaz 8
FLIP	FLICE-inhibitory protein
PARP	Poli (ADP-Riboz) Polimeraz
PRb	Retinoblastoma geninin ürünü
DNA – PK	DNA bağımlı bir protein kinaz
NuMA	Nükleus mitotik aparatus protein
Mdm2	Tümör süpressör protein olan p53'ün inaktivasyonunu sağlayan bir protein
PS	Fosfatidilserin
PI	Propidium iyodür
HB	Hematoksilen boyama

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.	Kurbağa, <i>Caenorhabditis elegans</i> ve insanlarda apoptozis	7
Şekil 2.	Apoptotik cisimciklerin oluşumu	9
Şekil 3.	Apoptozis sonucu oluşan cisimciklerin akyuvarlar tarafından tutulması, fagosite edilmesi	10
Şekil 4.	Apoptosis' in morfolojik değişiklikleri	12
Şekil 5.	Apoptozis ve nekrozisin hücreSEL görünümü	18
Şekil 6.	Tip I ve II hücrelerinin içerisindeki TNF ailesinin aracılık ettiği apoptozis	25
Şekil 7.	İki önemli apoptozis yolu: Extrinsik ve İntrinsik	27
Şekil 8.	Apoptozisin indüklenmesi	31
Şekil 9.	Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği noktanın mitokondri olduğunun gösterilmesi	33
Şekil 10.	Deneme ve kontrol grubu ELISA sonuçları	56

TABLO ve RESİMLER

	Sayfa
Resim 1. Epidermiste apoptozis	8
Tablo 1. Hastalıklarda apoptozisin rolü	14
Resim 2. Apoptotik hücre membranının görünüşü	17
Tablo 2. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması	18
Tablo 3. Apoptozis ve genler	21
Resim 3. Normal ve apoptotik insan lökosit hücresi	36
Resim 4. Nükleus fragmentasyonu, normal ve apoptotik hücrelerin gösterilmesi	38
Resim 5. TUNEL metodu uygulanmış rat testis dokusu	40
Tablo 4. Apoptoza müdahale edilerek geliştirilen tedavi örnekleri	45
Resim 6. Deneme grubundaki bir ratın fibrosarkomasının makroskopik görünümü	47
Resim 7. Deneme grubundaki bir ratın fibrosarkomasının kesit yüzünün görünümü	48
Resim 8. Deneme grubunda Bcl-2 için immunohistokimyasal boyama	52
Resim 9. Kontrol grubunda Bcl-2 için immunohistokimyasal boyama	53
Resim 10. Deneme grubunda Bax için immunohistokimyasal boyama	54
Resim 11. Kontrol grubunda Bax için immunohistokimyasal boyama	55
Tablo 5. Deneme ve kontrol grubu ortalama Apoptotik DNA fragmentasyonu sonuçları	56

1. GİRİŞ

Fibrosarkom mezenkimal dokudan köken alan bağ dokunun kötü huylu tümörü olup daha çok kedi ve köpeklerde görülmekle birlikte tüm hayvan türlerinde ortaya çıkabilir. Hızlı ve infiltratif büyüyen bir tümördür. Özellikle kedilerde aşı yerlerinde gelişen fibrosarkomlar önemli bir problem oluşturmakta ve bunun en başta gelen sebebi olarak ise aşı yerlerinde oluşan kronik yangılar ileri sürülmektedir. Genellikle yaşlı hayvanların bir tümörü olmasına karşın 6 aylık kedi ve köpeklerde de gözlenebilir. Irk ve cinsiyetin etkisi yoktur. Dermis ve subkutiste rastlanan bu tümör, vücudun herhangi bir yerinde de ortaya çıkabilir ama iç organlarda pek görülmez (Erer ve Kıran 2000).

Rodentlerde en yaygın görülen mezenkimal tümörlerdendir ve ratlarda spontan olarak şekillenme olasılığı % 1-3, farelerde görülme olasılığı ise % 1-6 düzeyindedir. Fibrosarkomlar nadiren metastaz yaparlar ancak ineklerde lenf nodülleri ve akciğerlere metastaz yaptığı bildirilmiştir (Wöhrmann ve Teredesai 2002).

Fibrosarkom terimi, farklı tip ve miktarda hücreler arası bağ doku ipliği içeren ve mekik hücrelerinden oluşan, kombine olmayan, morfolojik olarak farklı sarkom tipleri için kullanılmıştır (Hazıroğlu ve Milli 2001).

Kanser, yüzyılın en önemli ölüm sebeplerinden biridir. Nedeni bilinen ölümler arasında 1970'li yıllarda 4. sırada iken, günümüzde kalp-damar hastalıklarından sonra 2. sıraya yükselmiştir. Her on ölümden birinin nedeni kanserdir. Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Erdoğan, 2003). Son yıllarda, bu dengenin bozulmasının birçok önemli hastalığın patogeneziinde rol aldığı gösterilmiştir. Örneğin; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr 1994).

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinir ve fizyolojik bir olaydır. Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden sürekli olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir. Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozise örnektir. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır (Erdoğan 2003).

Apoptozisteki ana morfolojik olay, nükleusun kondensasyonu ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde miks kondens bir yapıda olup daha diffüz görünümündedir. Apoptoziste süperkondens bir hal alarak nükleus zarı altında kresentik görünüm oluşur (Öktem ve ark 2001). Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180-200 bp (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılması olup DNA fragmentasyonu apoptozisin en önemli işaretidir (Zhang ve Xu 2002).

Apoptozisle ilgili çalışmalar hızla artmasına karşın apoptozisi saptamak ve değerlendirmek pek kolay olmamaktadır. Özellikle tek bir hücrede apoptozis olayı saatler içerisinde geliştiğinden apoptotik süreçteki hücreyi morfolojik olarak tanımak ve kantifiye etmek zordur. Genellikle çalışmaların güvenilirliğini artırmak amacıyla farklı yöntemlerin birkaçının birlikte kullanılması önerilmektedir. Apoptotik hücredeki morfolojik değişiklikleri saptamak için ışık mikroskobu, elektron mikroskobu, Flow sitometri kullanılmaktadır. Yine çeşitli sitoplazmik değişikliklerin saptanması (örneğin kaspaz aktivitesinin, hücreye kalsiyum akışının veya mitokondri disfonksiyonunun ölçülmesi), membran değişikliklerinin belirlenmesi (örneğin membran geçirgenliğinin değişmesi), apoptoz sürecinde veya regülasyonunda görevli çeşitli proteinlerin kanda veya dokuda düzeyinin ölçülmesi (örn: Bcl2/Bax oranı), DNA parçalanmasının çeşitli özel immünohistokimyasal boyalarla

saptanması bu yöntemler arasında sayılabilir. Bütün bu yöntemler içinde en sık rastlanan yöntemler, DNA'daki değişikliklere dayalı olan DNA agaroz jel elektroforezi ve TUNEL (terminal deoxytransferase mediated bio-dUTP nick end labeling) boyası ile formalinde fikse edilmiş materyalde yapılan mikroskopik incelemedir. Son dönemde kullanılan önemli ve güvenilir bir başka metod ise Annexin-V boyası uygulaması ve ELISA' dır (Kültürsay ve Kayıkçıoğlu 2002).

Bu çalışmada 3-metilkolantren ile ratlarda deneysel olarak fibrosarkoma oluşturulmuş ve deney süresinin sonunda ratlara, eter anestezisi altında ötenazi uygulanarak nekropsileri yapılmıştır. Oluşan tümör kitlelerinde apoptozis, immunohistokimyasal olarak ve ELISA yöntemiyle DNA kırılmaları tayin edilerek tespit edilmiştir.

1. 1. Apoptozis ve Oluşumu

1. 1. 1. Apoptozis ve tarihçesi

Apoptozis; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümdür (Öktem ve ark 2001). Organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlı hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümdür (Hıkım ve ark 1995).

Yüksek organizmalarda hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir, klasik hücre ölümü nekroz olarak adlandırılır. Hücre ölümün diğer şekli olan apoptozis ise genellikle tek tek hücreleri etkiler, birçok fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkar ve genellikle enflamasyon söz konusu değildir (Öztürk 2002).

Ökaryotik organizmalardaki hücreler doğarlar, belirli bir süre yaşarlar ve sonra ölürlür. Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin; bağırsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürken derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Fakat kalp kası hücreleri veya nöronlar ömür boyu yaşarlar. Zamanı gelince, bu hücreler daha önceden programlanmış bir şekilde ölürlür. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır (Ulukaya 2003). Apoptozla hücre ölümü; enerji kullanılarak hücre sel yaranma ve enflamasyon olmaksızın, çok daha ustaca gerçekleştirilir (Guimaraes ve Linden 2004). Programlı hücre ölümünün, bütün çok hücreli organizmalarda, gelişmede ve homeostazın sürdürülmesinde vazgeçilmez bir rolü vardır (Tomatır 2003).

Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (Özvaran 2004). Tümörlerde sık görülen bir olay olup hücre ölümüne yol açan aktif olarak düzenlenmiş bir hücre sel süreçtir. Apoptozise direnç göstermek, hücre kaybını azaltarak tümöre bir avantaj sağlar (Rashed ve Ragab 2004).

Apoptozis, hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (Yılmaz 2005).

1. 1. 2. Apoptozisin Görüldüğü Hücre Çeşitleri

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir (Wright ve ark 1996). Apoptotik hücrelerin uzaklaştırılması ve yerine yenilerinin konması günlük 1×10^{11} hücre olarak tahmin edilmektedir ve bu yetişkin bir bireyin total vücut ağırlığının her 18 – 24 ayda bir değişimine eşittir (Ulukaya 2003). Bu doku ve hücrelere örnek olarak;

1. 1. 2. 1. İnce Bağırsaklar

İnce bağırsaklardaki kriptaların tabanlarında yeni oluşan hücreler, kriptaların uçlarına doğru göç ederler ve 3–4 gün süren bu göçün sonunda ölümler, bağırsak boşluğuna dökülürler (Nishihara ve ark 2003, Gavrieli ve ark 1992).

1. 1. 2. 2. Deri

Derinin keratinositleri derinin bazal tabakasında oluştuktan sonra derinin en üst tabakasına doğru göç ederler. Bu göç esnasında derinin her tabakasında çeşitli farklılaşma özellikleri gösterip en sonunda derinin organizmayı dış etkenlerden koruyucu ölü tabakasını oluşturmak üzere ölümler (Giannetti ve ark 2004).

1. 1. 2. 3. Timus

İmmun sistemin çok önemli hücreleri olan T lenfositler timusda olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanları kan dolaşımına girmeden önce apoptozisle ölürler ve böylece ortamdan uzaklaştırılırlar (Güvenç 2002).

1. 1. 2. 4. Uterus

Menstruasyon esnasında uterusun iç duvarındaki hücreler ölürler ve menstruasyon kanı ile uzaklaştırılırlar. Böylece uterusun iç tabakası (endometrium) apoptozisle dökülür (Kurita ve ark 2001).

1. 1. 2. 5. Beyin

Beyinde sinapsların oluşumu esnasında bazı nöronlar apoptozisle ortamdan uzaklaştırılır ve ayrıca beyin hücrelerinde travmadan sonra oluşur (Liu ve ark 1997).

1. 1. 2. 6. Göz

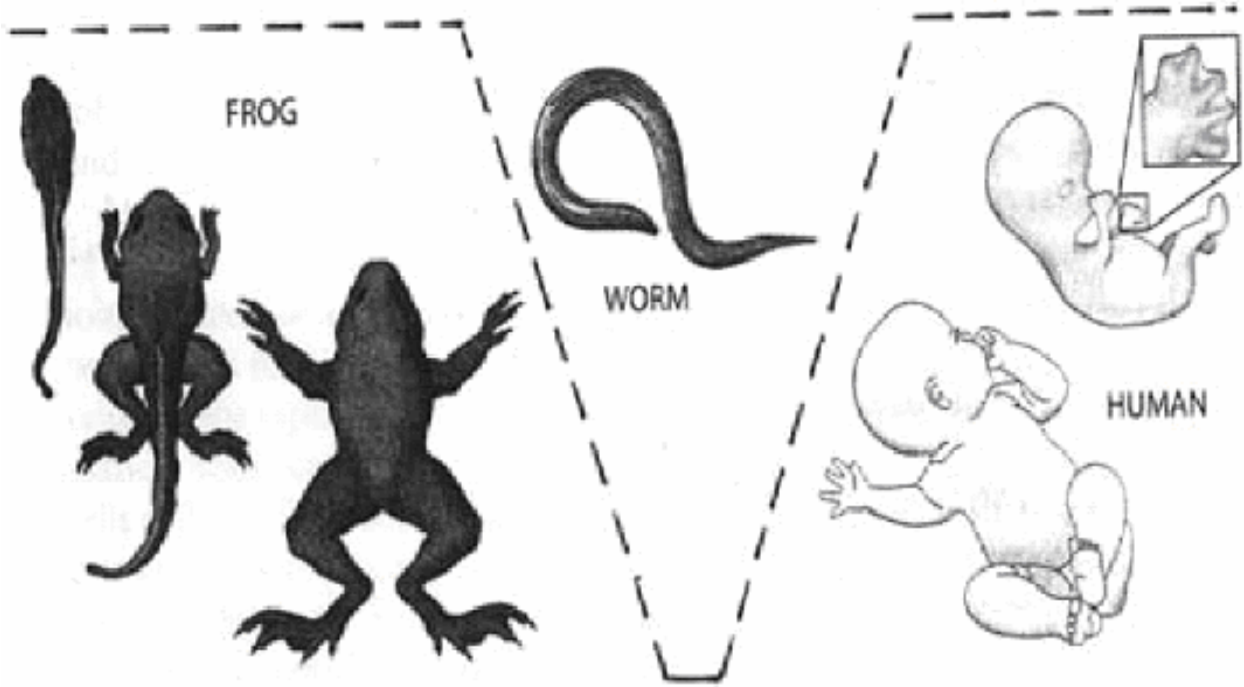
Gözdeki lensde içleri saydam bir protein olan kristalin ile apoptotik hücreler bulunur (Belkacemi ve ark 2005).

1. 1. 2. 7. Diğer

Virüslerle enfekte olmuş veya kalıcı DNA hasarı oluşmuş hücreler sıklıkla apoptozisle kendilerini öldürürler. Bu yolla apoptozise gidemeyen ve genetik olarak değişmiş hücreler ileride kanser gelişimine neden olabilirler. Yapılan araştırmalarda Hepatit C virüsünün core isimli proteininin insan embriyonik böbrek hücre dizelerinde FADD ilişkili apoptozisi arttırdığı tespit edilmiştir (Ulukaya 2003). Bağışıklık sistemiyle ilgili en tanınmış hastalık AIDS ve bunun etkeni HIV virüsüdür. Bu virüs yardımcı T hücrelerinin reseptörlerinde

bulunan CD4 farklılaşma proteinine bağlanarak hücre sitoplazmasına girer, orada ürettiği proteinlerle hücrenin doğal ölümü olan apoptozis olayını gerçekleştirir, yani hücre ölür (Tüzün 2002).

Apoptozis çok hücreli canlıların gelişimi esnasında da görülür. Çok hücreli canlıların normal ve doğru gelişimleri seçilmiş bazı hücrelerin apoptozisle ölmesine bağlıdır. Örnek olarak 1 mm uzunluğunda transparant bir kurtçuk olan *Caenorhabditis elegans*'ın başlangıçta 1090 olan hücre sayısı tam olarak 131 hücre azalır ve böylece hermafroditik formdan yetişkin forma dönüşür. Ölen hücreler mikroskop altında izlenebilirler (Herrmann ve ark 2003). Bu kurtçuk model alınarak yapılan organ gelişimi ve apoptozis çalışmaları 2002 yılında Sydney Brenner, Robert Horwitz ve John Sulston'a Nobel ödülü kazandırmıştır. Kurbağaların metamorfozisi esnasında kuyrukları kaybolur. Böylece yetişkin forma geçerler. Kuyruktaki hücreler apoptozisle ölecek kaybolur (Ulukaya 2003). İnsan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelerin buradaki hücrelerin apoptozisle ölmesi sonucu kaybolduğu düşünülmektedir (Piret ve ark 2004).

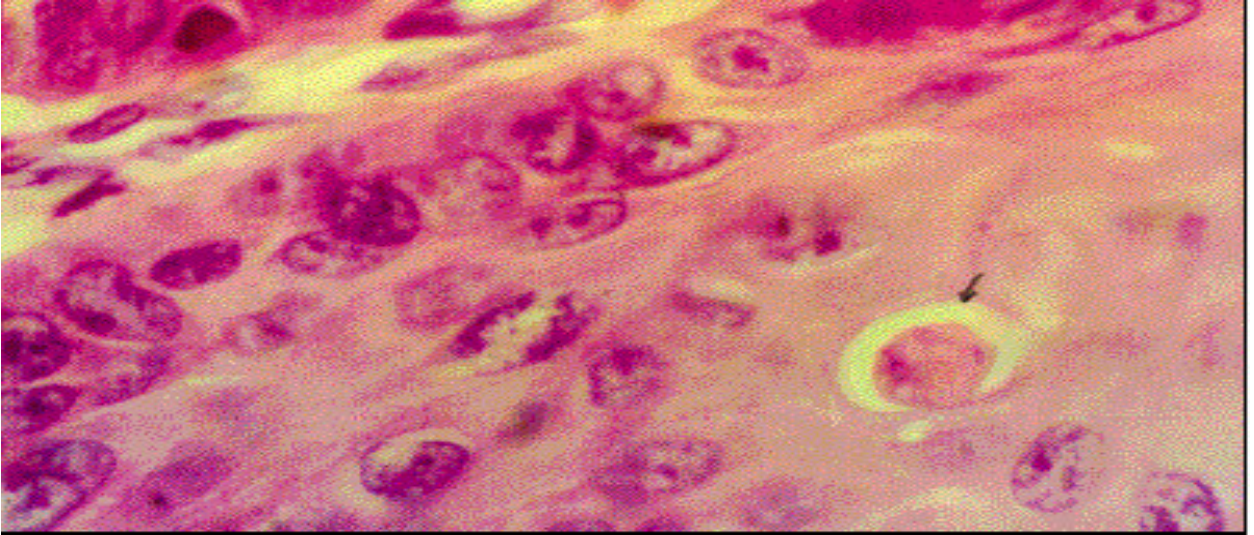


Şekil 1. Kurbağa, *Caenorhabditis elegans* ve insanlarda apoptozis (Ulukaya 2003).

1. 1. 3. Apoptozisin Morfolojisi

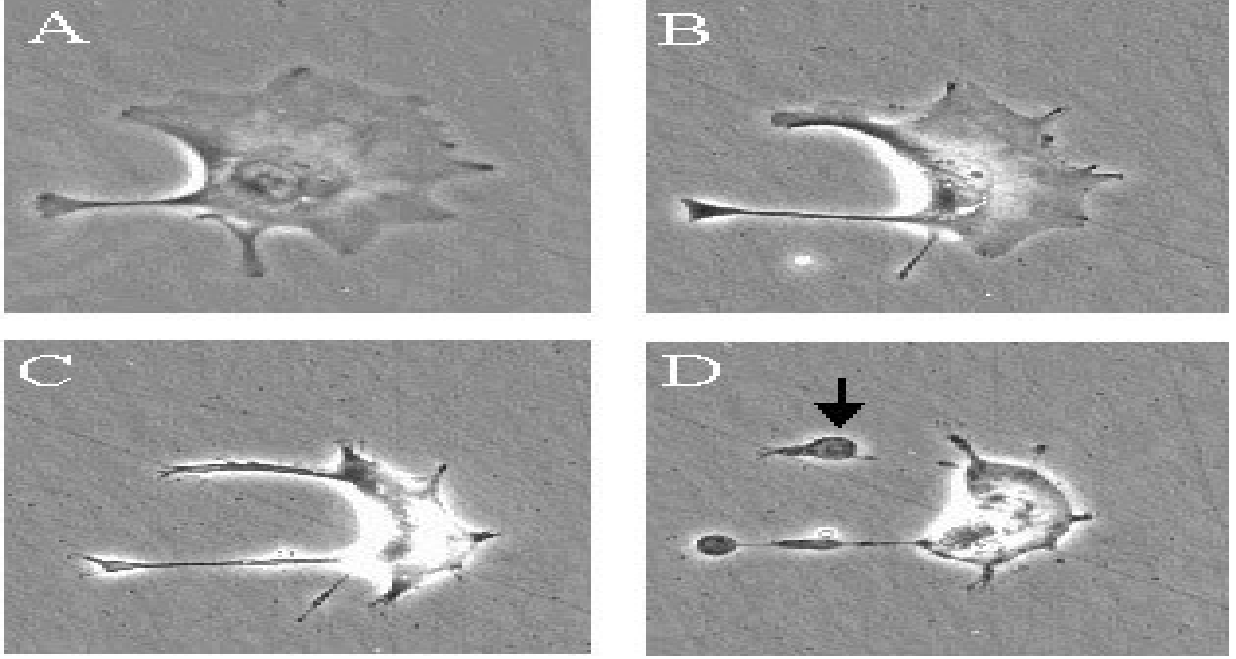
Apoptozisde ana morfolojik olay, nukleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Kromatin, normalde yoğun bir yapıda olup daha diffuz görünümündedir. Apoptoziste daha yoğun bir hal alarak nukleus zarı altında kresantik görünüm oluşur. Floresan boyamada DNA boncuklanmalar şeklinde görülür, bunun nedeni DNA'nın endonükleaz ile oldukça özgül şekilde internükleozomal bölgelerden 180–200 bp (baz çifti) büyüklüğünde parçalara ayrılmasıdır (Galle 1997). İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder patern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur (Walker ve ark 1999). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (Öktem ve ark 2001).

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, özelleşmiş yüzey organellerini kaybeder ve belirgin şekilde büzülür, bir kaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlıdır (Wijsman ve ark 1993). Apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, hücreler, etrafında açık bir parlama şeklinde görülmektedir (Resim 1).



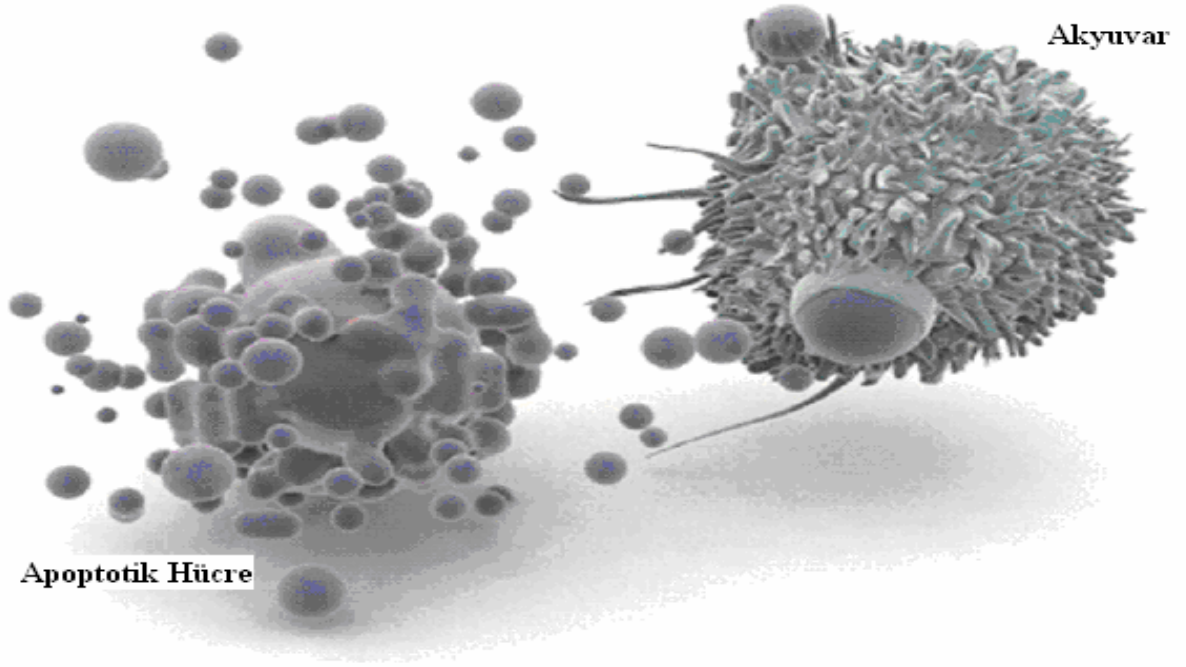
Resim 1. Epidermiste apoptozis: Mikroskopik olarak tanımlanan apoptotik hücre büzülmüş, etrafında belirgin parlama oluşmuş; kromatin nükleus membranı altında yoğunlaşarak değişik boyut ve biçimde sınırları belirgin, yoğun kitleler haline gelmiştir (Öktem ve ark 2001).

Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır (Şekil 2-D). Ama hücre henüz yaşamaya devam etmektedir (Öktem ve ark 2001).



Şekil 2. Apoptotik cisimciklerin oluşumu (Öktem ve ark 2001).

Apoptotik hücreler komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınır ve fagosit edilir (Şekil 3). Apoptotik hücrelerin tanınması, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerin vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanır ve fagositozu uyarır (Öktem ve ark 2001).

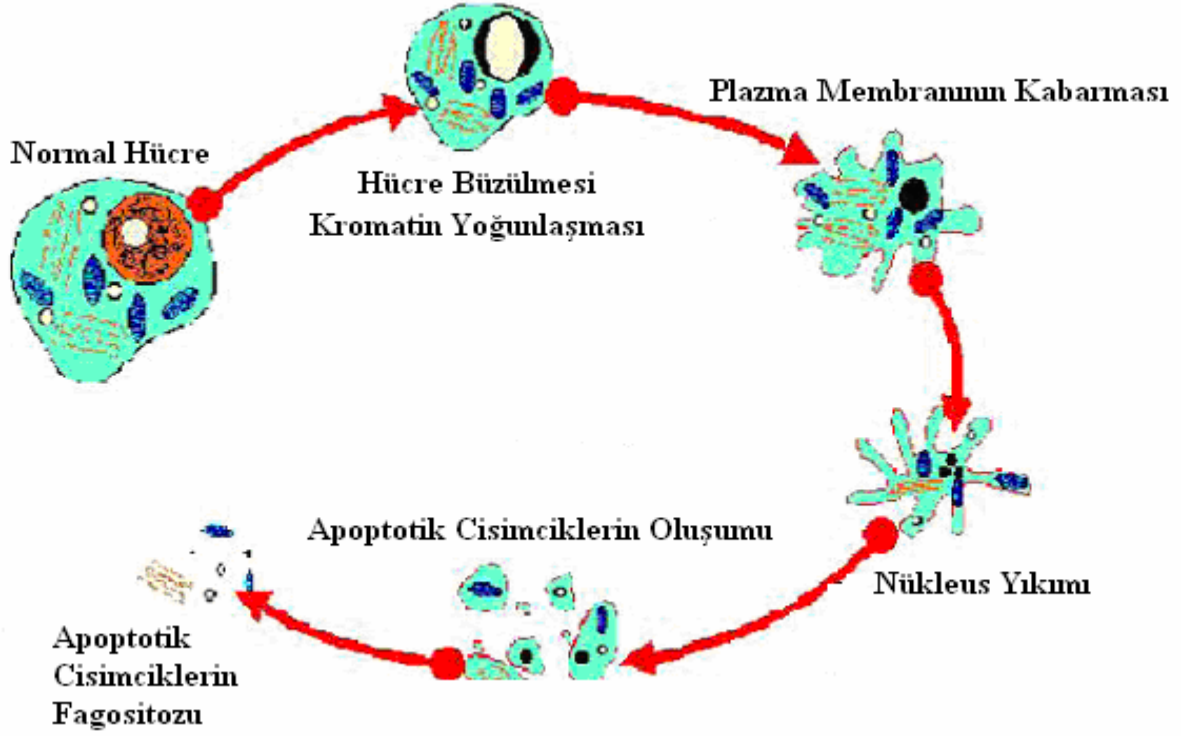


Şekil 3. Apoptozis sonucu oluşan cisimciklerin akyuvarlar tarafından tutulması, fagosite edilmesi (Öktem ve ark 2001)

Apoptozis, hücrelerin öldürülmesinde fizyolojik bir süreçtir. Çok hücreli organizmaların gelişimi ve işlevselliğinde çok önemlidir. Bu hücre ölümünün kontrolündeki anormallikler, kanser, otoimmün hastalıklar ve dejeneratif hastalıkların oluşumuna neden olur (Dayan ve ark 2000).

Apoptozis, tek bir hücrede, büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterizedir. Hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeniyle hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır. Apoptotik uyarımı alan hücre, hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, öncelikle plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur ki bu yapı 'zeiozis' olarak tanımlanır. Zardaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır. Hücre zarında iç yüzeyden dışarıya fosfatidilserin translokasyonu olur. Plazma ve çekirdek yoğunlaşmasını takiben kromatinin kümelenmesi şekillenir. Kromatindeki değişikliklerin

başlamasının hemen öncesinde sitozolik Ca^{++} düzeyinde önemli bir artış olmaktadır (Tomatır 2003). Kromatin yoğunlaşması, nükleozomlar arasındaki bağlantı bölgelerinin ayrılması ile karakterizedir. İnternükleozomal DNA parçalanmasının kalsiyum artışına duyarlı endonükleazlar ile olduğu ileri sürülmektedir. Endonükleazlar, timositler gibi bazı hücrelerde yapısal olarak bulunur, bazı hücrelerde ise apoptozisin başlamasından önce transkripsiyon ile oluşturulur. Hücrelerin parçalanmasıyla nükleer materyal içeren zarla çevrili 'apoptotik cisimcikler' oluşur. İki katlı lipit tabakadan fosfolipit asimetrisi, hücre zarının bir özelliğidir. Fosfolipitler, yani iç tabakada bulunan fosfatidilserin ve fosfatidiletanolamin ile dış tabakada bulunan fosfatidilkolin asimetrik olarak dağılmışlardır. Normal hücrelerde bu asimetri ATP'ye bağlı translokaz ile aktif olarak korunmaktadır. Apoptoz sırasında ya ATP translokaz yetmezliği ya da diğer enzim sisteminin aktivasyonu sonucu fosfatidilserin dış yüzey tabakaya yerleşir. Bu durum apoptotik cisimciğin fagositozu için bir uyarıdır. Apoptotik cisimcikler, sitokin salgılanmasını ve inflamasyon oluşumunu uyarmaksızın, makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosit edilirler. Apoptoz 30 – 60 dakika gibi bir sürede tamamlanır. Hücre iskeleti apoptozda önemli bir role sahiptir (Saraste ve Pulkki 2000). Elektron mikroskopunda apoptoz esnasında, kromatinin yoğunlaşması, sitoplazmanın büzülmesi, plazma membranının kabarması, mitokondri dış membranında şişme, mitokondrial membran aralığında sitokrom c ve bir oksidoredüktaz ile ilişkili flavoprotein olan Apoptozis İndükleyici Faktör salınımı, olduğu bildirilen morfolojik değişikliklerdendir (Roshal ve ark 2001).



Şekil 4. Apoptosis' in Morfolojik değişiklikleri (Antar 2005).

Apoptozis esnasındaki moleküler değişikliklerden DNA ayrılması; iç ve dış plazma membran yaprakları arasında fosfolipidlerinin dağılımının belirlenmesinde; DNA kırılmasında, nükleotidlerin terminal deoksinükleotidil transferaz fosfolipidlerinin annexin ile boyanması, subdiploid DNA içeriği olan hücrenin, DNA ekleyen boyalar ile belirlenmesi ile gösterilebilir (Tomatır 2003).

1. 1. 4. Apoptozisin Bozulduğu Hastalıklar

1. 1. 4. 1. Viral Enfeksiyonlar

Virüsler, hücreleri enfekte ettiklerinde girdikleri hücreye kendi proteinlerini sentez ettirirler. O hücrenin kendisi için gerekli proteinlerin yapımını durdururlar. Bu yüzden, o hücrede apoptozis indüklenir ve hücre ölür. Fakat bazı virüsler (örn. Papillomavirüs) enfekte

ettikleri hücrenin apoptozise gitmesini baskılayan yollar geliştirmişlerdir. Örneğin, Epstein-Barr virüsü bir apoptozis inhibitörü olan bcl-2'ye benzer moleküller üretmektedir. Ayrıca enfekte ettiği hücrenin kendi bcl-2 üretimini indükleyen moleküller de üretmektedirler. Bu yüzden antiviral tedaviyle uğraşan araştırmacılar virüslerin ürettikleri bu anti-apoptotik moleküllerin aktivitelerinin bloke edilmesiyle ilgili çalışmalar yapmaktadırlar. Papillomavirüs ise güçlü bir apoptozis indükleyicisi olan p53'ü inaktifleştirmektedir. Fakat immun sistemi viral enfeksiyonlarla savaşır. İmmun sistemin önemli bir komponenti olan sitotoksik T lenfositleri virüsle enfekte olmuş hücreleri apoptozisi indükleyerek öldürürler. Apoptozisin indüksiyonu sitotoksik T lenfositlerden salgılanan granzimlerin (proteolitik enzim) etkisiyle sağlanır. Böylece virüsle enfekte olan hücre ortamdan uzaklaştırılır. Sitotoksik T lenfositleri ayrıca FasL salgılayarak da enfekte hücrelerde apoptozisi indükleyebilirler ama bu mekanizmayla sağlıklı komşu hücrelerde de apoptozisin indüklenme riski vardır (Ulukaya 2003). Tablo 1' de hastalıklarda apoptozisin rolü gösterilmiştir.

Tablo 1. Hastalıklarda Apoptozisin Rolü (Tomatır 2003).

Apoptozisin Artmasıyla İlgili Hastalıklar	Apoptozisin Azalmasıyla İlgili Hastalıklar
Nörodejeneratif Bozukluklar	Kanser
Alzheimer hastalığı Amyotrofik lateral skleroz Creutzfeld-Jakop hastalığı Huntington hastalığı Parkinson hastalığı Retinitis pigmentosa Spinal muskular atrofi	Blastom Karsinom Lösemi Lenfoma Malign gliom Sarkom Seminom
Hematolojik Bozukluklar	Premalign Hastalıklar
Aplastik anemi Fanconi anemisi Hodgkin hastalığı Myelodisplastik sendromlar Polycythemia vera	Ataxia telangiectasia Paroksimal nokturnal hemoglobiniüri Myeloblastik sendromlar Xeroderma pigmentosum
Otoimmün Bozukluklar	Otoimmün Bozukluklar
Fulminant hepatit Graft-versus-host hastalığı Hashimoto tiroitis İnsilüne bağımlı diyabet Multipli skleroz Romatoid artrit Skleroderma Sjögren sendromu	Otoimmün lemfoproliferatif sendrom (tip I ve II) Sistemik lupus erythematosus
	Ateroskleroz
	Metabolik Bozukluklar
	Nimann-Pick hastalığı Osteoporoz Wilso hastalığı
İskemik Yaralanma	Viral Enfeksiyonlar
İskemi ve reperfüzyon Böbrek enfarktüsü Miyokardial enfarktüs İnme	Adenoviruslar Baculoviruses Epstein-Barr virüs Herpesvirüsleri Poxvirüsler
Toksinlere Bağlı Hastalıklar	Prematur ve Fizyolojik Yaşlanmada Apoptozis
Alkole bağlı hepatit Pulmonar fibrozis Sepsis	Down sendromu Erken yaşlanma (progeria) Xeroderma pigmentosum
Bakteriyel ve Viral Enfeksiyon	
AIDS Ebola virüsü Chlamydia trachomatis Helicobacter pylori Neisseria meningitis Salmonella typhimurium Shigella flexneri	
Diğerleri	
Travmatik spinal kord yaralanması Tümör karşı atağı (immün ayrıcalık)	

1. 1. 4. 2. Nörodejeneratif Hastalıklar

Alzheimer, Parkinson, Hutchinson gibi hastalıklarda nedeni bilinmeyen bir şekilde apoptozisin indüklenerek nöronların öldüğü düşünülmektedir (Mcphie ve ark 2003).

1. 1. 4. 3. Organ Transplantasyonları

Transplante edilen organlara vücudun immun atağı olduğu bilinmektedir. Oysa gözün ve testislerin bazı bölgelerindeki hücrelerin devamlı olarak FasL eksprese ettiklerinden dolayı bu bölgelere gelen T lenfositlerini bu hücrelerin üzerindeki Fas reseptörlerini aktive ederek apoptozisle öldürebilmektedirler (Billig ve ark 1995). Böylece immun sistemin etkisinden kurtulabilmektedirler. Aynı şekilde transplante edilen organın FasL salgılaması sağlanabilirse bu durumda da immun sistemin etkisinden kurtulmanın mümkün olduğuna dair çalışmalar sürmektedir. Fas hücre ölüm reseptörleri olarak bilinir, lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde ve miyokarda bulunur ve ilgili ligandına Fas ligand (FasL) denir. FasL tümör nekroz faktör ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerde ve natural killer hücrelerinde bulunur (Ozeki ve ark 2002).

1. 1. 4. 4. İnsüline Bağımlı Tip Diabet

Bu hastalıkta insülin salgılayan hücreler apoptozisle ölmektedirler (Gürbilek ve ark 2004).

1. 1. 4. 5. AIDS (Acquired Immundeficiency Syndrome)

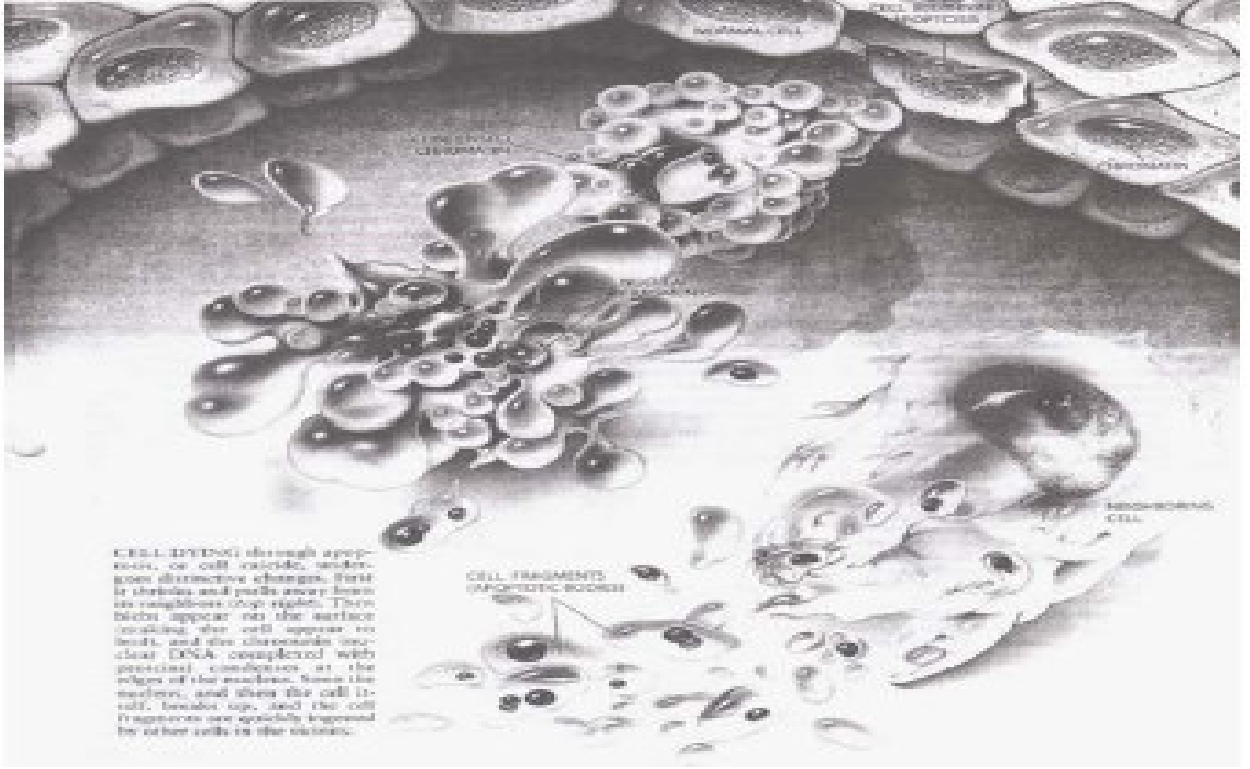
AIDS enfeksiyonu sonucu CD4⁺ T hücreleri (lenfositleri) apoptozisle ölmektedirler. Sorumlu virus olan HIV (human immunodeficiency virus) CD4⁺ T hücrelerinin yüzeyindeki CD4 moleküllerine bağlanır. Bu bağlanma bir yüzey glikoproteini olan ve virüsün env geni tarafından kodlanan gp120 tarafından düzenlenir. Aslında AIDS'de CD4⁺ hücrelerinin 100000'den az bir kısmında bu bağlanma görülmesine rağmen birçok hücre apoptozisle ölmektedir (Estaquier ve ark 1994).

1. 1. 4. 6. Malign Hastalıklar

Malign hastalıklar klasik olarak kontrolsüz bir aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklardır. Aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür (Ulukaya 2003).

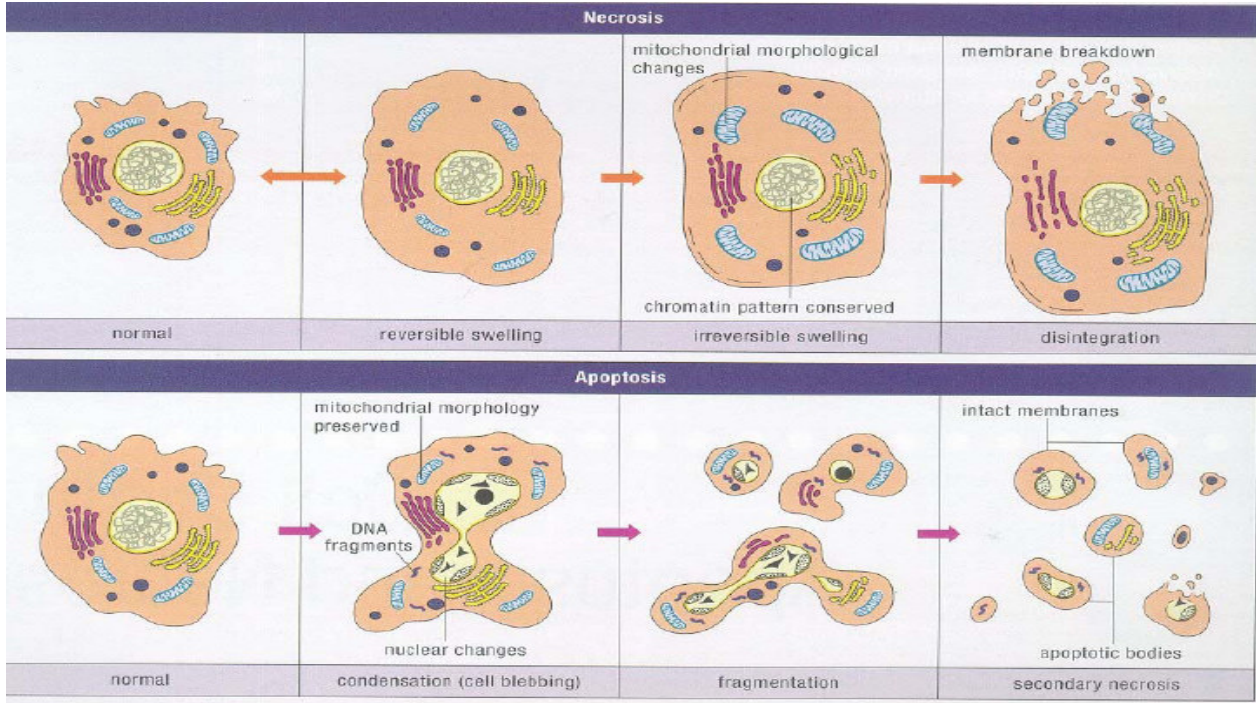
1. 1. 5. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar

Tablo 2' de de görüldüğü gibi, nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir. Apoptozis hem sağlıklı hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır (Brouckaert ve ark 2004). Apoptozis morfolojik olarak özgündür. Nekroziste hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekroziste kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır (Willingham 1999). Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı sağlamdır ve üzerinde küçük cepçikler oluşur (Resim 2).



Resim 2. Apoptotik hücre membranının görünüşü (Ulukaya 2003).

Nekrotik hücre sonradan lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır, değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerirler (Barisic ve ark 2003). Nekroziste plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptoziste apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz (Huppertz ve ark 1999).



Şekil 5. Apoptozis ve nekrozisin hücresel görünümü (Ulukaya 2003).

Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır (Ji ve ark 1995). Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü ortaya çıkmasına neden olur. DNA'yı parçalayan bir Ca / Mg-bağımlı endonükleazdır. Ayrıca DNaz I ve II'de DNA parçalanmasından sorumludur (Walker ve ark 1997).

Tablo 2. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması (TNFR-1, tumor nekrozis factor reseptörü-1) (Ulukaya 2003).

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	<ul style="list-style-type: none"> • İskemi • Hipertermi • Hipoksi • Litik viral enfeksiyon • Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları • Şiddetli oksidatif stress 	<ul style="list-style-type: none"> • Büyüme faktörü eksikliği • Hücre yaşlanması • HIV • Kanser ilaçları • Radyasyon • Yüksek doz glukokortikoid • Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu • Sitotoksik T lenfositler • Çok şiddetli olmayan oksidatif stres

<p>Morfolojik özellikler</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hücre membran bütünlüğünün kaybı • Kromatin 'flocculation'u • Hücre şişmesi • Organellerin disintegrasyonu • Endoplazmik retikulumun dilatasyonu • Büyük vakuollerin oluşumu • Hücre lizisi 	<ul style="list-style-type: none"> • İntakt hücre membranı fakat membranda 'bleb'lerin oluşumu • Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması • Hücre küçülmesi • Organellerde disintegrasyon yok • Hücrenin intact mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
<p>Biyokimyasal özellikler</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Bozulmuş iyon hemostazisi • ATP gerekmez (pasif süreç) +4 C°'de gerçekleşebilir • DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde 'smear' görüntüsü) • Postlitik DNA fragmentasyonu (= ölümün geç safhasında) 	<ul style="list-style-type: none"> • İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ATP gereklidir (aktif süreç) +4 C°'de gerçekleşmez • DNA internuklezomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni = apoptozisin en önemli belirteci) • Prelitik DNA fragmentasyonu (= erken evrede gerçekleşir)
<p>Diğer özellikler</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Hücreler gruplar halinde ölür • Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir • Lizozomal enzimler salınır • İnflamasyona neden olur 	<ul style="list-style-type: none"> • Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür • Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir • Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler • İnflamasyon görülmez

1. 1. 6. Apoptozis Mekanizmaları

Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyallerle apoptozis başlamaktadır (Erdoğan 2003).

Apoptozis önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarı sonucu sekonder olarak gelişir. Hücre dışı uyarılar tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi pozitif uyarılar olabilir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL, sFas proteinleri, virüsler (HIV gp120 proteini, influenza virüsü. TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücreyi apoptozise götürmektedir (Erdoğan 2003).

Uyarılar hücre içinde Ca^{+2} artışına neden olmakta ve/veya cAMP gibi hücre içi ikincil habercileri aktive etmektedir. Örneğin sitoplazmik Ca^{+2} miktarında hafif artış c-fas, c-myc ve sıcak şoku proteini gibi yeni mRNA basamaklarını harekete geçirir. Ayrıca, apoptoziste etkili endonükleaz, transglutaminaz gibi enzimleri de aktive eder. Bunlar da kromatinde parçalanmaya, hücre iskeletinde ve sitoplazmik proteinlerde değişikliklere neden olur. Sitoplazmik kalsiyum, kalmodulin ile bağlanırsa apoptozis inhibe edilebilir (Öktem ve ark 2001).

Hücre içinde kendi kendini uyarı basamakları sistemi, *Coenarhabditis elegans* isimli bir nematod yapısında gösterilmeye çalışılmıştır. Erişkin hermafroditin oluşumu sırasında gelişen 1090 hücreden 131'i apoptozisle ortadan kalkar. Organizmada apoptozisi uyarı ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Öktem ve ark 2001).

Tablo 3. Apoptozis ve Genler (Öktem ve ark 2001)

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
<ul style="list-style-type: none">• Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-x1, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1• c-abl geni• ras onkogeni• çözünebilir fas• p35• A20	<ul style="list-style-type: none">• Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bad, bik, Hrk1• c-myc• p53, p21• fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST• interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)• LOH (MTS1/CDK41)

Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar genel olarak; büyüme faktörleri, onkojenler, tümör süpresör genler olmak üzere üç ana grupta toplanabilir. Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir (Tomatır 2003).

Apoptozis süreci; DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) olmak üzere üç farklı şekilde işleyebilir (Roshal ve ark 2001). Bu süreçte belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteindir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (Staley ve ark 1997). Günümüzde apoptoz sürecinde rolü olan biyokimyasal ve genetik komponentlerin aydınlatılmasıyla birlikte apoptozun aktivasyonuna ya da inhibisyonuna yönelik çalışmalar; kanser, AIDS ve otoimmün bozukluklar gibi birçok hastalıkta yeni tedavi olanaklarını gündeme getirmektedir (Tomatır 2003).

DNA tek veya çift iplik parçaları ve nükleotit azlığı, DNA-bağlı transkripsiyon faktör p53 ile başlayan bir dizi olayı aktive eder ve hücre apoptotik yola gider (Choi ve ark 2004).

İnsanda apoptozun düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir süreçtir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzar. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı, bir transkripsiyon regülatör geni olan p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra ya G1'de hücre siklusunun durmasını indükleyerek tamir için gerekli zamanı kazanır ya da hasar fazlaysa apoptoza yönlendirir. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2, Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği düşünülmektedir (Choi ve ark 2004).

Apoptozun regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır. Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak çalışırlar (Nagata 1997).

Bcl-2 üyeleri;

Antiapoptotik	Proapoptotik	
Bcl-2	Bax	Blk
Bcl-xl	Bod	Bak
Boo	Bcl-xs	
Bcl-w	Bid	
A1	Bim	
Mcl-1		

Antiapoptotik Bcl-2 üyeleri, aminoasit sıraları en az üç dört bölgede Bcl-2'ye benzerlik gösterir. Proapoptotik Bcl-2'lerin hepsinde BH₃ bölgesi vardır. Antiapoptotiklerde bu bölge yoktur (Bilgici 2004).

Son yıllardaki hücrenin yaşamı ya da ölümü konusundaki araştırmalar dikkatleri mitokondri üzerinde toplamıştır. Mitokondriler çift zarlı organellerdir. Bcl-2, 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında yerleşmiştir (Goumenou ve ark 2001). Bu proteinler iyon alış-verişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki yaparlar. Özellikle antiapoptotik genler içinde yer alan Bcl-xL'in

mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi koruduğu ileri sürülmektedir. Bu sayede apoptoz inhibisyonu gerçekleşmektedir (Gastman 2001). Bcl-2 ailesinin bir diğer ilginç özelliği de reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol etmesidir. Bax proteinleri sitoplazmada da bulunur. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının 'permeabilite geçiş poru'na doğru yönelirler ve buraya bağlanırlar. Bu bağlanma seçici iyon geçirgenliğini (permeabilitesini) azaltabilir (Kaneda ve ark 1999). Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler. AIF doğrudan kromatin yoğunlaşmasının ve nükleer fragmentasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9' u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptosom' olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9' un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (Tomatır 2003).

Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozun neden enerji gereksinimi duyduğunu açıklamaktadır. Apoptozun mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimlerdir (kaspazlar) (Nagata 1997).

Ölüm reseptörleri; TNF (Tumor Necrosis Factor) reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri ölüm alanı adı verilen bir aminoasit dizisini içerir ve adaptör proteinlere bağlanırlar. Bilinen altı tane ölüm reseptörü; CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) -R1, TRAIL-R2, TNF-R1, DR3 ve DR6 'dır (Nagata 1997).

Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonucunda kaspazlara bağlanıp onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF reseptörü-1 (TNFR1) ve Fas (CD95) karaciğerde bol miktarda bulunur. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi (kaskadı) aktive olur ve kaspazlar aktive olan DNAaz aracılığı ile DNA yıkımına neden olur. Memeli hücrelerinde sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplazmada inaktif prokürsörler olarak bulunur. Diğer adı ile ICE proteazlardır ve bir proteaz aktivasyon dizisi (şelalesi) başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol almaktadır, bu sırada

nükleazlar da aktive olarak DNA fragmentasyonu ve RNA degradasyonu gerçekleşmektedir. Sitokrom c'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur (Topal ve ark 2004).

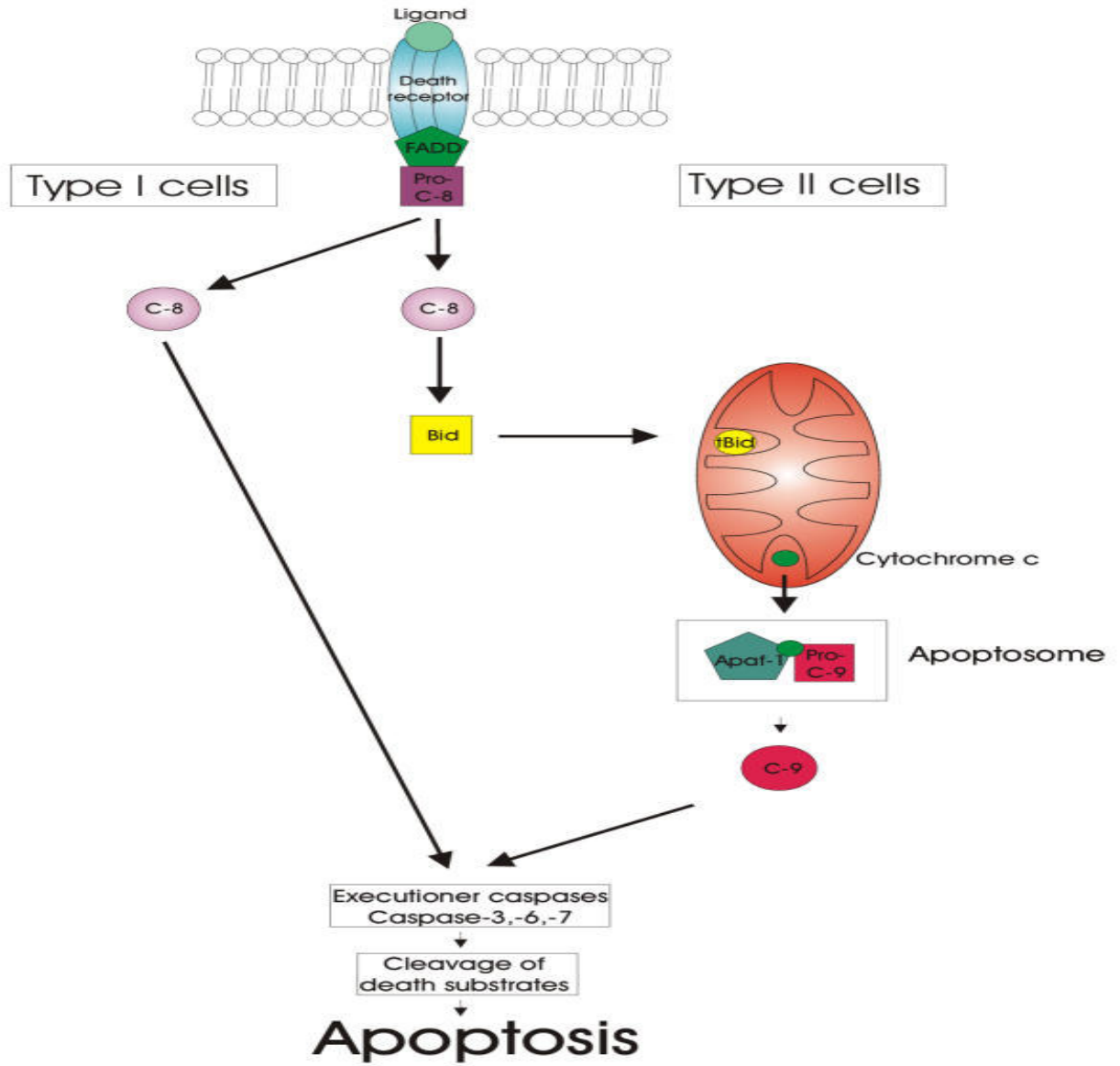
Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunurlar (kaspaz 1, 4, 5, 13), proteolizisin başlatıcıları (kaspaz 3, 6, 7) olarak sınıflandırılırlar. Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve ölüme yönlendirirler ama infazı gerçekleştirmezler bunu yapacak olanları aktifleştirirler. İnfazı gerçekleştiren uygulayıcı kaspazlar başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler (Tomatır 2003).

Kaspazlar bir grup sistein proteaz enzimidir. Apoptozis için gereklidir. Basulovirus protein P³⁵, tüm kaspazların potent inhibitörüdür. Kaspazlar, apoptozisin son devresindeki hücrel substratların degradasyonundan sorumlu olduğu gibi apoptozisin başlatılmasında da kritik önemi vardır. Memelilerde en az 14 kaspaz vardır. Bunlar tetrapeptit motifleri tanır ve substratı, bir aspartat rezidüsünün karboksil tarafından ayırır. Kaspazlar, düşük intrensik etkinlik gösteren zimojenler olarak sentezlenir. Aktif enzim 20 kD'luk subünite ilaveten 10 kD'luk subünit bulunan bir heterotetramerdir. Kaspaz 8 ve 9, başlatıcı kaspazlardır ve efektör kaspazların aktivasyonunu başlatır. Efektör kaspazlar; DNA onarım enzimleri, Lamin, Gelsolin, MDM2 (P⁵³ inhibitörü) dir (Bilgici 2004).

Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir (Donoghue ve ark 1999). Ayrıca IAP (Inhibitors of Apoptosis) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir. Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı olarak gözlenirler. Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bu nedenle c-asp-ases adını almışlardır. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis şekillenmez ve apoptotik cisimcikler oluşur (Nicholson ve ark 2004).

Kaspazlar ;

Apoptozisi Başlatanlar	Apoptozisi Yürütenler	Sitokin Aktivasyonu Yapanlar
C-2 C-8 C-9 C-10	C-3 C-6 C-7	C-1 C-4 C-5 C-11 C-12
		C-13 C-14



Şekil 6. Tip I ve II hücrelerinin içerisindeki TNF ailesinin aracılık ettiği apoptozis (Westphal ve Kalthoff 2003).

Şekil 6'da görüldüğü gibi; Apoptozis tip 1 ve tip 2 hücrelerinin içerisindeki TNF ailesinin ölüm reseptörleri tarafından aracılık edilmektedir. Apoptozis, 2 alternatif yol tarafından başlatılabilir. Tip 1 hücrelerinin içerisinde başlatıcı kaspazın miktarı direkt olarak öldürücü kaspazı ikna etmeye yeterlidir veya tip 2 hücrelerinin içerisinde mitokondrinin etkisinin artırılması gereklidir. Aktif hale gelmiş öldürücü kaspazlar ölüm substratlarını ayırır (Westphal ve Kalthoff 2003).

1. 1. 7. Apoptozun Sitotoksik Regülasyonu

1. 1. 7. 1. Granzim veya Perforin Sistemi

Bu salgısal apoptotik yol, patojenle infekte hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında etkilidir. Perforinler ve granzimler, sitotoksik T lenfositler ve Natural Killer hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içinde bulunan proteinlerdir. Sitotoksik T lenfositler, hedef hücreye bağlandığında perforinler salgılanır ve salgılanan perforinler hedef hücre üzerinde dairesel bir por oluştururlar. Bu perforin poru, hücre içine kalsiyum girişinde hızlı bir artışa sebep olur. Granzim B, reseptör aracılığı ile bir vezikül içinde açılan delikten hedef hücreye girer (Erdoğan 2003).

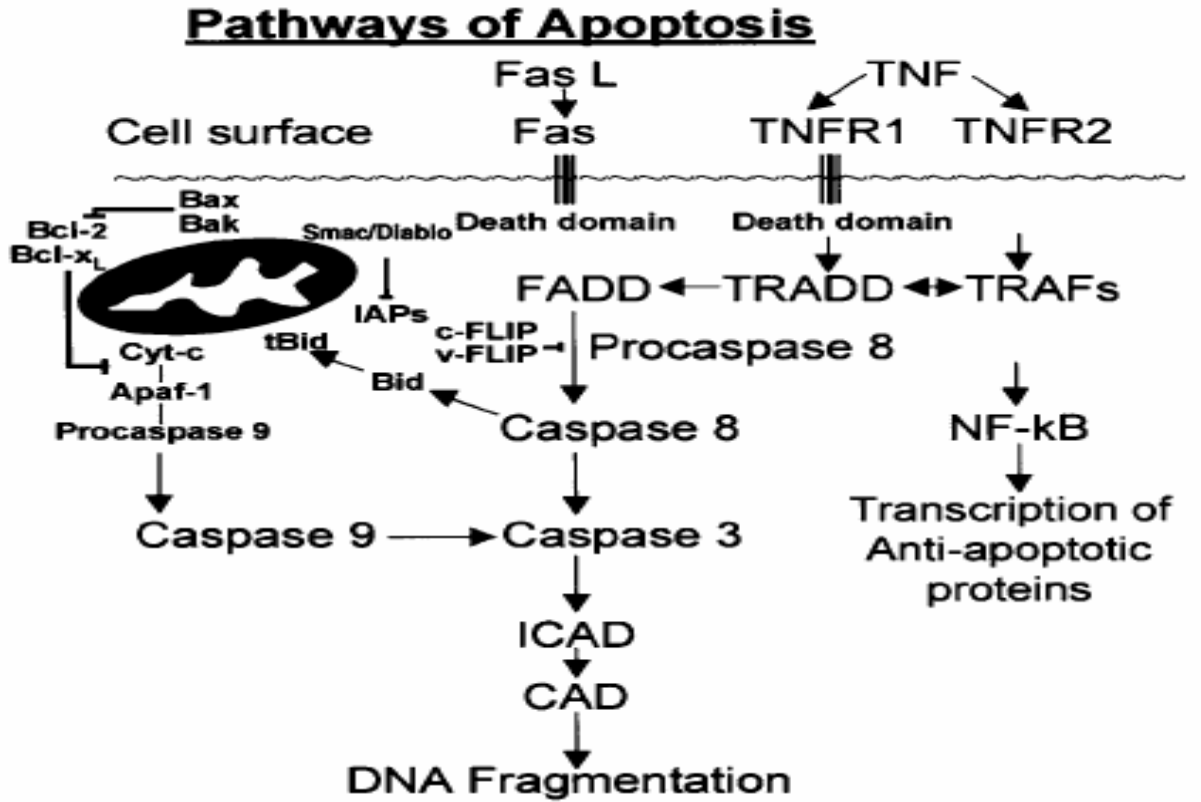
Hücre içine giren perforin proteini, vezikülden granzim B'nin serbest kalmasını sağlar. Bu andan itibaren granzim B hızlı bir şekilde DNA fragmentasyonunu ve apoptoz ile birlikte prokaspaz aktivasyonunu başlatır. Bununla birlikte granzim A'da, perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız yolda apoptozda rol alır (Tomatır 2003).

1. 1. 7. 2. Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu

Apoptozun salgıdan bağımsız mekanizması, hücre zarı üzerinde bulunan 'ölüm reseptörlerinin' aktivasyonu ile ilişkilidir. Fas (CD95), hücre yüzey reseptörüdür ve TNF ailesinin bir üyesidir. Apoptotik işaretin uyarıcısı olan Fas, birçok hücre tipinde sergilenir. Fas ligandı (FasL) da TNF ailesinin bir üyesidir. Özellikle sitotoksik T hücreleri ve Naturel Killer hücreleri üzerinde bulunur. FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik işlem başlar. Bu mekanizma, bir immun tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs

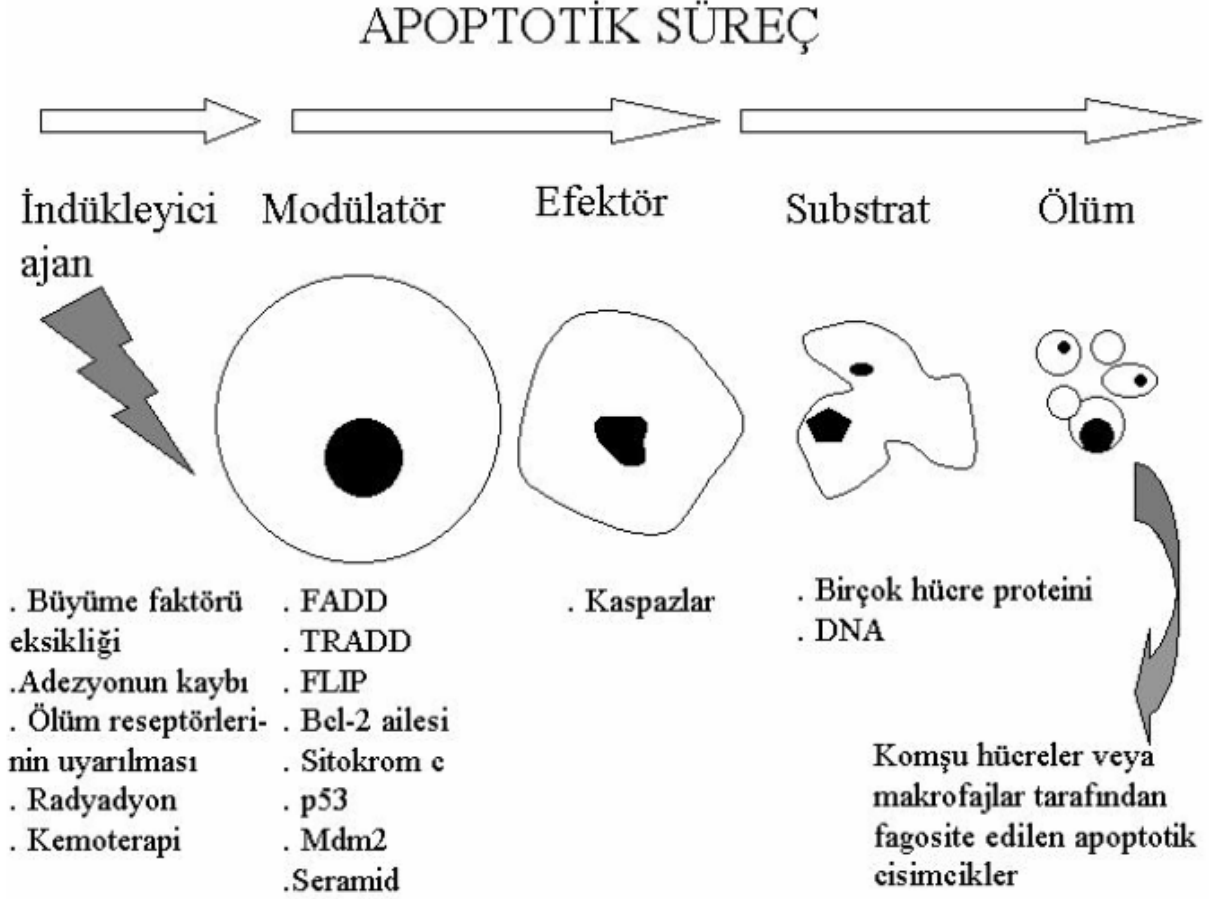
infekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. TNF'in TNFR-1'e bağlanmasıyla da benzer olaylar şekillenir (Essmann 2000).

Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantısı, bir ölüm alanını (Death Domain, DD) içerir. Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD (Fas Associating protein with a Death Domain protein) ve RIP (Receptör Interacting Protein) ile etkileşimdedir. Ölüm alanlarını içeren bu TRADD ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozu doğrudan uyarırlar. Aktive olan kaspaz-8 daha sonra diğer uygulayıcı kaspazları aktive eder (Tomatır 2003).



Şekil 7. İki önemli apoptozis yolu: Extrinsik (Fas ve diğer TNFR ailesi üyeleri ve ligandları) ve İntrinsik (Mitokondri ilişkili). Her iki yol da kapsaz 3' ün aktivasyonuna ve apoptotik hücre ölümünün artmasına neden olur. Direkt olarak hücre ölümünü etkileyen ve DNA Fragmentasyonu ile sonuçlanan birkaç protein şekilde gösterilmiştir (Schultz ve ark 2003).

1. 1. 8. Apoptotik Süreç



Apoptotik süreç (Ulukaya 2003).

1. 1. 9. Apoptozisin Modülâtör (mediatör) leri

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

organizasyonunda rol alabilirler. Fakat hücreye kalsiyum girişi apoptozisin gerçekleşmesi için esansiyel değildir. Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs), bir kısmının ise inhibe ettiği (Bcl-2, Bcl-X₁) geniş bir ailedir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin proapoptotik ve antiapoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax'ın bazı hematolojik malignensilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bu durum prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir. Yapılan bir çalışmada, Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bcl-2'nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği görölmüştür (Higuchi 2003).

Seramid, membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plazma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünölmektedir. p53 hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi) DNA hasarı oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozisi indökler. p53'ün apoptozisi indöklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir. Bazı virüsler (papillom virüsü, adenovirüs tip 12), ya p53'ü inaktive ederek ya da Bax'a bağlanarak apoptozisi bloke ederler, böylece bu virüslerin enfekte ettikleri hücreler doğal hücre ölüme mekanizmasından kurtulduklarından virüsle indöklenen karsinogenezise bu yolla katkıda bulunurlar (Ulukaya 2003).

Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversible bir döneme girildiğini işaret eder. Mitokondriden apoptozis indökleyici faktör (AIF) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'ninde katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspazla aktiveleşen deoksiribonökleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla

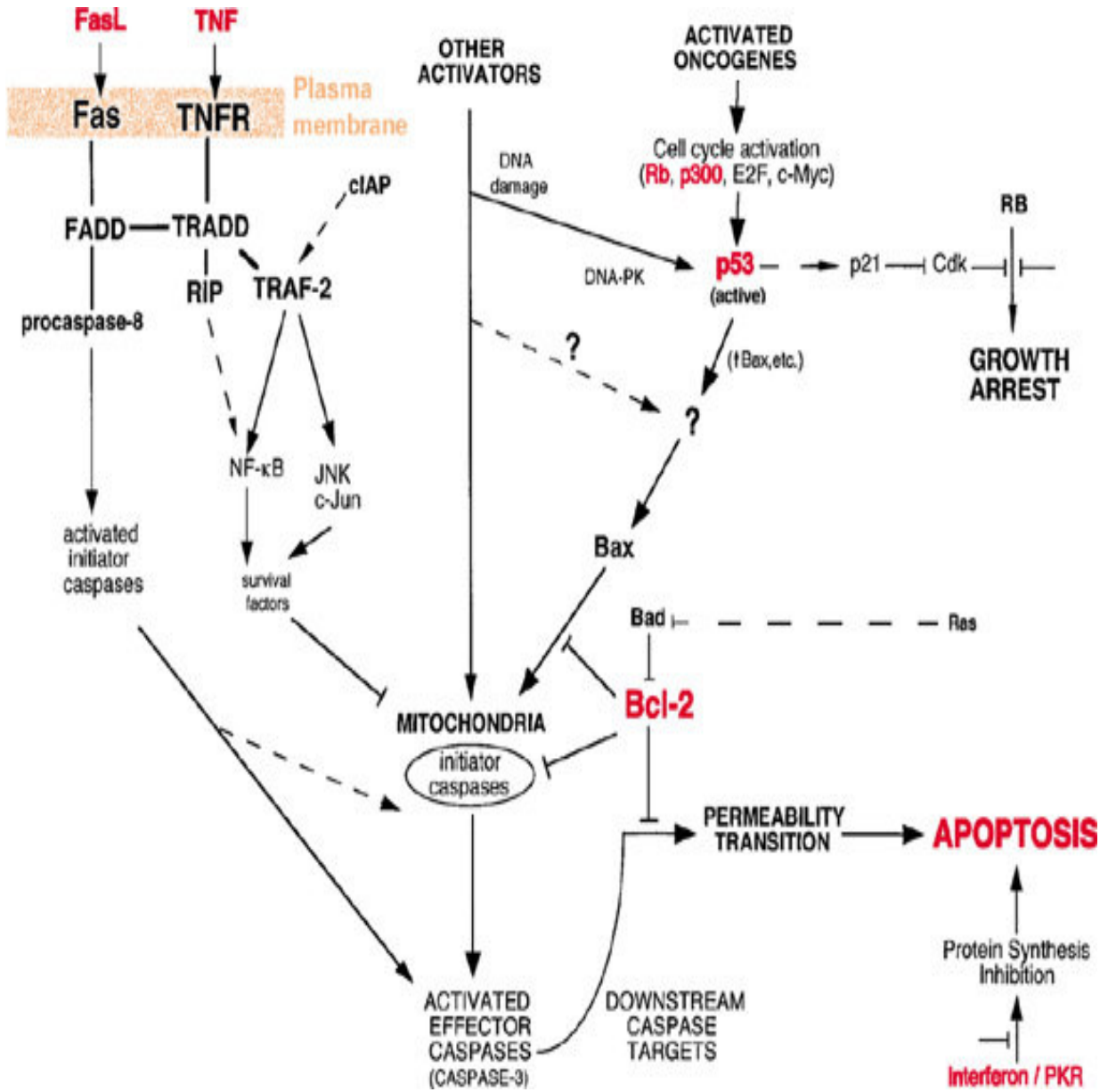
aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadar kaspaz bağımlı mekanizma açıklandı, oysa kaspaz bağımsız apoptozis varlığı da bilinmektedir. Kaspaz bağımsız apoptozis yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF etkisiyle gerçekleştirilir (Huang ve ark 2005).

Kaspazlar, zimojen olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir. Kaspaz kaskadı, sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz-9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlarda sitokrom c'nin salıverilmesine neden olabilirler. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP'leri kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP' ler ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilirler (Fabbi ve ark 1999).

Perforin porlar sitozolik kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açar. Beraberinde salgılanan ve bir serin proteaz olan granzimin de bu porlar aracılığıyla hücreye girmesiyle hücre içinde prokaspaz 8'in aktivitesi, dolayısıyla kaspaz kaskadı başlatılır. Bu da enfekte hücreyi (veya kanser hücrelerini) apoptozise götürür (Erdoğan 2003).

1. 1. 10. Apoptozisin İndüklenmesi

Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörü membranında bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokardda bulunurlar. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır. Örneğin kaspaz 8 (FLICE) FLIP (FLICE-inhibitory protein)'i inhibe eder (Bender ve ark 2005).



Şekil 8. Apoptozisin indüklenmesi (Barisic ve ark 2003).

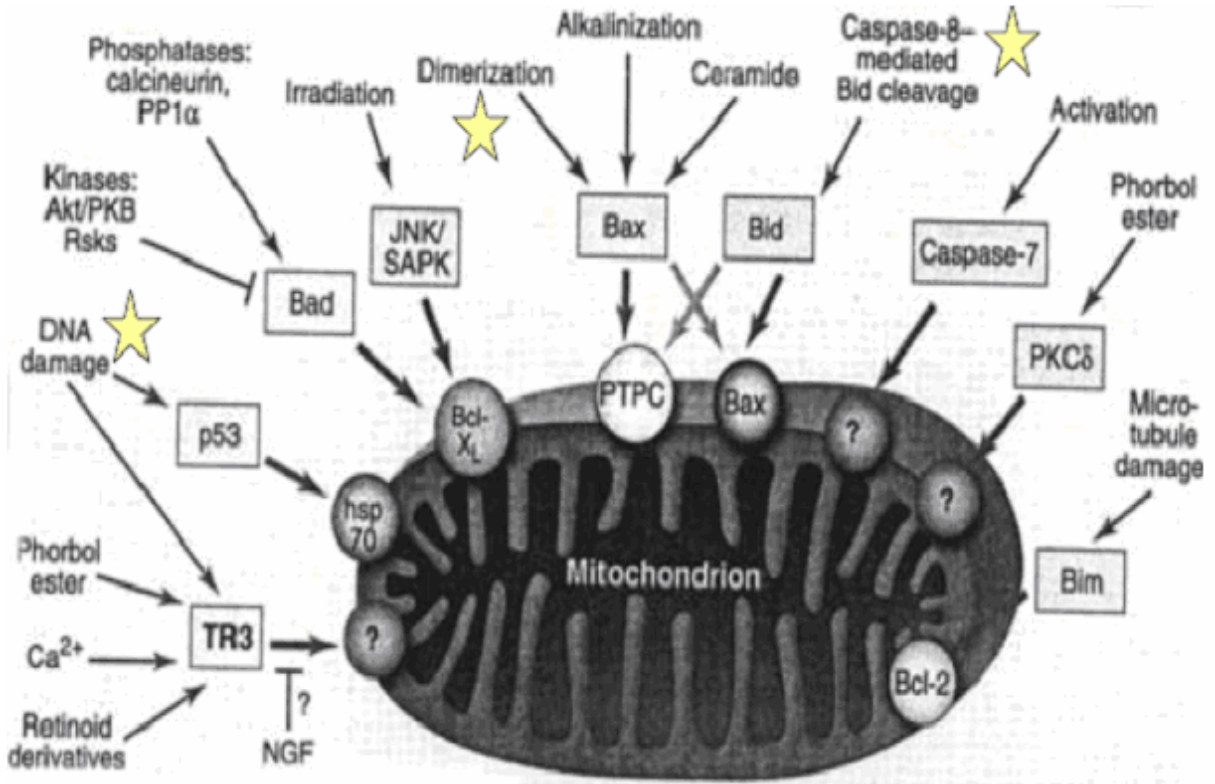
Önceden de değinildiği gibi apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53'ün indüksiyonuyla da başlatılabilir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatır. p53

bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilir. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilir (Bender ve ark 2005).

Apoptozis büyüme faktörlerinin ortamdan eksilmesiyle de başlatılabilir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığına maruz bırakılırlarsa apoptozisle ölürlür. Buradaki mekanizma, apoptozis indükleyici bir nükleer protein olan p53 aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşir. Ayrıca bir proapoptotik (apoptozis uyarıcı) bcl-2 ailesi üyesi olan Bad'ın fosforillenmemesi sonucu aktifleşmesi ve böylece mitokondriden apoptozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi yoluyla da gerçekleşir. Apoptozisi başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen granzim B'lerin hedef hücrede kaspaz sistemini aktifleştirmesidir (Öniz 2004).

1. 1. 11. Apoptoziste Mitokondrinin Rolü

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi) apoptotik süreçte irreversible noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir. Hem proapoptotik hem de antiapoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi gerçekleşir (apoptozisin başlaması) veya sitokrom c'nin sitoplazmaya salıverilmesi baskılanır (apoptozisin inhibisyonu) (Piret ve ark 2004).



Şekil 9. Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği noktanın mitokondri olduğunu gösterilmesi (Ulukaya 2003).

1. 1. 12. Kaspazların Substratları

PARP: Poli (ADP-Riboz) Polimeraz'dır. DNA tamir mekanizmasında rol alan bir enzimdir.

DNA-PK: DNA bağımlı bir protein kinazdır.

PRb: Retinoblastoma geninin ürünüdür. Hücre siklusunun durdurulmasında rol alır.

Lamins: Nükleus membranında yer alan yapısal proteinlerdir.

NuMA: Nükleus mitotik aparat protein.

Fodrin: Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.

β-Aktin: Hücre iskeletinde yer alan yapısal bir proteindir.

Mdm2: Tümör süpressör protein olan p53'ün inaktivasyonunu sağlayan bir proteindir.

Cyclin A2: Hücre siklusunda rol alır ve siklusun ilerlemesini sağlar.

Presenilin: Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda biriktiği görülen bazı bileşiklerdir.

Diğerleri: Metabolik aktivitelerden sorumlu bazı kinazlar gibi (Boulares ve ark 1999).

1. 1. 13. Apoptozisin Özet Olarak Belli Başlı Aşamaları

- Apoptozisin indüksiyonu
- Hücre yüzey ölüm reseptörlerinin uyarılması
- Sitokrom c'nin salıverilmesi
- Apoptozom oluşumu (sitokrom c + Apaf-1 + kaspaz-9)
- Mitokondriyal transmembran potansiyelin değişmesi
- Kaspazların aktivasyonu
- Fosfatidilserinin hücre membranının iç yüzünden dış yüze transloke olması
- DNA'azın aktivasyonu sonucu DNA'nın fragmentasyonu (internükleozomal DNA fragmentasyonu)
- Yapısal proteinlerin yıkılmasına bağlı olarak apoptozise özgü morfolojik değişikliklerin meydana gelmesi (Antar 2005).

1. 2. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin, aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlanmıştır. 90'lı yılların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur. Böylece kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metotlarla saptanabilen apoptozis 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır. 2000'li yılların başlarında apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir (Stassi 2006).

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler;

-Morfolojik görüntüleme yöntemleri

-İmmunohistokimyasal yöntemler

-Biyokimyasal yöntemler

-İmmunolojik yöntemler

-Moleküler biyoloji yöntemleri

1. 2. 1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

1. 2. 1. 1. Işık Mikroskobu

1. 2. 1. 1. 1. Hematoksilen Boyama

1. 2. 1. 1. 2. Giemza Boyama

1. 2. 1. 2. Floresan Mikroskobu/Lazerli Konfokal Mikroskop

1. 2. 1. 2. 1. Propidium İyodür (PI)

1. 2. 1. 2. 2. Hoechst Dye

1. 2. 1. 3. Elektron Mikroskobu

1. 2. 1. 4. Faz Kontrast Mikroskobu

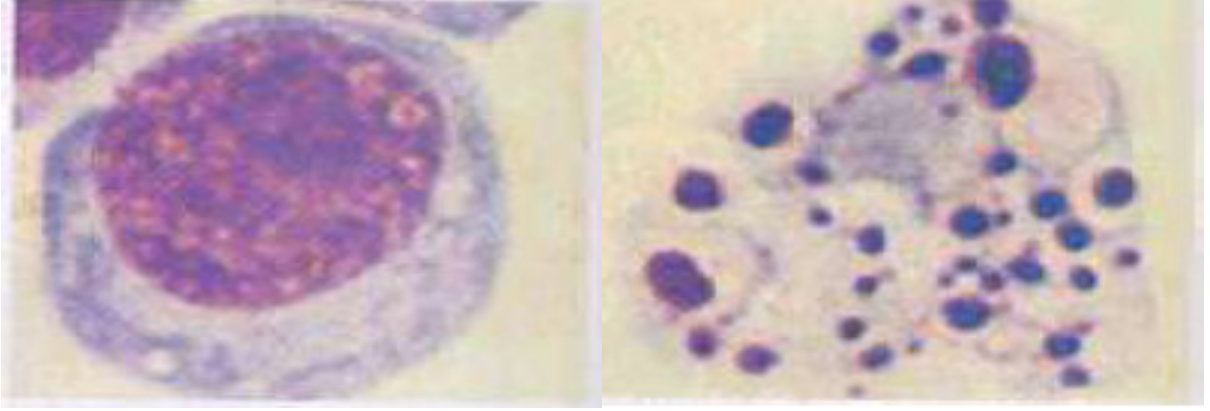
1. 2. 1. 1. Işık Mikroskobu Kullanımı

1. 2. 1. 1. 1. Hematoksilen Boyama

Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoksilen ile boyamadır. Hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. Hematoksilen boyama (HB) hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak başlanması uygundur (Mehmet 2006).

Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptozise özgü gözlenebilen değişiklikler; hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin yoğunlaşması ve

nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesidir (Mehmet 2006).



Resim 3. Normal ve apoptotik insan lökosit hücresi (Yılmaz 2005)

1. 2. 1. 1. 2. Giemsa Boyama

Nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilin boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilin boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (Ulukaya 2003).

1. 2. 1. 2. Floresan Mikroskopu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı

Floresan maddelerin (örn: propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Oysa hematoksilin ya da Giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı zaten ölüdür. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn: propidium iyodür) beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip; canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının sağlam olup olmadığıdır. Membranı intakt (canlı) olan hücreler propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile

boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskobu ile tanınabilirler. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilin boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır (Vairetti ve ark 2005).

Kromatin yoğunlaşması veya nükleus fragmentasyonu olan hücreler apoptotik hücreler olduklarını düşündürür. Hücrelerin detaylı ayırımı aşağıdaki kriterlere göre yapılır (Kanoh ve ark 1999);

-Nekrozisle ölen hücreler; Ölü oldukları belirlenen (hem propidium iyodür hem de Hoechst boyası pozitif) hücrelerin nükleuslarında apoptotik değişiklikler görülmez. Nükleus paterninde büyük değişiklik yoktur. Nükleusun başlangıçta daha küçük olduğu gözlenebilir ama ileri evrelerde normale göre biraz daha büyümüş görülebilir. Boya yoğunluğu başlangıçta daha fazla olabilir ama ileri evrelerde yoğunluk apoptotik hücrelere göre daha az bulunabilir.

-Apoptozisle ölen hücreler; Apoptotik hücrelerde hücre zarı eğer sekonder nekrozis gelişmemişse canlı olduğundan propidium iyodür ile boyanmaz ama Hoechst boyası pozitifdir. Yani propidium iyodür negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanırlar. Fakat apoptozise özgü nükleus morfolojisi bu hücrelerde tanı koydurucudur. Tipik nükleus fragmentasyonu en önemli bulgudur.

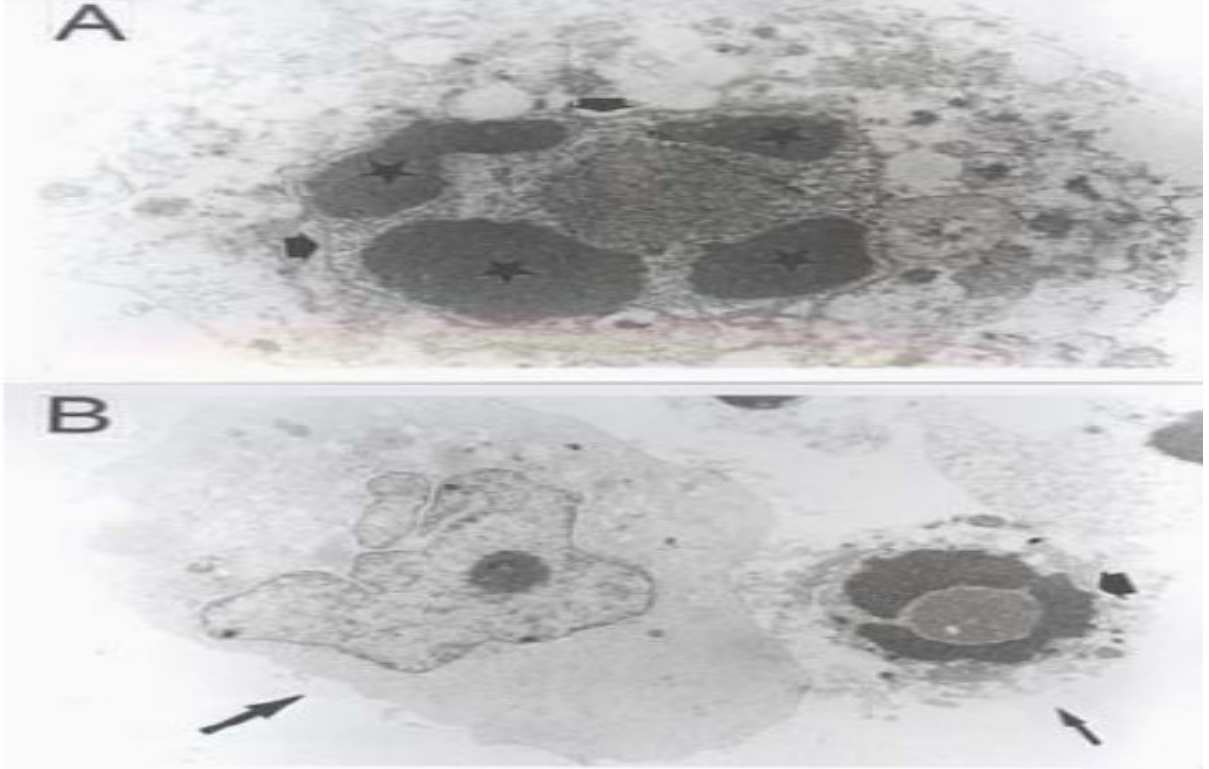
-Normal (canlı) hücreler; Propidium iyodür negatiftir. Hoechst boyası ile boyanırlar ve nükleus normaldir.

Özet olarak; Nekrotik hücreler, Hoechst boyası (+) ve propidium iyodür (+), Apoptotik hücreler Hoechst boyası (+) propidium iyodür (-) ve apoptotik morfoloji (+), Normal hücreler, Hoechst boyası (+) propidium iyodür (-) ve apoptotik morfoloji (-)'dir (Kanoh ve ark 1999).

1. 2. 1. 3. Elektron Mikroskobu

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir. Üstelik subsellüler detaylar (örn: mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının

bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) da incelenebilir. Resim 4'deki elektron mikroskobu çalışmalarında, üstteki (A) resimde nükleus fragmentasyonu net olarak izlenebilmektedir. Altındaki resimde (B), solda normal bir hücre görülmektedir sağdaki apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin yoğunlaşması ve fragmentasyonu izlenebilmektedir (Ulukaya 2003).



Resim 4. Nükleus fragmentasyonu, normal ve apoptotik hücrelerin gösterilmesi (Ulukaya 2003).

1. 2. 1. 4. Faz Kontrast Mikroskobu

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında veya pleytlerde büyütüldüğü çalışmalarda hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları substratından ayrılacakları için besiyer içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler. Gerek mitozisde gerekse apoptozisin erken evresinde

hücreler üzerine yapıştıkları substratuma yayılmış halde değil, tam tersine yuvarlaklaşmış ve küçülmüş olarak görülürler. Faz kotrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cecikler izlenebilir. Hücreler henüz substratuma yayılmış haldeler ise hücrelerin sitoplazmasında ortaya çıkan vakuoller de gözlenebilir. Ayrıca, bazı hücre tiplerinde blister olarak adlandırılan hücrenin sitoplazmasından dışarıya taşar gibi görülen bir veya birkaç tane büyük vakuoller de gözlenebilir (Yılmaz 2005).

Blisterlerin oluştuğu aşamada membran bütünlüğü halen tamdır ve bu aşamada nükleus morfolojisindeki değişiklikler floresan boyalarla gözlenebilir. Fakat bu dönem uzun sürmez dakikalar içinde membran bütünlüğü bozulur (Antar 2005).

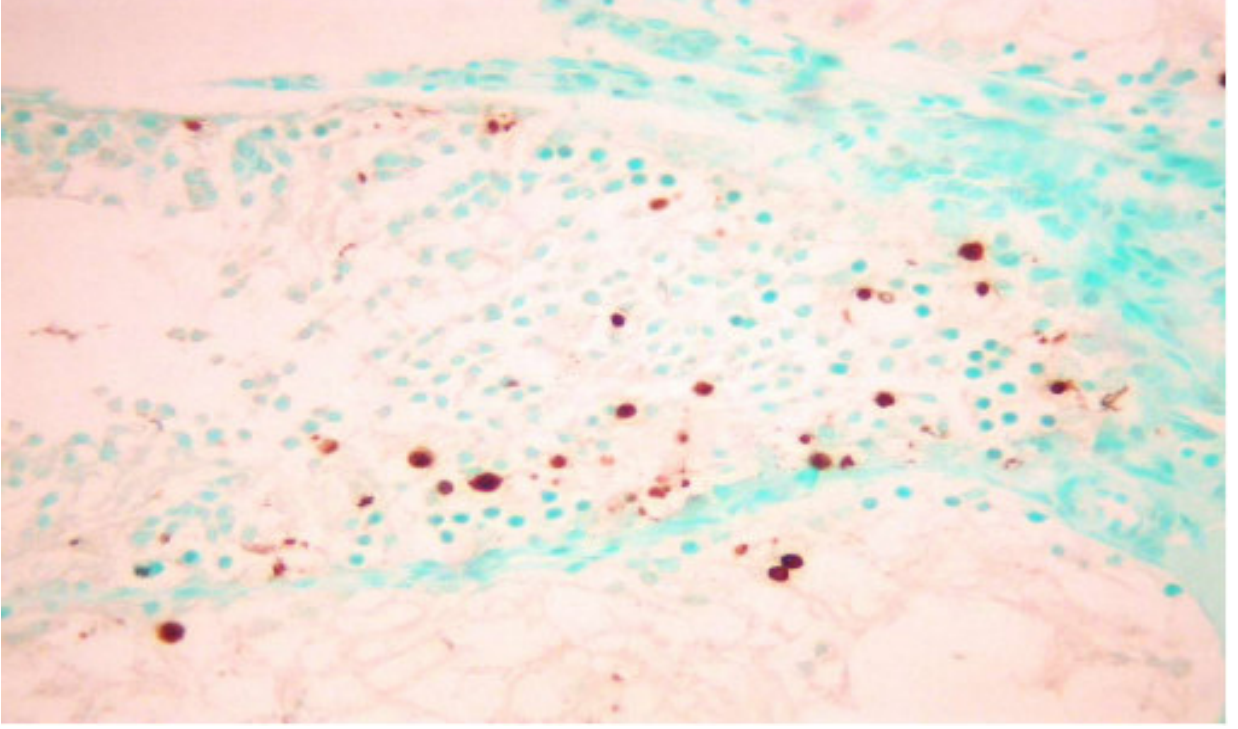
1. 2. 2. Histokimyasal Yöntemler

1. 2. 2. 1. Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoze giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (Vairetti ve ark 2005).

1. 2. 2. 2. TUNEL Yöntemi

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar (Rogakou ve ark 2000). Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya pleytlere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir (Watanabe ve ark 1999).



Resim 5. TUNEL metodu uygulanmış rat testis dokusu (kahverengi boyanmış apoptotik hücreler) (Yılmaz 2005).

1. 2. 2. 3. M30 Yöntemi

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (Yılmaz 2005).

1. 2. 2. 4. Kaspaz-3 Yöntemi

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 İHC metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoze yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilirse apoptotik hücreler bu metotla tespit edilebilirler (Antar 2005).

1. 2. 3. Biyokimyasal Yöntemler

Agaroz Jel Elektroforezi; DNA fragmentasyonu

Western Blotting; Substrat kırılmaları, aktif kaspaz'ın belirlenmesi, sitokrom c salıverilmesi.

Flow Sitometri; DNA azalması, Anneksin V (Ulukaya 2003).

1. 2. 3. 1. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü (ladder pattern) oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekrozisde görülmez. O yüzden apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (Hekim 2003).

1. 2. 3. 2. Western Blotting

Bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örneğin, bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örneğin, kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metodla yapılabilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır (Liu ve ark 2006).

1. 2. 3. 3. Flow Sitometri

Flow sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozisde eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozis deteksiyonu açısından kullanışlıdır. Özellikle apoptozis deteksiyonu, floresan bir madde olan propidium

iyodür veya Anneksin V kullanılarak iki şekilde yapılır. Birincisinde kompleks bilgisayar işlemlerinin kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu (sub-G1 piki) tayin edilir. İkincisinde, floresan mikroskopuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınır. Flow sitometri grafiklerinde sağ-alt kadrandaki popülasyon anneksin V'in pozitif ve propidium iodid'in negatif olduğu apoptotik hücrelerin bulunduğu bölgedir (Laurenzi 2006).

1. 2. 4. İmmunolojik Yöntemler

ELISA; DNA Fragmentasyonu, M30 Düzeyi

Fluometrik Yöntem; Kaspaz aktivasyonu (hücre kültürü)

1. 2. 4. 1. ELISA

ELISA ile apoptotik süreç sonunda parçalanmış ve sitoplazmaya sızmış mono yada oligonükleozomları saptamak amaçlanır. Bu yöntemle hücre lisatlarında, hücre kültürlerinde, hücre kültür süpernatantlarında ve serum ya da plazmada çalışmak mümkündür (Brugere ve ark 1999). Hücre kültür ortamında genellikle normal sağlıklı hücreler, apoptotik hücreler ve nekrotik hücreler birlikte bulunurlar (Hekim 2003). Çalışma yöntemi santrifügasyonla başlar. Elde edilen süpernatant muhtemelen nekrotik proses sonucunda ortama salınan nükleer materyali içerebilir. Bu yüzden de süpernatant santrifügasyondan sonra atılır. Geri kalan materyal yıkanır ve süpernatant tekrar atılır. Böylece nekrotik hücreler uzaklaştırılır. Geriye kalan normal hücreler ve apoptotik hücrelerin sitoplazmik nükleozomları çıkarılmak için hücre plazma membranı permeabilize edilir ve elde edilen sitoplazmik materyalde nükleozomlar ELISA yöntemi ile tespit edilir. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (Frankfurt ve Krishan 2001).

1. 2. 4. 2. Fluorometrik Yöntem

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu pleytlere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutulduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (Yılmaz 2005).

1. 2. 5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

DNA Microarrays; Gen ekspresyon dereceleri (mRNA), hücre ölüm reseptörleri, kaspazlar (Antar 2005).

1. 3. Tedavide Apoptoz

Bugün birçok hastalığın hücre ölümü ya da yaşamı ile ilgili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle apoptotik sürece müdahale ederek yeniden düzenlenmesi, önemli tedavi yöntemlerini gündeme getirebilir. Potansiyel tedavi yöntemleri üç kategoride toplanabilir ki bunlar; gen tedavisi (p53'ün yedeklenmesi vb), apoptoz moleküllerinin düzenleyicilerini hedefleyen moleküllerin enjeksiyonu (Growth faktörler ve çözülebilir FasL vb.), apoptozla ilişkin genlerin ifadesini (ekspresyonunu) düzenleyen farmakolojik küçük moleküller (Bcl-2 vb.). Bugüne kadar non-steroidal antiinflamatuvarlar gibi apoptoz düzeyini değiştirdiği bilinen birçok ilaç vardır. Aslında bütün sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi programları tümör hücrelerinde apoptozu başlatır ve apoptoza olan direnç tedavideki başarısızlığı getirir. Üstelik bu tedaviler, normal hücrelerde de apoptozu başlatır ve kemik iliği üzerinde olumsuz yan etkileri vardır. Bu nedenle son zamanlarda geliştirilen yeni birçok tedavi denemeleri preklinikte ümit vericidir (Tomatır 2003).

Yapılan bir çalışmaya göre TRAIL, TNF ligand ailesinin bir üyesidir ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri DR4 ve DR5'e bağlanır. Bu reseptörlere bağlanma apoptozu başlatır. Hemapoietik ve solid tümörlerin TRAIL tarafından başlatılan apoptoza hayli duyarlı

olduğu birçok laboratuvar çalışmasında gösterilmiştir. Çoğu normal hücrenin ise DR4/5'in eksprese olmasına rağmen tersine TRAIL'e direnç gösterdiği gözlenmiştir. TNF'nin tersine yüksek doz TRAIL'in maymunlar tarafından tolare edilebildiği ve sitotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Ancak insan hücreleri üzerindeki etkisi henüz bilinmemektedir (Almasan ve Ashkenazi 2003).

Ayrıca virüsler ve bazı intraselüler bakteriler canlılıklarının devamı için farklı stratejiler geliştirmişlerdir. Örneğin; Bcl-2'ye benzer bir protein şifrelemek (Adenovirus); Bcl-2'nin ekspresyonunu uyarmak (Epstein-Barr Virus) Prokaspaz 1 ve 8'i inaktive eden proteaz inhibitörü şifrelemek (cowpox); mitokondriyal sitokrom c'nin sitozol içine salınımına müdahale etmek gibi. Virüs ve bakterilerin bu davranışlarının tedavide kullanılabileceği dşnlmştir. Örneğin; cowpox CrmA ve baculovirs p35 gibi. CrmA ineklerde görülen ek virüsünden elde edilir ve başlatıcı kaspazları inhibe eder. Asıl etkisi virüsün ilerleyebilmesi için inflamasyonun ve hücre ölümünün engellenmesidir. p35 ise bir baculovirs proteindir ve kaspaz aktivasyonu ile etkileşim içinde olan genel bir apoptoz inhibitörüdür. Özgül olarak, kaspaz 1, 2, 3 ve 4' inhibe eder. Bunların dışında apoptoz inhibisyonu yapan başka proteinler olduğu gibi sentetik özgül kaspaz inhibitörleri de üretilmektedir (Katano ve ark 2004).

Sonuç olarak; doku homeostazı, hücre çoğalması, farklılaşması ve ölümü arasındaki uyumlu ilişkiye bağlıdır. Apoptozun nemi, çeşitli biyolojik olaylarda gereksiz, hasarlı ya da zararlı hücrelerin inflamatuvar yanıt olmaksızın yok edilifini sağlamasından ve organizmanın i dengesinin devamlılığına katkıda bulunmasından ileri gelmektedir. Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmaksızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptoz ilgi çekici olduğu kadar insanlardaki önemli patojenlerin tedavisi açısından da umut verici bir mekanizmadır. Bu süreçte, kaspaz ailesi yeleri ve Bcl-2/Bax ailesindeki genlerin ekspresyonları önemli yer tutmaktadır (ztrk 2002).

Tablo 4. Apoptoza müdahale edilerek geliştirilen tedavi örnekleri (Tomatır 2003).

Mevcut tedaviler	
Aspirin, siklooksijenaz-2 inhibitörleri	Non-steroidan anti-inflamatuarların kolorektal adenoma ve kansere karşı koruyucu olduğu kanıtlanmıştır. Bu etki siklooksijenaz-2 enziminin inhibisyonu doğrultusunda apoptozun indüklenmesinden dolayı olabilir
Antikanser ilaçları, radyoterapi	Aslında bütün sitotoksik ilaçlar ve radyoterapi normal hücrelerde ve tümörlerde apoptozu indükler. P53'e bağımlı ve bağımsız mekanizmalar tanımlanmıştır
Yeni tedaviler	
Bcl-2 antisense	İlk klinik çalışmalar, non-Hodjkin's lenfoma gibi bazı hastalıkların olumlu sonuç verdiğini göstermiştir
Rekombinant TRAIL	Akciğer, göğüs, kolon ve böbrek kanserlerinin TRAIL'e karşı duyarlı olduğu ve apoptozu uyardığı prelinik çalışmalarla kanıtlanmış ve desteklenmiştir
Kaspaz inhibitörleri	Travmatik beyin yaralanması, amiyotrofik lateral skleroz ve Parkinson hastalığında pozitif prelinik hayvan modelleri
Antioksidanlar	Pyrolidinedithiocarbamate ve 6-hidroksi 2, 5, 7, 8-tetramethylchromancarboxylic acid (E vitamini analogu) floroaçil artışıyla kolorektal kanser hücrelerinde apoptozu indükler
İnterlökin-1 reseptör antagonistleri	Sıçan modellerinde iskemik beyin hasarında azalma

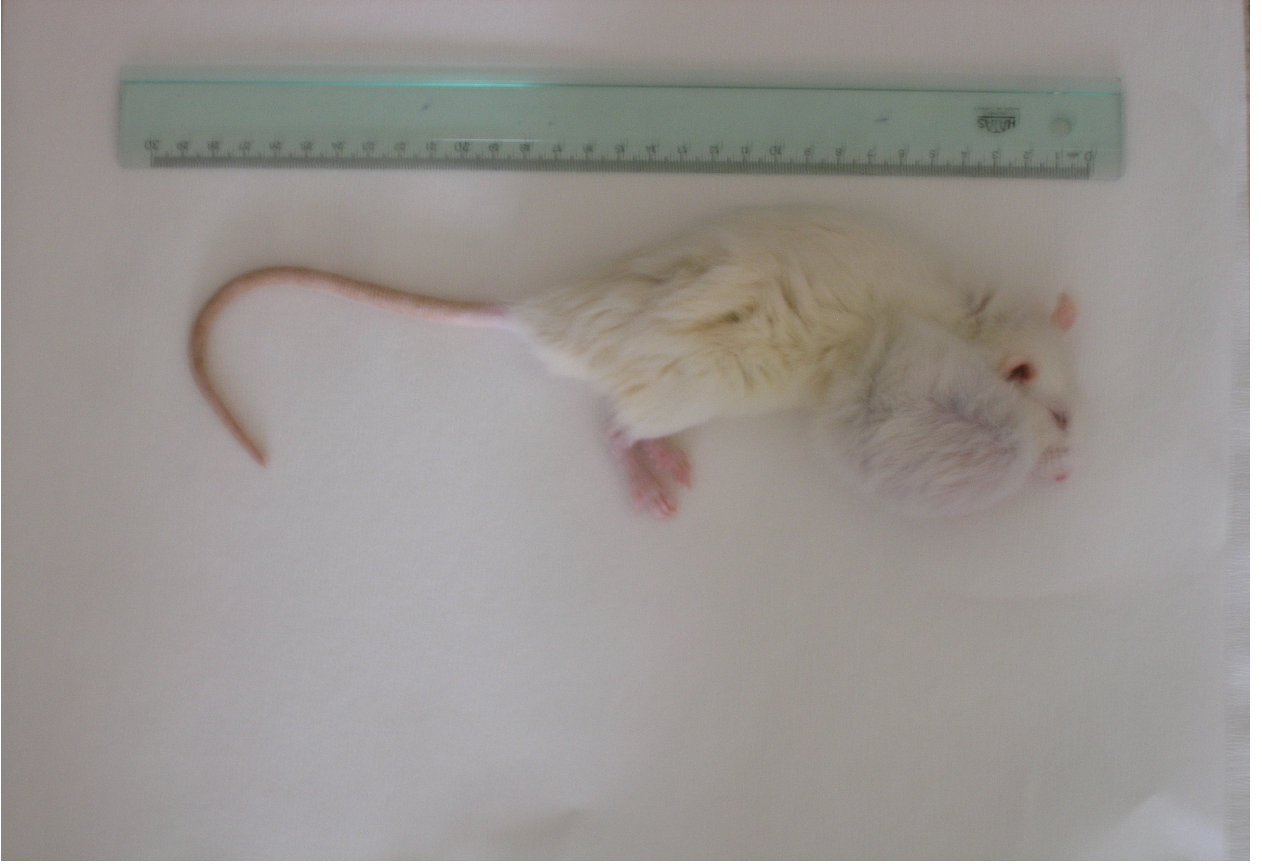
2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Gereç

2. 1. 1. Materyal ve Deneysel Fibrosarkoma Oluşturulması

Bu çalışmada, 8-10 haftalık ortalama 150 – 200 gram ağırlıklarında 16 adet erkek Spraque Dawley türü rat kullanıldı. Deneme süresince hayvanlar Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarında ışık (12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık) ve ısı ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) kontrollü odalarda % 20 protein içeren kuru pelet yem ve su *ad libitum* verilmek üzere izlendi.

Hayvanlar kontrol ve deneme grubu olmak üzere ($n = 8$) iki gruba ayrıldı. Deneme öncesi tüm hayvanların genel sağlık durumları kontrol edilip, palpasyonla deri altı herhangi bir anormal oluşum olup olmadığı incelendi. Deneysel fibrosarkoma oluşturmak için 0,25 ml susam yağı içinde çözdürülen 0,2 mg 3-metilcholantren deneme grubundaki ($n = 8$) ratların boyun bölgelerinin dorseline subkutan (deri altı) olarak tek doz enjekte edildi. Kontrol grubundaki ratlara ($n = 8$) ise 0,25 ml susam yağı boyun bölgelerinin dorseline tek doz deri altı yolla enjekte edildi. Deneme süresi 150-210 gün arasında oldu. Deneme süresi içerisinde hayvanlar periyodik olarak kontrol edilip tümöral oluşum yönünden palpe edildi. Tümöral oluşumların boyun bölgesinin dorseline hem palpe edilmesi hemde gözle görülebilir hale gelmesinden sonra ratlara eter anestezisi altında ötenazi uygulanarak tümöral dokular olduğu bölgeden [genellikle enjeksiyon yerinde, sağ üst dorsal boyun derisi altında, subepitelial bağ dokusunda, scapula kemiği üzerinde hatta sağ bacağı içine almış vaziyette (resim 6)] çıkarıldı ve ratların nekropsileri yapıldı.



Resim 6. Deneme grubundaki bir ratın fibrosarkomasının makroskopik görünümü.

Çıkarılan fibrosarkomalar makroskopik olarak beyaz zayıf demarke multinodüler tümör şeklinde görüldü. Tümörün lokal olarak invaziv şekilde büyüdüğü düşük düzeyde metastaze olduğu tespit edildi. Genellikle düzensiz, değişik büyüklükte (Fındıktan yumurta büyüklüğüne kadar) nodüler şekilli, iyi sınırlanmamış ve kapsülsüzdür. Kesit yüzü lobüllü, homojen gri beyaz renkli olup ratların birkaçında sarımsı renkte nekroz sahalarının olduğu tespit edildi (Resim 7).



Resim 7. Deneme grubundaki bir ratın fibrosarkomasının kesit yüzünün görünümü.

Çıkarılan tümöral oluşumların yarısı immunohistokimyasal yöntemle apoptotik hücrelerin tayini için % 10'luk tamponlu nötr formalin (Neutral buffered formalin / NBF) solusyonu içerisinde tespit edildi. Diğer yarısı ise ELISA yöntemi ile analiz yapılana kadar - 76°C 'de saklandı. Aynı zamanda kontrol grubundaki ratlara eter anestezisi altında ötenazi uygulanıp deri altı bağ doku alınarak yarısı - 76°C 'de diğer yarıda % 10'luk tamponlu nötr formalin solusyonu içerisinde tespit edildi.

NBF solusyonu içerisinde 24 saat tespit edilen dokular daha sonra akan çeşme suyu altında bir gece bekletilip ertesi gün rutin doku takip işlemlerinden sonra parafinde bloklandılar ve Bcl-2, Bax boyaması için seri kesitler alınana kadar + 4°C' de muhafaza edildi.

2. 1. 2. Kullanılan Cihazlar

Analizler sırasında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Parazitoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan; ELISA okuyucusu (Anthos 2010) ve çalkalayıcısı (Insel Hamble SO3 8DH England), Santrifüj (Sanyo Hawk 15/05), Histoloji Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan parafin eritme dispensarı, (Electrothermal Wax Dispenser), vakumlu etüv (Nüve Ev 018), mikrotom (Leica RM 2125RT), ADÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyokimya laboratuvarında bulunan Ultrasonik homojenizatör (Bandelin sonopuls HD 2200) ve Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında bulunan otomatik pipetler (İsolab 2-20µl, İsoTerm 20-200 µl, Brand 5-50 µl, İsoTerm 100-1000 µl), Ph metre pH 211 (Hanna, Amerika Birleşik Devletleri) kullanılmıştır.

2. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Analizler sırasında kimyasal madde olarak 3-metilcholantren (Aldrich 250mg, 213942), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Disodyum hidrojen fosfat dihidrat) (Merck, 6580), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sodyum hidrojen fosfat dihidrat) (Sigma, S9638), Na_2HPO_4 (Disodyum hidrojen fosfat) (Merck, 159323), KH_2PO_4 (Potasyum dihidrojen fosfat) (Merck, 4871), NaCl (Sodyum klorür) (Merck, 6400), formol (Merck, UN2209), etil alkol (Smyras, 2050500), xylol (Carlo Erba, 492306), eter (Carlo Erba, 447522), metanol (%96) (Merck, 106009), H_2O_2 (Merck, UN2014), Bcl-2 (Santa Cruz, E1904), Bax (Santa Cruz, G0104), sekonder antikor (Dako Cytomation, E0431), Hemalum boyası (Hematoxylin) (Merck, 1043020025), faramount (Dako, 2972) Cell Death Detection ELISA Plus kiti (Roche, 11774425001, Mannheim, Germany) kullanılmıştır.

2. 2. Yöntemler

2. 2. 1. Fibrosarkomalarda Apoptotik Hücrelerin İmmunohistokimyasal Olarak Belirlenmesi

Testin Yapılışı

Apoptotik hücrelerin gösterilmesi immunohistokimyasal olarak Avidin-Biotin Peroksidaz yöntemi ile yapıldı. Bunun için hazırlanmış olan bloklardan (Kontrol ve deneme grubundan) 5 µ kalınlığında, polysine kaplı lamlara seri kesitler alındı. Seri alınan kesitler bir gece etüvde (37°C) bekletildi. Ertesi gün xylo I' de 5 dakika, xylo II' de 5 dakika, %100'lük alkol I' de 3 dakika, %100 alkol II' de 3 dakika, %96' lık alkol' de 1 dakika ve %80'lik alkol' de 1 dakika bekletildi. Sonra distile su içine alınıp etüvde (37°C) 5 dakika bekletildi. Nemlendirilmiş 37°C' lik etüvde proteazda 15 dakika inkübasyona tutuldu. 10 dakika oda ısısında tutuldu. Kesitler 2 dakika ikişer kez PBS (fosfat buffer solution) ile yıkandı. Kesitlerde dokuların kenarı temizlendikten sonra %3' lük metanollü H₂O₂' de 15 dakika bekletildi. Takiben 2 dakika üçer kez PBS'de bekletildi. Lamaların kenarları kurularak % 1,5' luk normal domuz serumu (15 µl domuz serumu ve 985 µl PBS) damlatıldı ve 1 saat bekletildi. Ardından primer antikorda 30 dakika bekletildi [15 µl domuz serumu, 980 µl PBS ve 25 µl primer antikor (Bax, Bcl2)]. 3 kez PBS' de beşer dakika tutuldu. Sekonder antikorda 30 dakika bekletildi (15 µl domuz serumu, 980 µl PBS, 20 µl sekonder antikor). 3 kez PBS ile beşer dakika yıkandı. Avidin-Biotin enzim solusyonunda 30 dakika süre ile inkübe edildi. Sonra 3 kez PBS' de beşer dakika yıkandı. DAB (Diaminobenzidine) (50 mg DAB, 100 ml PBS)' da 5 dakika tutuldu. DAB olan lam şalesinin içerisine 100 µl H₂O₂ damlatıldı. En fazla 10 dakika bekletildikten sonra lamalar şaleden çıkarılıp Hemalum boyasında 2-3 saniye bekletildi. Çeşme suyu altında yıkandı ve ardından distile su ile yıkayıp lamaların üzerine faramount sürülerek lamel kapatıldı ve mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekildi.

2. 2. 2. Fibrosarkomalarda Apoptotik Hücrelerin Çekirdeklerindeki DNA Kırılmalarının ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

Apoptotik hücrelerin çekirdeklerindeki DNA kırılmalarının ölçümü, kantitatif sandwich enzim immunoassay prensibine dayanan ve apoptotik DNA fragmentasyonu esnasında oluşan

sitoplazmik DNA-histon kompleksinin belirlenmesini sağlayan Roche firmasının Cell Death Detection ELISA plus (Mannheim, Germany) hazır ölçüm kiti kullanılarak yapıldı.

Fibrosarkomalarda apoptotik hücrelerin çekirdeklerindeki DNA kırılmalarının ölçümü amacıyla - 76°C 'de muhafaza edilen tümör dokuları ve kontrol grubunun deri altı bağ dokuları dışarıya alındı ve hassas terazide 0,2 gram tartılarak ELISA kitinin içinde kullanıma hazır halde bulunan Lysis bufferden 1 ml ilave edilip Ultrasonik Homojenizatörde 5 vuruşlu %30 güçte 5 dakika homojenize edildi. Homojenizasyon işleminin ardından 20 000 g' de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant Roche firmasının Cell Death Detection ELISA plus hazır ölçüm kitinde kullanıldı. Bunun için 20 µl süpernatant streptavidin kaplı mikropleyt kuyucuklarına ilave edildi ve daha sonra her bir kuyucuğa 80 µl immunoreagent (Monoklonal antikor, antihiston-biotin ve anti-DNA-POD karışımı) eklendi. Reaksiyonun oluşması için 2 saat 15-25°C' de 200 rpm' de hafif çalkalayan çalkalayıcıda inkube edildi. Sürenin sonunda her bir kuyucuk inkubasyon buffer ile yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 100 µl ABTS [substrate 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonate) diammonium salt crystals] solusyonu eklenip 10 dakika oda sıcaklığında hafif çalkalayarak inkube edildi. Sürenin sonunda ABTS stop solusyonu ilave edilip 405 nm' de ABTS ve ABTS stop solusyonuna karşı okundu.

2. 3. İstatistiksel Analizler

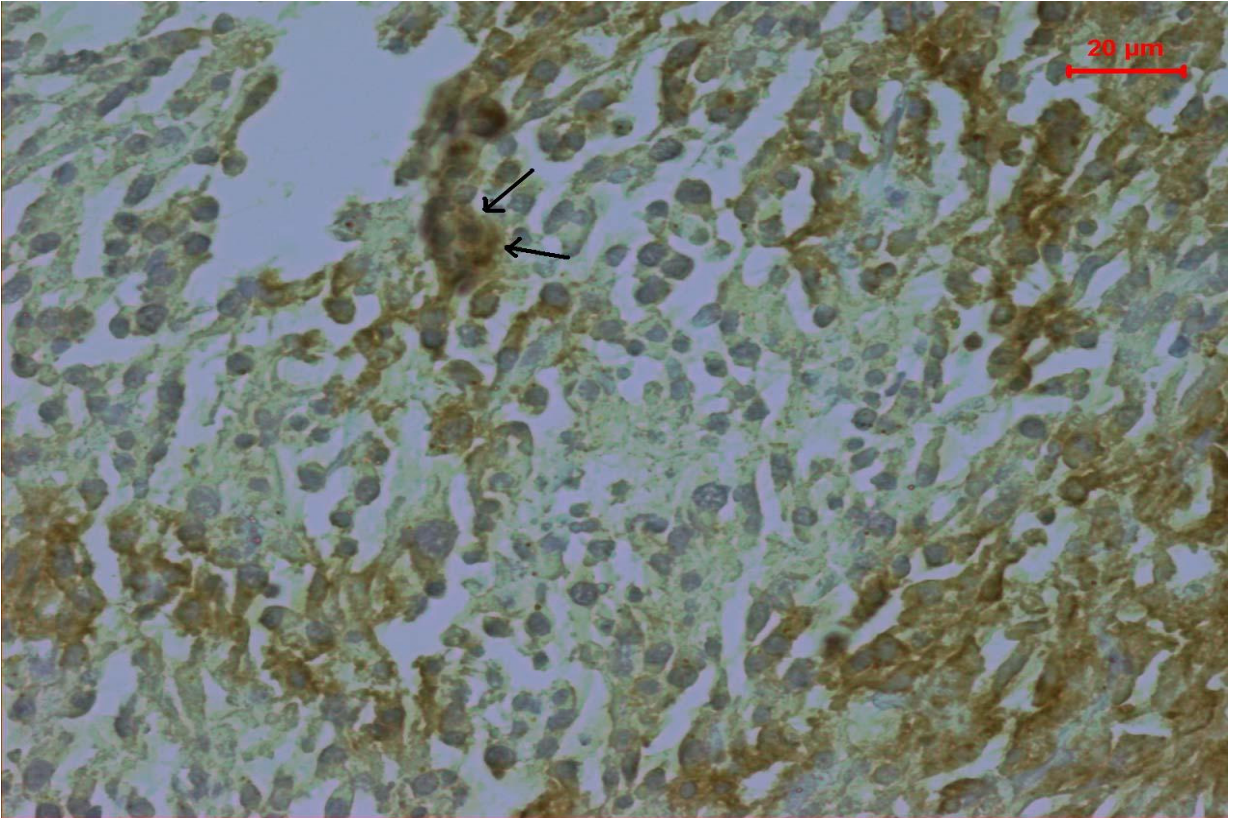
Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows Release 11.5 Standart Versiyon Copyright © Spss Inc. 1989-2001) hazır paket programı kullanıldı. Bağımsız örnekleme testi ile (Independent Samples Test) istatistiksel açıdan farklarının anlamlı olup olmadığı ve önemlilik düzeyleri saptandı.

3. BULGULAR

3. 1. İmmunohistokimyasal Bulgular

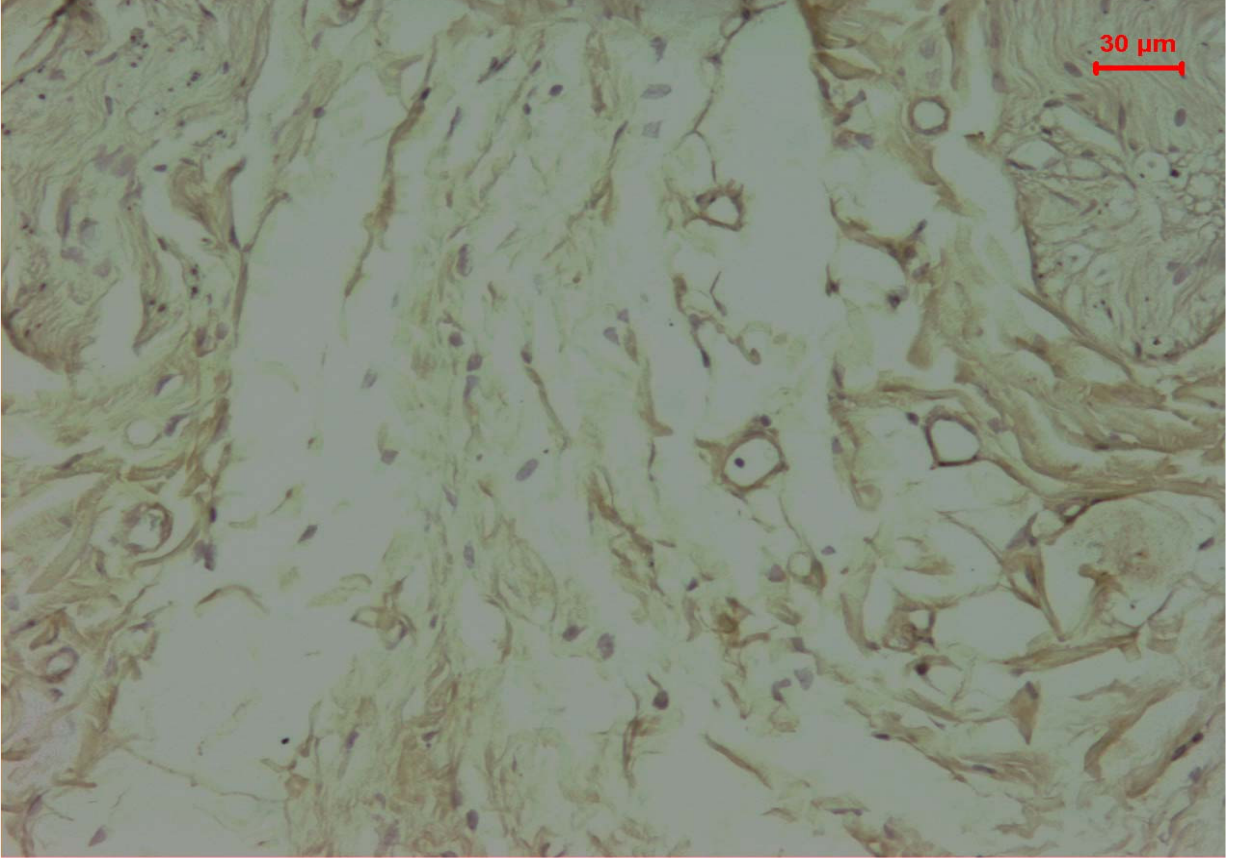
Deneme ve kontrol grubundaki hayvanların dokularından bcl-2 ve bax için immunohistokimyasal boyamalar yapıldı, hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu (Leica DMLB) ve buna bağlı görüntü analiz sistemi yardımı ile incelendi. İncelenen kesitlerin gerekli görülen kısımlarının fotoğrafları çekildi.

Bcl-2 pozitif olan hücreler deneme grubunda (fibrosarkoma dokusunda) yoğun bir şekilde kahverengi olarak gözlendi. Bcl-2 antiapoptotik etkili bir gen olup apoptotik uyarı alan hücrelerde, hücrenin bir süre daha apoptozis ile ölmesini engellemektedir (Resim 8).



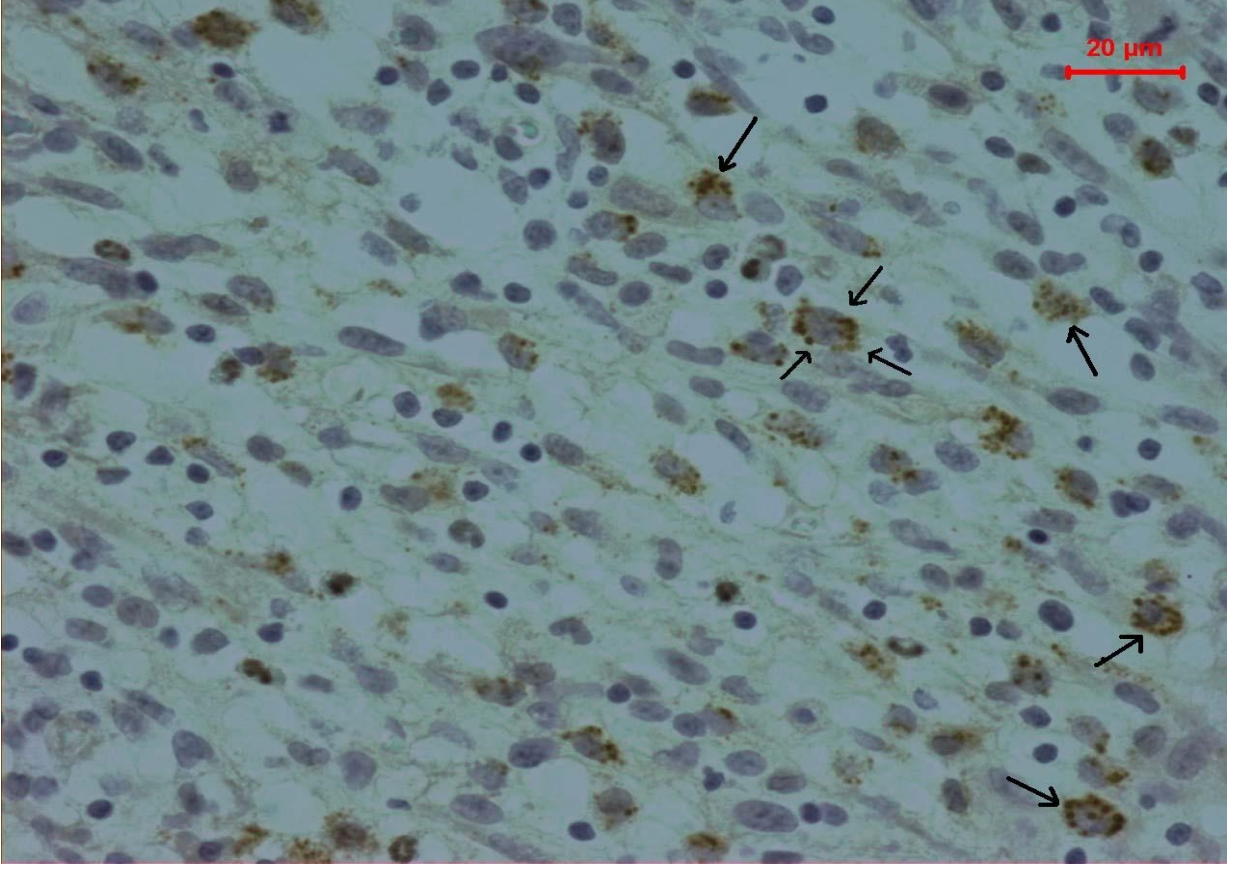
Resim 8. Deneme grubunda Bcl-2 için immunohistokimyasal boyama, bcl-2 pozitif hücreler (ok ile işaretli).

Kontrol grubunda ise normal deri altı bağ dokusu incelendi, bcl-2 negatif hücreler (fibroblast ve fibrositler) gözlemlendi (Resim 9).



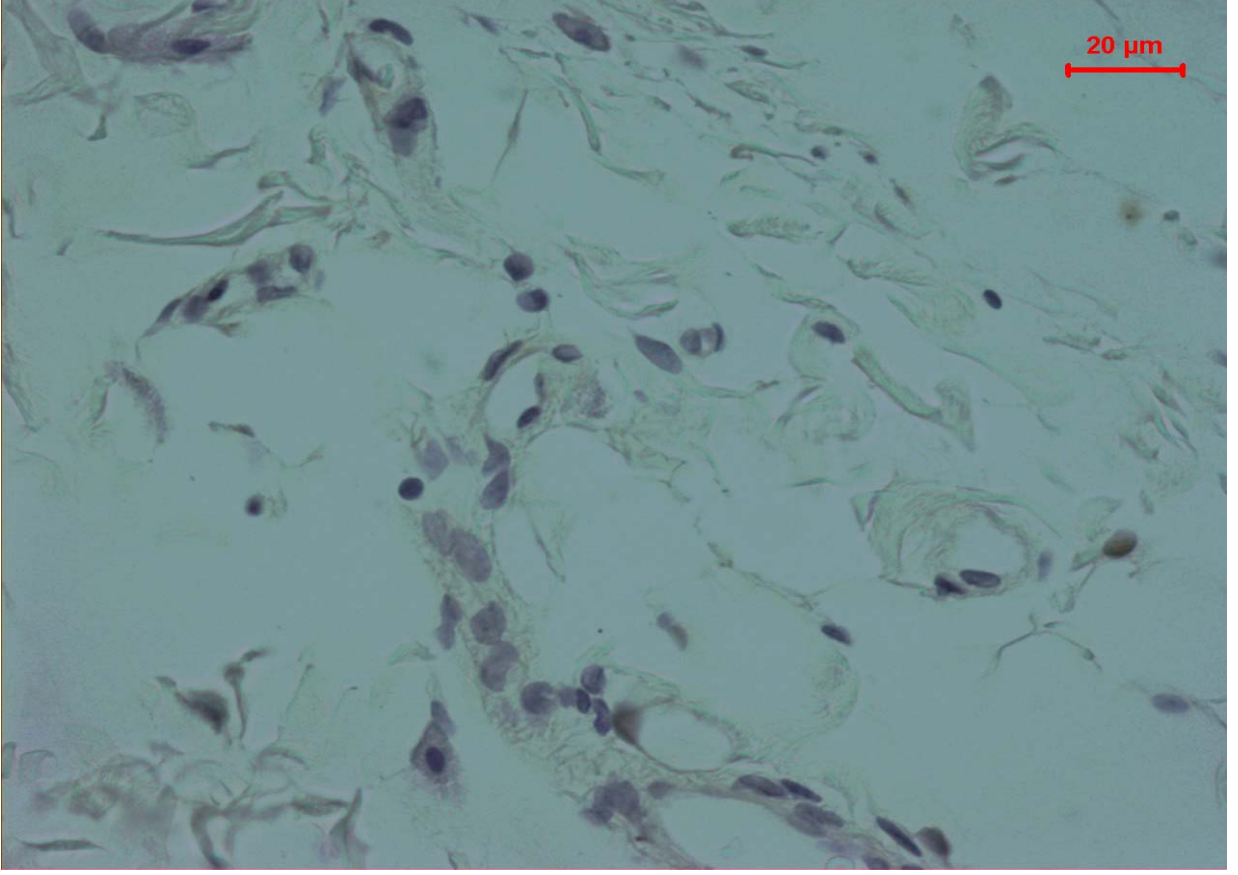
Resim 9. Kontrol grubunda Bcl-2 için immunohistokimyasal boyama.

Bax pozitif olan hücreler deneme grubunda (fibrosarkoma dokusunda) kahverengi olarak gözlemlendi. Bax proapoptotik etkili bir gen olup apoptotik uyarıyı alan hücrenin apoptozis ile ölmesini sağlamaktadır (Resim 10).



Resim 10. Deneme grubunda Bax için immunohistokimyasal boyama, bax pozitif hücreler (ok ile işaretli).

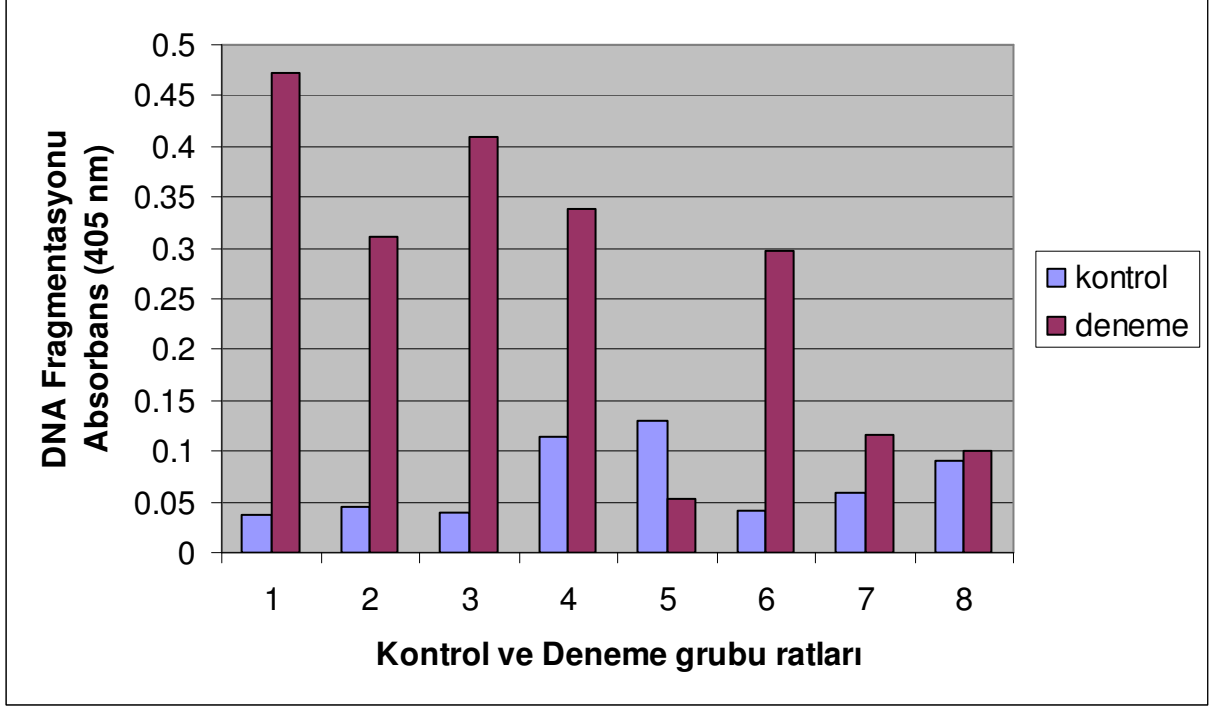
Kontrol grubunda ise normal deri altı bağ dokusu incelendi, bax negatif hücreler (fibroblast ve fibrositler) gözlemlendi (Resim 11).



Resim 11. Kontrol grubunda Bax için immunohistokimyasal boyama.

3. 2. ELISA ve İstatistik Bulguları

Deneme ve kontrol grubundaki hayvanların dokularından yapılan homojenizasyon işleminden sonra Roche firmasının Cell Death Detection ELISA plus hazır ölçüm kiti kullanılarak analizleri yapıldı. Deneme grubundaki ratlarda ortalama 0,262 U (=absorbans), kontrol grubundaki ratlarda ise 0,069 U olarak tespit edilmiş olup deneme grubundaki apoptotik DNA fragmentasyonu düzeyi kontrol grubuna göre 3,8 kat arttığı belirlendi.



Şekil 10. Deneme ve kontrol grubu ELISA sonuçları.

Şekil 10' da görüldüğü üzere deneme grubundaki ratlarda kontrol grubuna göre apoptotik DNA fragmentasyonu artmıştır ama 5 numaralı ratta kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiştir. Bu da tümörün başlangıç aşamasında apoptozisin azaldığı, tümörün proliferasyonu ile birlikte apoptozisin arttığı şeklinde yorumlanabilir.

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi bağımsız örnekleme testi ile (Independent Samples Test) yapıldı ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneme grubunda istatistiksel düzeyde önemli artış gözlemlendi ($P < 0,001$) (Tablo 5).

Gruplar			
	Kontrol (n=8)	Deneme (n=8)	P
Apoptotik DNA fragmentasyonu	0,069 U (=absorbans)	0,262 U (=absorbans)	***

*** : $P < 0,001$

Tablo 5. Deneme ve kontrol grubu ortalama Apoptotik DNA fragmentasyonu sonuçları (ELISA).

4. TARTIŞMA

Canlıların yaşam döngüsünün temel unsurları doğum, büyüme, üreme, yaşlanma, ve ölümdür. Yaşamın sürdürülmesi organizmada yapı ve fonksiyonun fizyolojik gereksinimlerinin belirlediği sınırlar içinde korunmasına bağlıdır. Bunun için hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunması gerekir. Bu denge kaybolduğunda, yani çoğalandan çok hücre öldüğü ya da farklılaşandan daha fazla hücre çoğalması durumunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülür (Öniz 2003).

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Embriyo döneminden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma ve programlı hücre ölümü vardır. Bazı hücreler yıllarca yaşarken bir kısmı sadece birkaç saat yaşarlar (Öktem ve ark 2001).

Yapılan bu çalışmada, 3-metilkolantren kullanılarak deneysel olarak, mezenkimal dokudan köken alan bağ dokunun kötü huylu bir tümörü olan fibrosarkoma oluşturulmuştur. Oluşan bu tümör dokusundaki apoptozis iki şekilde gösterilmiştir:

1- Bcl-2 ve Bax antikoları kullanılarak immunohistokimyasal olarak,

2- Nükleustaki DNA fragmentasyonları, ELISA cihazında DNA-histon kompleksinin belirlenmesi prensibine dayanan kolorimetrik metotla gösterilmiştir.

Apoptozisin tümörlerde sık görülen bir olay olduğu tespit edilmiştir (Wyllie 1992). Yapılan bir çalışmada non-Hodgkin lenfomaların kemik iliğine yerleştiği belirlenen 30 hastanın kemik iliği dokusu Fas/Apo-1, CD95 ve bcl-2 reseptörleri açısından immunohistokimyasal olarak araştırılmıştır. Çalışmada, 23 olguda Fas/CD95, 7 olguda ise Bcl-2 reseptörleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak non-Hodgkin lenfomada apoptozisin sık görüldüğü kanısına varılmıştır (Rashed ve Ragab 2004).

Wyllie (1980)'nin yapmış olduğu bir çalışmada, glukokortikoid uygulaması yapılmış ve olgunlaşmamış timus hücrelerinde deneysel olarak apoptozis gerçekleştirilmiş, apoptotik hücre DNA'sının elektroforetik jel ayrımı yapılarak, hücrede DNA bütünlüğünün kalmadığı, apoptotik hücre için karakteristik olan merdiven tarzında DNA bantlarının oluştuğu tespit edilmiştir.

Oksidatif stresin apoptozisin indüklenmesinde major bir komponent olup olmadığını belirlemek amacıyla diabetik rat böbreğinden alınan dokularda apoptozisin varlığı araştırılmış ve apoptotik hücrelerde DNA kırılmaları ELISA yöntemiyle tespit edilmiştir. Normal rat böbreği ile karşılaştırıldığında diabetik rat böbreğinde yaklaşık 4 kat düzeyde apoptotik DNA fragmentasyonunun arttığı belirlenmiştir. Bunun sonucunda oksidatif stresin diabetik böbreklerde apoptozise neden olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark 1997).

Cohen (1993) yüksek dozda kullanılan steroidlerin, timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozise gitmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ileri srlmştir.

Araştırmalarda kaspaz aktivasyonu ile gerçekleşen apoptozisin sellüler homeostazisin sürdürülmesi için substrat proteinlerinin proteolitik ayrılması yoluyla hücre ölümü şeklinde sonuçlandığını göstermiştir. Buna ilaveten farklı anti ve proapoptotik üyelerden oluşan Bcl-2 protein ailesinin apoptozisin aşamasının belirlenmesinde önemli olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada bir başka Caenorhabditis elegans geni olan Ced-4' n hem Bcl-2 ailesi üyelerini hem de kaspazlarını bağladığı ve böylece hücre ölümü mekanizmasının esansiyel kompetleri ile bağlantı kurduğu gösterilmiştir (Kaipia ve ark 1997).

Son yıllarda hem genel hem de lokal iskemik beyin hücresi kayıplarının programlı hücre ölümü ile olduğu yani apoptozisle sonuçlandığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda travmatik yaralanmadan ve nörodejeneratif hastalıklardan sonra beyin hücrelerinde apoptozisin oluşabileceği ileri srlmştir. Dişi ratlarda spinal kordda oluşturulan yaralanmadan 24 saat sonra alınan dokular homojenize edilip süpernatantlarında ELISA DNA fragmentasyon kiti ile apoptozis ölçülmüş ve kontrol grubuna göre 2 kat düzeyde arttığı tespit edilmiştir (Liu ve ark 1997).

Apoptotik hücrelerin, gelişme, homeostazis ve patolojik olaylar esnasında fagositoz ile uzaklaştırıldığını belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, tümör nekrozis faktör tarafından indüklenen nekrozis veya Fas aracılı apoptozis tarafından ölmeye indüklenen fibrosarkoma hücrelerinde makrofajlar tarafından yapılan fagositozis incelenmiş, apoptotik ve nekrotik hücrelerin makrofajlar tarafından fagosite edildiği, her iki durumda da fagositozisin fosfotidilserin bağımlı mekanizma tarafından oluştuğu, halbuki normal hücrelerde bu olayın olmadığı, ama apoptotik hücrelerin fagositozunun hem kantitatif hem de kinetik olarak nekrotik hücrelerin fagositozundan daha etkili olduğu ve makrofajlar tarafından fosfotidilserin bağımlı mekanizma tarafından yapılan fagositozun inflamatorik sitokin üretimine neden olmadığı gösterilmiştir (Brouckaert ve ark 2004).

Parafin içerisine gömülen dokularda apoptozisi tespit etmek için yeni bir yöntemin kullanıldığı bir çalışmada; rat veya insandan elde edilen prostat, kastrasyon sonrası uterus, tümör, lenf nodülleri ve embriyo kullanılmış ve ISEL (İn situ end labeling) yöntemiyle tespit etmek için formalinde tespit edilmiş ve proteaz ile muamelesinden sonra avidin-biotin peroksidaz kaplı DAB ile boyanarak DNA fragmentasyonu belirlenmiş, hücreler, kromatin yoğunlaşması, etrafında açık pir parlamanın oluşması ve büzülmesi, apoptotik cisimciklerin oluşması gibi apoptozisin karakteristik morfolojik özellikleri ile tespit edilmiştir. Bunun sonucunda apoptozisin morfolojik özelliklerinin belirlenmesinde bu tekniğin kullanışlı olduğu belirlenmiştir (Wijsman ve ark 1993).

Pankreatik karsinomada yapılan bir çalışmada Fas ekspresyonunun arttığı, ayrıca tümör hücrelerinin Fas reseptörlerinin düşük uyarılmasını sağlayarak apoptozisten kurtulduğu, Bcl-2 salınımının normal olduğu veya bazen düşük olduğu, pankreatik karsinoma hücrelerinde Bcl-xl'nin, Fas ve TRAIL aracılı apoptozisi engellemek için önemli bir role sahip olduğu, üstelik Bcl-xl'nin Apaf-1'i bağladığı ve böylece Apaf-1'in prokaspaz 9 ile olan bağlantısını engellediği ve buna bağlı olarak kaspaz 9'un aktivasyonuna engel olduğu, Bax'ın ise aşırı salınımının olduğu ve buna bağlı olarak da tümör regresyonunun gerçekleştiği tespit edilmiştir (Hinz ve ark 2000).

Soini ve ark (1998) B hücreli lenfomada ve akciğer karsinomunda tümör dokusunda proliferasyonun artmasına bağlı olarak apoptoziste de artış olduğunu bildirmiş olup apoptozisi uyaran bir gen olan p53'ün mutasyon veya kaybının akciğer karsinomunda %80 oranında

olduğunu, bunun yanında İlk kez B hücreli lenfomada belirlenen Bcl-2 proteinin, akciğer karsinomasında %8 - %90 gibi değişik oranlarda olduğunu tespit etmişlerdir.

Histolojik olarak tümör dokusunda apoptotik indeksle (apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı) apoptozisin şiddetininin yada oranınının belirlenebileceği ve bu indeksin tümörün tipini ve evresini belirlemede, tedaviye vereceği yanıtı önceden tahmin etmede ve prognozu saptamada yardımcı olabileceği ileri sürülmüştür. Akciğer karsinomasında tümörün evresi ve beklenen yaşam süresiyle apoptozis arasında ilişki olup olmadığına bakmışlar ve 75 ile 256 olguluk iki grupta apoptotik indeksteki artışın yaşam süresini kısaltırken; 427 olguluk bir grupta ise indeksin, tek başına prognozu belirlemediğini saptamışlardır (Tormanen ve ark 1995).

Yeni tanı konmuş ve daha önce hiç tedavi görmemiş 22 alerjik astımlı hastaların bronşioalveoler lavajlarından elde edilen T lenfositlerinin, Fas proteinleri, Fas protein mRNA ve anti-IgM Fas proteinlerine in vitro maruz bırakıldıktan sonra DNA fragmentasyonları propidium iodide yöntemiyle belirlenmiş ve CD3+ T lenfositleri ve Fas reseptörünün ekspresyonunda azalma, astımlı hastalarda anlamlı düzeyde bulunmuştur (Spinozzi ve ark 1998).

Hepatit C virüsünün “core” isimli proteinin insan embriyonik böbrek hücre dizelerinde FADD ilişkili apoptozisi arttırdığı rapor edilmiştir. Apoptozisin indüksiyonunun sitotoksik T lenfositlerden salgılanan granzimlerin etkisiyle olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sitotoksik T lenfositleri FasL salgılayarak da enfekte hücrelerde apoptozisi indükleyebileceği ancak bu mekanizmayla sağlıklı komşu hücrelerde de apoptozisin indüklenme riskinin olduğu ileri sürülmüştür. Hepatit virüslerinin göreceli olarak daha az sayıda hücre enfekte etmelerine rağmen daha çok sayıda hücre hasarına neden olmalarının bu şekilde açıklanabileceği rapor edilmiştir (Ulukaya 2003).

Johnson (2000)'nun yaptığı bir çalışmada, TRAIL'in TNF ligand ailesinin bir üyesi olup hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri DR4 ve DR5'e bağlandığı ve bu reseptörlere bağlanmanın apoptozisi başlattığı gösterilmiştir. Hemapoyetik ve solid tümörlerin TRAIL tarafından başlatılan apoptozise hayli duyarlı olduğu bildirilmiştir. TNF'nin tersine yüksek

doz TRAIL'in maymunlar tarafından tolere edilebildiği ve sitotoksik etkisinin olmadığı da gösterilmiştir.

Değişik akciğer hasarlarında da apoptozisin varlığı gösterilmiştir. Sarkoidoz, tüberküloz gibi granümatöz hastalıklarda, granülom yapısında inflamatuvar hücrelerin apoptozisle ortadan kaldırıldığı, akut akciğer zedelenmesinde TNF ve diğer sitokinlerin apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir (Cree ve ark 1987).

Zhang ve Xu (2004) antitümör etkisinin belirlenmesi amacıyla hücre kültürüne çeşitli konsantrasyonlarda Oridonin uygulamış ve 12 saat sonra hücre kültüründeki hücrelerin apoptozise maruz kaldığını, apoptotik hücrelerde apoptozisin en önemli belirtisi olan DNA kırılmalarının tespit edilemediğini fakat Bax/Bcl-2 protein ekspresyonunun oranının arttığını tespit etmişlerdir.

Bcl-2 ve p53 protein ekspresyonu arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada p53 mutasyonu ve apoptozis normal insan ovaryumlarında ve farklı tip ovaryum epiteliyal kanserlerinde hem immunohistokimyasal olarak hem TUNEL yöntemi ile hem de PCR yöntemi ile incelenmiştir. Bcl-2 ekspresyonunun normal ovaryumlar ve iyi huylu ovaryum tümörlerinde çok fazla, kötü huylu tümörlerde ise çok düşük düzeyde; bunun aksine p53 ekspresyonunun kötü huylu tümörlerde %54 düzeyinde, iyi huylu ovaryum tümörleri ile normal ovaryumlarda ise gözlenmediği bildirilmiştir. Kötü huylu ovaryum tümörlerinde Bcl-2 ve p53 gen ekspresyonu arasında önemli bir negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Apoptotik aktivitenin, normal ovaryum yüzeysel epitellerinde ve iyi huylu ovaryum tümörlerinde düşük olduğu fakat kötü huylu ovaryum tümörlerinde arttığı görülmüştür. İstatistiksel olarak apoptozis ve p53 ekspresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu ama benzer korelasyonun apoptozis ve Bcl-2 ekspresyonu arasında bulunmadığı saptanmıştır (Chan ve ark 2000).

Apoptozisi TUNEL yöntemiyle belirlemek amacıyla hızlı ve kısa sürede yenilenen ince bağırsak epiteli kullanılmış ve morfolojik olarak villuslarda apoptotik hücreler görünmezken, hücre çekirdeklerindeki yıkımlanma belirlenmiştir. DNA fragmentasyonunun çekirdeklerde periferden başlayıp merkeze doğru ilerlediği, hücrede daha morfolojik belirtiler gözükmeden DNA fragmentasyonun var olduğu tespit edilmiştir (Gavrieli ve ark 1992).

Normal epidermal keratinositlerde sıcaklığa maruz bırakılması sonrası apoptozis ve kazara ölen hücreler incelenmiş; yaşayan/ölu hücre oranı TUNEL metodu ve ultrastruktural morfolojik yöntemle analiz edilmiştir. Bunun sonucunda 58-59°C sıcaklığa maruz bırakıldıktan sonra hücrelerin çoğunlukla apoptozisle öldüğü, yaşayan hücrelerin ise TUNEL pozitif olup DNA degridasyonuna işaret ettiği, 60-66 °C sıcaklığa maruz bırakıldıktan sonra ise hem TUNEL pozitif yaşayan hücreler hem de TUNEL pozitif ölu hücrelerin gözleendiği bu durumun apoptozis ve aynı zamanda kaza eseri ölen hücrelere işaret ettiği, hücrelerin tamamının ise 72°C'nin üzerinde sıcaklığa maruz kaldığında öldüğü tespit edilmiştir. DNA kırılmaları ELISA kiti ile analiz edilmiş ve kontrol grubunda sıfıra yakın iken 56°C' ye maruz kalanlarda 0,5 düzeyinde, 57°C' de 0,7; 58 °C' de 3; 59 °C' de 2; 60 °C' de 0,7; 62 °C' de 0,25 U (=absorbans) düzeyinde olduğu belirlenmiştir. Burada sıcaklık derecesi ve maruz kalma süresine bağı olarak hücrelerin ya apoptozis ya kazara ya da tamamen öldükleri bildirilmiştir (Matylevitch ve ark 1998).

Neuroblastoma ve lenfoma hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada, hücre zarını kolayca geçen lipofilik özellikte bir molekül olan, depolarize nöron, endotelial hücre ve makrofajlardan salgılanan, araşidonik asit metabolizmasının ürünü olan Anandamid'in apoptozisi indüklediği ve DNA fragmentasyonuna neden olduğu saptanmıştır (Maccarrone ve ark 2000).

Apoptozisin germ hücre gelişiminde, normal sperm hücresi üretiminde defektif hücrelerin uzaklaştırılmasında, vücut savunma sisteminin bir parçası olarak görev yaptığı, fizyolojik koşullarda kontrollü bir şekilde gerçekleşirken testisi etkileyen farklı hastalıklarda apoptozisin arttığı bildirilmiştir. Hormonal yetersizlik, kriptorşidizm, testise olan kan akımında artma, testiste lokal ısı artışı, venöz stazis ve buna bağı hipoksi, testiküler hipotermi olgularının tümünde testiste artmış oranda apoptozis tespit edilmiştir (Yılmaz 2005, Fujisawa ve ark 1999).

Varikosel nedeni ile incelenen hastaların testislerinde oluşan hasarda apoptozisin rolününün incelendiği bir çalışmada, testisin histopatolojik incelenmesinde olguların üçte birinde testiküler dokuda programlı hücre ölümünde anlamlı oranda artış saptanmıştır (Ku ve ark 2005). Ikeda ve ark (1999) deneysel olarak varikosel oluşturulan erişkin ratlarda testis kan akımındaki artışa paralel olarak testiküler apoptoziste artma bildirilmiştir. Araştırmacılar, 32,5

°C' de inkube ettikleri testiküler kültür hücrelerde minimal DNA fragmentasyonu ve apoptozis tespit ederken, ısıyı 43 °C' ye yükselttiklerinde apoptoziste hızlı bir artış gözlemlemişlerdir.

Yapılan bir çalışmada oksidatif stres sonrası şekillenen hücre ölümlerinin apoptozis veya nekrozis yoluyla olduğu, apoptozisle şekillenen hücre ölümüne DNA fragmentasyonunun önderlik ettiği ve oksidatif stres sonrası apoptotik hücrelerde 200-800 kbp yüksek moleküler ağırlıklı internükleozomal DNA fragmentasyonunun şekillendiği bildirilmiştir (Higuchi 2003).

H2A histon ailesinin çok bilinen bir üyesi olan H2AX'in, hücre kültürüne ilave edildiği bir çalışmada, H2AX ilavesinden sonra DNA fragmentasyonunu başlattığı ve DNA fragmentasyonunun 8. saatte en üst noktaya ulaştığı tespit edilmiştir (Rogakou ve ark 2000).

Kolorektal karsinomada, apoptozis inhibitör protein (AIP) ailesinin bir üyesi olan Survivin'in, immunohistokimyasal yöntemle teşhisi için 49 hastadan kolorektal tümör dokusu alınmış ve yapılan incelemesinde, 30 tümörde Survivin, 30'unda p53 ve 21'inde Bcl-2'nin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Survivin'in ekspresyonunun p53 veya Bcl-2 ekspresyonuna bağlı olduğu ayrıca tümörün histopatolojik karakteri ile alakalı olduğu tespit edilmiştir (Sarela ve ark 2001).

Yapılan bir araştırmada çinkonun antioksidan bir etki gösterdiği ve apoptozisi engellediği, apoptoziste DNA fragmentasyonuna engel olduğu keratinosit hücrelerinde gösterilmiştir. Çalışmada ultra viyole ışınla keratinositlerde apoptozis oluşturulduktan sonra çinko uygulanmış ve 36 saat sonra hücrelerde ELISA yöntemi ile DNA fragmentasyonu analiz edilmiştir. Çinko uygulanmayan grupta DNA fragmentasyonu çinko uygulanan grubuna göre 4 kat yüksek bulunmuştur (Parat ve ark 1997).

Apoptozisi belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, DNA fragmentasyonu PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile değişik dokularda belirlenmiştir. Ultra viyole ışın ve deksamatozon kullanılarak apoptozis indüklenmiş, timus ve beyinde apoptotik hücrelerdeki DNA kırılmaları PCR yöntemi ile tespit edilmiş ve bunun sonucunda dokularda aşırı hücre ölümünün olmasına rağmen bu yöntem ile sadece nükleozomal merdiven görüntüsünün elde edilebileceği kanısına varılmıştır (Staley ve ark 1997).

Endometritis ve adenomyozis teşhisi konulmuş kadınlarda cerrahi yöntemle endometritisli ve adenomyozisli bölgelerden doku örnekleri alınmış, alınan numuneler Bcl-2 ve Bax ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla formalinde tespit edilip parafin bloklar içerisine gömülmüş ve kesitler alınarak immunohistokimyasal analiz için boyama yapıp elektron mikroskopunda incelenmiştir. Araştırma sonucunda endometritis ve adenomyozisli dokularda Bcl-2 ve Bax ekspresyonunun arttığı ancak dokular arasında fark olmadığı fakat adenomyozisli kadınlarda siklusun sekretorik ve proliferatif fazı arasında farkın önemli olduğu tespit edilmiştir (Goumenou ve ark 2001).

Yapılan bir çalışmada gözde retinal yaralanma sonrası şekillenen iskemiden sonra Bcl-2 gen ailesi ile apoptozis arasındaki ilişki incelenmiştir. TUNEL yöntemi ile yapılan çalışmada, normal retinada az miktarda pozitif hücrelerin görüldüğü, iskemiden 6-48 saat sonra pozitif hücrelerin miktarının çok sayıda arttığı, 24. saatte maksimum noktaya ulaştığı tespit edilmiştir. Bax gen ekspresyonunun iskemiden hemen sonra değişmediği 6. saatte düşük düzeyde artmaya başladığı, 24. saatte pik noktaya ulaştığı tespit edilmiştir. Bcl-2 gen ekspresyonunda ise iskemiden hemen sonra herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Araştırma sonucunda iskemik yaralanmadan sonra retinal hücre kaybında Bax ekspresyonu ile apoptozisin ilişkili olduğu iddia edilmiştir (Kaneda ve ark 1999).

Ratlarda oluşturulan deneysel glomerulonefritis modelinde apoptozisin sklerozis ile ilişkili olduğu, TUNEL pozitif hücrelerin başlıca sklerotik lezyonlarda gözlendiği, diyabetik glomerulosklerozda bu sürecin gelişimine neden olarak antiapoptotik Bcl-2 proteininin düşük düzeyde uyarılması ve nitrik oksit sentetaz aktivitesinin artarak nitrik oksit düzeylerinin apoptozisi uyardığı şeklinde bildirilmiştir (Güçer ve Tınaztepe 2001).

İnsanlarda kolorektal kanserde apoptotik hücrelerin belirlenmesi ile ilgili bir çalışmada, hem TUNEL yöntemi ile hem de immunohistokimyasal yöntem kullanılmış, TUNEL yönteminin immunohistokimyasal yöntemden daha hassas olduğu tespit edilmiştir. Bu iki yöntemin ilerlemiş kanserde yeni oluşan kansere göre daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Kolorektal karsinomada apoptotik tümör hücrelerinin tespit edilmesinde immunohistokimyasal yöntemin kullanışlı olduğu belirlenmiş ve buna ilaveten proliferasyon aktivitesindeki artışa bağlı olarak tümör hücrelerinin apoptozisinde de artış tespit edilmiştir (Watanabe ve ark 1999).

Yapılan bir çalışmada Helikobakter pilori ile apoptozisin ilişkisi incelenmiş ve ülserli hastalarda sağlıklı insanlara göre apoptotik indeksin arttığı, Helikobakter pilorinin apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir. Helikobakter pilorinin gastrik epitele yapışınca epitel hücrelerinde IL-8 salınımını uyardığı, ortama lenfosit ve monositleri çektiği, mukozal inflamasyon, proinflamatuvar sitokinler ve serbest radikaller aracılığıyla apoptozisi uyardığı tespit edilmiştir (Topal ve ark 2004).

Kanser terapisinde kullanılan bir ajan olan taxol ve yüksek toksik bitki lektini olan ricin ile apoptozisin indüklendiği bir çalışmada, morfolojik değişiklikler elektron mikroskop altında incelenmiş ve plazma membranı şişmesi, nükleusun yoğunlaşması, apoptotik cisimciklerin oluşması ve elektroforez ile de DNA fragmentasyonu belirlenmiştir (Collins ve ark 1997).

Polikistik ovaryum sendromu olan 8 kadın ve yaşları aynı olan 12 fertil sağlıklı kadından alınan endometriyum dokusunda immunohistokimyasal olarak Bcl-2, Bax için boyamalar yapılmış ve polikistik ovaryum sendromu olan kadınlarda normal sağlıklı kadınlara göre Bax pozitif hücrelerin yüksek olduğu, Bcl-2 pozitif hücrelerin, kaspaz 3 ve DNA fragmentasyonu düzeyinin ise her iki grupta da aynı olduğu TUNEL yöntemi ile tespit edilmiştir (Maliqueo ve ark 2003).

8-10 haftalık yaşta 200-250 gram ağırlıkta olan farelerde yapılan bir çalışmada 40 mg/kg dozunda Sanazole [(N-2-methoxy ethyl)-2-(3-nitro-1 triazolyl) 1) asetamid] ile oluşturulan fibrosarkomada apoptotik DNA fragmentasyonu analiz edilmiş, Giemza ve May Grunwald boyamalar ile apoptotik hücreler belirlenmiştir. Deney grubunda apoptotik hücrelerin %21 düzeyinde olduğu tespit edilmiştir. Tümör geliştikten sonra radyasyon uygulaması sonucu tümörün gerilediği ve apoptotik hücrelerin düzeyinin ise %47' ye çıktığı tespit edilmiştir. Başlangıçta ise tümör dokusunun proliferasyonuyla yani ilerlemesiyle paralel olarak apoptozisin de arttığı belirlenmiştir (Rajagopalan ve ark 2003).

Lehnhardt ve ark (2005)'nin fibrosarkoma hücre kültüründe yaptıkları bir çalışmada, hücre kültürünün kemoterapötik ajanlar olan doxorubicin, aktinomisin D veya vinkristin ile muamele edilmesinden sonra sitokrom c ve Apaf-1 düzeyinin arttığını, Bcl-2 ekspresyonunun ise azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar sitokrom c ve Apaf-1 düzeyinin artması ile

apoptozom oluşumunun sağlandığını ayrıca Bcl-2 düzeyinin azalması ile antiapoptotik etkinin ortadan kalktığını ve hücrenin apoptozise gittiğini belirlemişlerdir.

Yapılan bir çalışmada etanola maruz bırakılan fötusun beyinde mitokondri aracılı (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi) apoptotik ölümün ve oksidatif stresin şekillendiği belirlenmiştir. Ethanaol muamelesinden sonra reaktif oksijenlerin düzeyi 1. saatte %58, 2. saatte %82 arttığı, Annexin V pozitif hücrelerin ise 2., 6., 12. ve 24. saatlerde sırasıyla %43, %89, %123 ve %238 düzeyinde olduğu DNA fragmentasyonunun 12. saatte %50 24. saatte ise %65 düzeyinde arttığı ELISA kiti ile tespit edilmiştir (Ramachandran ve ark 2003).

İnsan promiyeloid lökemi hücrelerinde indüklenen hücre ölümünde nekrotik ve apoptotik prosesin morfolojik ve biyokimyasal kriterlerini belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada, apoptozis “cell death detection ELISA plus” kiti ile analiz edilmiş ve apoptozise giden ve DNA fragmentasyonu oluşan hücreler ile apoptozise gitmeyen hücreler arasında 2,2 kat fark bulunduğu tespit edilmiştir (Pintero ve ark 1997).

He ve ark (2005) fare odontoblast hücrelerinde apoptozisi DNA fragmentasyonuna bakarak tayin etmişlerdir. Apoptozis üzerine TGF (Transforming Growth Factor)' nin etkisini belirlemek için, Annexin V/propidium iodide boyaması ve “cell death detection ELISA plus” kiti kullanılmıştır. Sonuç olarak TGF' nin apoptozisi indüklediğini, bu indüklemenin de doza bağlı olduğunu, DNA fragmentasyonunun da bununla paralel olduğunu ve kontrol grubuna göre 5 kat düzeyde arttığını belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada ise, farelerde kalpte deneysel olarak oluşturulan iskemi ve reperfüzyonun, kalp A1 adenozin reseptörler aracılığıyla apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir. DNA fragmentasyonu analizi ELISA kiti kullanılarak yapılmış ve deneme grubunda 4,9 kat yükseldiği tespit edilmiştir (Regan ve ark 2003).

Flavivürüs gen ailesinden olan Nörovirulent Dengue Virus ile deneysel olarak enfekte edilen fare beyinde apoptozisin şekillendiği, enfekte hücrelerin apoptotik ölümle uzaklaştırıldığı enfeksiyonun 9. günlerinde fare beyin dokusunda DNA fragmentasyonuna bakılarak belirlenmiş ve normal sağlıklı fare beyin dokusuna göre yaklaşık 2 kat düzeyde arttığı rapor edilmiştir (Despres ve ark 1998).

Yaptığımız çalışmada, Bcl-2 ve Bax için yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucunda deneme grubunda Bcl-2 ve Bax pozitif hücreler tespit edilirken kontrol grubunda her iki antikor için de negatif hücreler görülmüştür. Mevcut çalışmalara bu açıdan bakıldığında B hücreli lenfomada olduğu gibi bazı tümörlerde apoptozisin azaldığı (Soini ve ark 1998, Tormanen ve ark 1995, Sarela ve ark 2001), pankreatik karsinomada Bcl-2'nin normal Bax'ın ise fazla salındığı (Hinz ve ark 2000), iyi huylu ovaryum tümörlerinde Bcl-2 ekspresyonunun çok fazla, kötü huylu tümörlerde ise çok düşük düzeyde (Chan ve ark 2000) olduğu görülmektedir.

Yapılan araştırmada Bax ve Bcl-2 antikorlarının gösterilmesi dışında nükleustaki DNA fragmentasyonu tespit edilerek de apoptozisin varlığı gösterilmiştir. Kontrol grubunda apoptotik DNA fragmentasyonu 0,069 U tayin edilirken, deneme grubunda 0,262 U bulunmuştur. Kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat artış tespit edilmiştir.

İnce bağırsak epiteli kullanılarak apoptozis belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada DNA fragmentasyonunun hücrede daha morfolojik belirtilen gözükmeyen var olduğu tespit edilmiştir (Gavrieli ve ark 1992). Diabetik rat böbreğinden alınan dokularda apoptotik DNA fragmentasyonu 4 kat (Zhang ve ark 1997), spinal korda oluşturulan lokal yaralanmadan sonra 2 kat (Liu ve ark 1997), insan premiyolid lökemi hücrelerinde 2,2 kat, Nörovirulent Dengue Virus ile deneysel olarak enfekte edilen fare beyinde apoptozisin şekillendiği ve DNA fragmentasyon düzeyinin yaklaşık 2 kat (Despres ve ark 1998) arttığı bildirilmiştir. DNA fragmentasyonunda bulduğumuz artış oranı araştırmacıların bulguları ile uyumludur. DNA fragmentasyonundaki bu artış Bax proteinlerinin varlığı yani tümör dokusunda apoptozisin bulunduğunu ve bir artış söz konusu olduğunu desteklemektedir.

Bcl-2'nin antiapoptotik, Bax'ın proapoptotik bir protein olduğu bilinmesine ve kanserde apoptozisin azalmasının beklenmesine (Bilgici 2004) rağmen bizim araştırmamızda da olduğu gibi araştırma sonuçlarının her zaman beklentiler doğrultusunda olmadığı görülmektedir. Araştırmamızda hem Bcl-2 hem de Bax pozitif hücrelerin bulunması tümör hücresinde apoptozisin başladığını diğer taraftanda durdurulmaya çalışıldığını göstermektedir. Tümörlerde özellikle regresyona gittikleri dönemlerde apoptozisin görüldüğü bilinmektedir (Öztürk 2002). Her iki proteinin ekspresyon düzeyine bakılmadığından apoptozis indeksi hakkında bir fikir yürütülemez.

5. SONUÇ

Çalışmada deneysel oluşturulan fibrosarkomada apoptozis olduğu görülmüştür. Her ne kadar literatürlerde tümör dokusunda apoptozisin azaldığı bildirilse de proliferasyonun artmasına bağlı olarak apoptoziste de artış olabileceği düşünülmektedir. Yapılan benzer çalışmalarda gözlenen değişik sonuçların, tümör dokusunun farklı evrelerde olması ile ilgili olabileceği kanısına varılmıştır. İleriki çalışmalarda tümör dokusunun histopatolojik bulgularının apoptozis bulguları ile karşılaştırılmasının tümör dokusunun prognozu hakkında fikir verebilir. Apoptozisle ilişkili proteinlerin ekspresyonlarının ya da mutasyonlarının değerlendirilmesi tedaviye yanıtı ve/veya yaşam süresini tahmin ettirebilir. Kanser hücrelerinde apoptozisi arttırmak kanser tedavisindeki hedeflerden biridir.

ÖZET

Fibrosarkom mezenkimal dokudan köken alan bağ dokunun kötü huylu tümörü olup daha çok kedi ve köpeklerde görülmekle birlikte tüm hayvan türlerinde ortaya çıkabilir. Hızlı ve infiltratif büyüyen bir tümördür. Rodentlerde en yaygın görülen mezenkimal tümörlerdendir ve ratlarda spontan olarak şekillenme olasılığı % 1-3, farelerde görülme olasılığı ise % 1-6 düzeyindedir. Apoptozis ise; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Kanselerde erken teşhis yanında prognozun tayini, hastanın yaşamını uzatmada ve daha uygun tedavi şekillerinin tespit edilmesinde büyük önem taşımaktadır. Özellikle kedilerde aşı yerlerinde gelişen fibrosarkomlar önemli bir problem oluşturmakta ve bunun en başta gelen sebebi olarak ise aşı yerlerinde oluşan kronik yangılar ileri sürülmektedir. Son dönemlerde kanser üzerine yapılan çalışmalarda programlı hücre ölümünün önemli rol oynadığı bilinmektedir. Çalışmada ratlarda deneysel olarak 3-metilcholantren ile oluşturulan fibrosarkomlarda programlı hücre ölümü iki ayrı metotla gösterilmiştir. Böylece fibrosarkom ile programlı hücre ölümü arasındaki ilişki incelenmiştir. Aynı zamanda ELISA yöntemiyle DNA hasarı tespiti ve programlanmış hücre ölümünün immunohistokimyasal olarak saptanması karşılaştırılmıştır.

Araştırmanın materyalini 16 adet 8 haftalık ağırlıkları 150-200 gram olan erkek Sprague Dawley türü rat oluşturdu. Ratlar her grupta 8 adet olmak üzere iki gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol, ikinci grup deneme grubunu oluşturdu. Hayvanlara tüm deney boyunca kuru pelet yem ve içme suyu ad libitum olarak verildi. Deneme süresi 150-210 gün sürdü. Deneme süresinin başında deneme grubundaki ratların boyun bölgelerinin dorseline 0,25 ml susam yağında çözdürülen 0,2 mg 3-metilcholantren fibrosarkoma oluşturmak üzere deri altı yolla tek doz enjekte edildi. Kontrol grubuna ise tek doz 0,25 ml susam yağı deri altı yolla enjekte edildi. Deney süresi boyunca hayvanlar periyodik olarak kontrol edilip tümoral oluşum yönünden palpe edildi. Deney süresinin sonunda ratlara eter anestezisi altında ötenazi uygulanarak nekropsileri yapıldı. Oluşan tümör kitlelerinde DNA kırılmaları, ELISA

yöntemiyle Roche firmasının kitleriyle bakıldı. Alınan dokulardan Bcl-2 ve Bax için immunohistokimyasal boyama yapıldı.

Deneme ve kontrol grubundan alınan dokular homojenize edilip santrifüj işleminden sonra süpernatant ELISA' da kullanıldı. ELISA sonuçlarına göre deney grubunda DNA fragmentasyonu ortalama 0,262 U (=absorbans), kontrol grubundaki ratlarda ise 0,069 U olarak tespit edildi. Yani deney grubunda DNA fragmentasyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 4 katı artmış olarak tespit edildi.

Deneme ve kontrol grubundan alınan dokuların Bcl-2 ve Bax için immunohistokimyasal boyaması sonucunda, deney grubunda yoğun olarak bcl-2 ve bax pozitif hücreler tespit edilmiş olup tümörlerde apoptozis uyarısı alan hücrelerin bazılarının apoptozise bir süre daha gitmesi engellenirken bazılarının da artık apoptotik ölüme yönlendikleri tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular sonucunda, fibrosarkomalarda apoptozis sık görülen bir olay olup, DNA fragmentasyonu apoptozisin en önemli belirtisidir. Kanser tedavisi ile uğraşanların apoptozis, Bcl-2 ve Bax' ı göz önünde bulundurması gerektiği, literatür bilgileri doğrultusunda tümörün başlangıç evresinde apoptozisin azaldığı, tümörün prolifiye olmasıyla birlikte apoptozisin de arttığı kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler; Fibrosarkoma, apoptozis, Bcl-2, Bax, DNA fragmentasyonu, immunohistokimya, 3-metilkolantren, rat.

SUMMARY

Detection of Apoptosis in Experimentally Induced Fibrosarcomas Using DNA Fragmentation and Immunohistochemical Methods

Fibrosarcoma is driving from mesenchimal tissue. It is one of the malign tumors and usually seen in cats and dogs, however, it can be encountered in all animals. It is growing quite fast and invade in other tissue rapidly. It is one of mesenchimal tumor in rodents varying between 1-3 %, and in rat 1-6 %. Apoptosis used for eliminating of cells which are functioning not properly. Early diagnosis of tumors and follow up prognosis are of great importance for extension of life of cancer patients. Especially, fibrosarcomas in cats occur in vacation areas due to the chronic inflammation. Recent studies on tumors showed that there is a connection between cancers and apoptosis. In this study apoptosis in fibrosarcomas induced by 3-methylcholanthrene with two different methods. Thus relationship between apoptosis and fibrosarcomas is investigated. On the other hand programmed cell death investigated using immunohistochemical and ELISA methods and differences in results are compared.

Sixteen male Sprague Dawley rats used in this study. They were 8 weeks old and the body weights of the rats were between 150-200 grams. Rats were allocated into two groups each containing 8 rats. During the experiment which took between 150-210 days depending on the appearance of tumor tissue. They were allowed free access to water and feed. In order to induce fibrosarcoma in rats, at the beginning of the experiment animals were injected subcutaneously on the neck with 0,2 mg 3-methylcholanthrene solved in 0,25 ml sesame oil. To find out whether any tumoral tissue occurred animals were palpated daily. At the end of the experiment animals were killed under the ether anesthesia and necropsy is performed. DNA fragments of tumor tissue cell were analyzed using ELISA (Roche), localisation of Bcl-2 and Bax was determined by immunohistochemically method.

Tissues obtained from the control and the experimental animals homogenized, centrifugated and the supernatant was used for ELISA procedure. In experimental group

absorbance of the DNA fragmentation was 0,262 U but in control group it was 0,069 U. In other words absorbance of DNA fragmentation of experimental animals was 4 times higher than that of controls.

Immunohistochemically there was a lot of Bcl-2 and Bax positive cells. Contrary to this in control animals there was hardly Bcl-2 and bax positive cells. This data indicates that in the tumor tissue it is observed some cells programmed to death by apoptosis but the others not.

In the light of this findings we got in the present study apoptosis is encountered frequently in fibrosarcoma and fragmentation of the DNA indicates apoptosis. Researchers who are engage in curing of cancer patients should take into consideration of levels of Bcl-2 and Bax proteins. Furthermore, similar to the results of previous studies the rate of apoptosis seems to be very low at the beginning of the cancer however in the course of the time concomitantly the increase in proliferation of the tumor cells the rate of apoptosis increased dramatically.

Key words; Fibrosarcoma, apoptosis, Bcl-2, Bax, DNA fragmentation, immunohistochemistry, 3-methylcholanthrene, rat.

KAYNAKLAR

Almasan A, Ashkenazi A (2003) *Apo2L/TRAIL; Apoptosis signaling, biology and potential for cancer therapy*, Cytokine & Growth Factor, 14: 337–348.

Antar V (2005) *Bir genel kaspaz inhibitörü olan qvd-oph'nin nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi*, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul.

Barisic K, Petrik J, Rumora L (2003) *Biochemistry of apoptotic cell death*, Acta Pharm., 53: 151-164.

Belkacemi Y, Huchet A, Baudouin C, Lartigau E (2005) *Radiation-induced apoptosis in the eye structures*, Radiation Physics and Chemistry, 72: 409–418.

Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR, Liu ZG, Thorburn A (2005) *The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm*, Cell Death and Differentiation, 12: 473–481.

Bilgici B (2004) *Apoptozis*, Erişim: [<http://biyokimya.8m.net/apopitozis.html>], Erişim Tarihi: 08.05.2007.

Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJW (1995) *Apoptosis in testis germ cells; developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages*, Endocrinology, 136 (1): 5-12.

Boulares AH, Yakovlev AG, Ivanova V, Stoica BA, Wang G, Iyer S, Smulson M (1999) *Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis*, The Journal of Biological Chemistry, 274 (33): 22932–22940.

Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu M, Haegeman G, D'herde K, Vandenabeele P (2004) *Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production*, Molecular Biology of the Cell, 15: 1089–1100.

Brugere CM, Nowacki W, Gueux E, Kuryszko J, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A (1999) *Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress*, British Journal of Nutrition, 81: 405–411.

Chan WY, Cheung KK, Schorge JO, Huang LW, Welch WR, Bell DA, Berkowitz RS, Mok SC (2000) *Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers*, American Journal of Pathology, 15 (2): 409-417.

Choi D, Hwang S, Lee E, Yoon S, Yoon BK, Bae D (2004) *Expression of mitochondria-dependent apoptosis genes (p53, bax, and bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development*, J. Soc. Gynecol Investig, 11 (5): 311-317.

Cohen JJ (1993) *Apoptosis; The physiological pathway of cell death*, Hosp. Pract., 15: 35-43.

Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC (1997) *Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis*, The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 45 (7): 923–934.

Cree IA, Nurbhai S, Milne G, Beck JS (1987) *Cell death in granulomata; the role of apoptosis*, J. Clin. Pathol., 40: 1314-1319.

Dayan YB, Kaveri SV, Kazatchkine MD, Shoenfeld Y (2000) *Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies?*, Medical Hypotheses, 55 (2): 103–108.

Despres P, Frenkiel MP, Ceccaldi PE, Santos CDD, Deubel V (1998) *Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses*, Journal of Virology, 72 (1): 823-829.

Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH (1999) *Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma*, Cancer Research, 59: 5386–5391.

Erdoğan BB (2003) *Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fas1 bağımlı apoptozis*, Akciğer Arşivi, 4: 165-174.

Erer H, Kiran MM (2000) *Veteriner onkoloji*, 2. Baskı, Konya, s: 76-77.

Essmann F (2000) *Mechanisms of apoptosis in cancer; regulatory role of caspases*, Doctoral Thesis, Tecnic University of Berlin, Berlin.

Estaquier J, Idziorek T, Bels FD, Sinoussi FB, Hurtrel B, Aubertin AM, Venet A, Mehtali M, Muchmore E, Michel P, Mouton Y, Girard M, Ameisen JC (1994) *Programmed cell death and AIDS; significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections*, Immunology, 91: 9431-9435.

Fabbi M, Marimpietri D, Martini S, Brancolini C, Amoresano A, Scaloni A, Bargellesi A, Cosulich E (1999) *Tissue transglutaminase is a caspase substrate during apoptosis. Cleavage causes loss of transamidating function and is a biochemical marker of caspase 3 activation*, Cell Death and Differentiation, 6: 992–1001.

Frankfurt OS, Krishan A (2001) *Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening*, Journal of Immunological Methods, 253: 133–144.

Galle PR (1997) *Apoptosis in liver disease*, Journal of Hepatology, 27: 405-412.

Gastman BR (2001) *Apoptosis and its clinical impact*, Head & Neck, 23: 409–425.

Gavrieli Y, Sherman Y, Shmuel A, Sason B (1992) *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*, The Journal of Cell Biology, 119 (3): 493-501.

Giannetti L, Consolo U, Magnoni C, Muzio LL (2004) *Apoptosis; escaping strategies in human skin cancer*, Oncology Reports, 11: 401-405.

Goumenou A, Panayiotides I, Matalliotakis I, Vlachonikolis I, Tzardi M, Koumantakis E (2001) *Bcl-2 and Bax expression in human endometriotic and adenomyotic tissues*, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 99: 256-260.

Guimaraes CA, Linden R (2004) *Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles*, Eur. J. Biochem., 271: 1638–1650.

Güçer Ş, Tınaztepe K (2001) *Böbrek hastalıklarında apoptozisin rolü*, Hacettepe Tıp Dergisi, 32 (2): 160-168.

Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C (2004), *Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi*, Turkish Journal of Biochemistry, 29 (3): 237-242.

Güvenç T (2002) *İnfeksiyöz bursal hastalığın immunoperoksidaz tekniği ile tanısı ve B lenfositlerde apoptozisin incelenmesi*, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri, Ankara.

Haziroğlu R, Milli ÜH (2001) *Veteriner patoloji*, 2. Cilt, 2. Baskı, Mesipres Yayıncılık, Ankara, s: 564.

He WX, Niu ZY, Zhao SL, Smith AJ (2005) *Smad protein mediated transforming growth factor b1 induction of apoptosis in the MDPC-23 odontoblast-like cell line*, Archives of Oral Biology, 50: 929-936.

Hekim N (2003) *Apoptosis*, Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu, İstanbul, s: 115-140.

Herrmann M, Kalden JR (2003), *Apoptosis and autoimmunity*, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, University of Erlangen-Nuremberg, Institute for Clinical Immunology Weinheim, Germany.

Hikim APS, Wang C, Leung AR, Swerdloff S (1995) *Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment*, Endocrinology, 136 (6): 2770-2775.

Higuchi Y (2003) *Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stres*, Biochemical Pharmacology, 66: 1527–1535.

Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, Bayer E, Walczak H, Kaltho H, Ungefroren H (2000) *Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis*, Oncogene, 19: 5477-5486.

Huang J, Wu L, Tashiro SI, Onodera S, Ikejima T (2005) *Bcl-2 up-regulation and P-p53 down-regulation account for the low sensitivity of murine L929 fibrosarcoma cells to oridonin-induced apoptosis*, Biol. Pharm. Bull., 28 (11): 2068 - 2074.

Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P (1999) *The apoptosis cascade; morphological and immunohistochemical methods for its visualization*, Anat. Embryol., 200: 1–18.

Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T (1999) *Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress*, Biology of Reproduction, 61: 393-399.

Ji L, Zhang G, Uematsu S, Akahori Y, Hirabayashi Y (1995) *Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death by natural ceramide*, FEBS Letters, 358: 211-214.

Johnson DE (2000) *Programmed cell death regulation; basic mechanisms and therapeutic opportunities*, Leukemia, 14: 1340–1344.

Kaipia A, Hsu SY, Hsueh AJW (1997) *Expression and function of a proapoptotic Bcl-2 family member Bcl-xl/Bcl-2-associated death promoter (BAD) in rat ovary*, Endocrinology, 138 (12): 5497-5504.

Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T, Kaneko S, Akaike A, Honda Y, Minami M, Satoh M (1999) *Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina*, Brain Research, 815: 11–20.

Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H (1999) *Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy not apoptosis but DNA repair*, Circulation, 99: 2757-2764.

Katano H, Pesnicak L, Cohen JI (2004) *Simvastatin induces apoptosis of Epstein–Barr virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas*, PNAS, 101: 4960-4965.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV (1994) *Apoptosis; its significance in cancer and cancer therapy*, Cancer, 73 (8): 2013-2026.

Kurita T, Wang YZ, Donjacour AA, Zhao C, Lydon JP, O'Malley BW, Isaacs JT, Dahiya R, Cunha GR (2001) *Paracrine regulation of apoptosis by steroid hormones in the male and female reproductive system*, Cell Death and Differentiation, 8: 192- 200.

Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M (2002) *Apoptozis ve kardiyovasküler hastalıklar*, Anadolu Kardiyoloji Dergisi, 4: 323-329.

Laurenzi VD (2006) *Flow cytometric methods for the study of cell death*, Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Lehnhardt M, Hitpass LK, Kuhnen C, Homann HH, Daigeler A, Steinau HU, Roehrs S, Schnoor L, Steintraesser L, Mueller O (2005) *Response rate of fibrosarcoma cells to cytotoxic drugs on the expression level correlates to the therapeutic response rate of fibrosarcomas and is mediated by regulation of apoptotic pathways*, BMC Cancer, 5 (74): 1-16.

Liu X, Shi Y, Birnbaum MJ, Ye K, Jong RD, Oltersdorf T, Giranda VL, Luo Y (2006) *Quantitative analysis of anti-apoptotic function of akt in akt1 and akt2 double knock-out mouse embryonic fibroblast cells under normal and stressed conditions*, The Journal of Biological Chemistry, 281 (42): 31380–31388.

Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW (1997) *Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury*, The Journal of Neuroscience, 17 (14): 5395–5406.

Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Agro AF (2000) *Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors*, The Journal of Biological Chemistry, 275 (41): 31938–31945.

Maliqueo M, Clementi M, Gabler F, Johnson MC, Palomino A, Petermann TS, Vega M (2003) *Expression of steroid receptors and proteins related to apoptosis in endometria of women with polycystic ovary syndrome*, Fertility and Sterility, 80 (2): 812-819.

Matylevitch NP, Schuschereba ST, Mata JR, Gilligan GR, Lawlor DF, Goodwin CW, Bowman PD (1998) *Apoptosis and accidental cell death in cultured human keratinocytes after thermal injury*, American Journal of Pathology, 153 (2): 567-577.

Mcphie DL, Coopersmith R, Peralta AH, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, Kozlowski MR, Neve KA, Neve RL (2003) *DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3*, The Journal of Neuroscience, 23 (17): 6914–6927.

Mehmet H (2006) *Detection of mitochondrial events in apoptosis*, Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Nagata S (1997) *Apoptosis by death factor*, Cell, 88: 355–365.

Nicholson DW, Nicotera P, Melino G (2004) *Caspases and cell death*, Encyclopedia of Biological Chemistry, 1: 319-327.

Nishihara H, Kondoh SK, Insel PA, Eckmann L (2003) *Inhibition of apoptosis in normal and transformed intestinal epithelial cells by cAMP through induction of inhibitor of apoptosis protein (IAP)-2*, PNAS, 100: 8921-8926.

Ozeki N, Mogi M, Nakamura H, Togari A (2002) *Differential expression of the Fas–Fas ligand system on cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cells*, Archives of Oral Biology, 47: 511–517.

Öktem S, Özhan MH, Özol D (2001) *Apoptozisin önemi*, Toraks Dergisi, 2 (1): 91-95.

Öniz H (2004) *Apoptoz; ölmeye yatmak*, SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi, 14 (1): 1-20.

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

Özvaran MK (2004) *Malign mezotelyomada gen tedavisi*, Toraks Dergisi, 5 (2): 110-115.

Parat MO, Richard MJ, Pollet S, Hadjur C, Favier A, Beani JC (1997) *Zinc and DNA fragmentation in keratinocyte apoptosis; its inhibitory effect in UVB irradiated cells*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 37: 101-106.

Pinero J, Baena ML, Ortiz T, Cortes F (1997) *Apoptotic and necrotic cell death are both induced by electroporation in HL60 human promyeloid leukaemia cells*, Apoptosis, 2: 330-336.

Piret JP, Arnould T, Fuks B, Chatelain P, Remacle J, Michiels C (2004) *Caspase activation precedes PTP opening in TNF- α -induced apoptosis in L929 cells*, Mitochondrion, 3: 261-278.

Rajagopalan R, Kagiya TV, Krishnan C, Nair K (2003) *Radiosensitizer Sanozele (AK-2123) enhances gamma radiation induced apoptosis in murine fibrosarcoma*, J. Radiat. Res., 44: 359-365.

Ramachandran V, Watts LT, Maf SK, Chen J, Schenker S, Henderson G (2003) *Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons*, Journal of Neuroscience Research, 74: 577-588.

Rashed MM, Ragab NM (2004) *The pattern of expression of the apoptotic inducer fas and the apoptotic inhibitor bcl-2 oncogenes immunohistochemically in bone-marrow invaded by the non-hodgkin lymphomas*, Turk. J. Haematol., 21 (3): 141-147.

Regan SE, Broad M, Byford AM, Lankford AR, Cerniway RJ, Mayo MW, Matherne GP (2003) *A1 adenosine receptor overexpression attenuates ischemiareperfusion-induced apoptosis and caspase 3 activity*, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 284: 859-866.

Rogakou EP, Neira WN, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000) *Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139*, The Journal of Biological Chemistry, 275 (13): 9390–9395.

Roshal M, Zhu Y, Planelles V (2001) *Apoptosis in AIDS*, Apoptosis, 6: 103–116.

Saraste A, Pulkki K (2000) *Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis*, Cardiovascular Research, 45: 528–537.

Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ (2001) *Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas*, Annals of Surgical Oncology, 8 (4): 305-310.

Schultz DR, William J, Harrington JR (2003) *Apoptosis; programmed cell death at a molecular level*, Seminars in Arthritis and Rheumatism, 32 (6): 345-369.

Soini Y, Paakko P, Lehto VP (1998) *Histopathological evaluation of apoptosis in cancer*, American Journal of Pathology, 153 (4): 1041-1053.

Spinozzi F, Fizzotti M, Agea E, Piattoni S, Droetto S, Russano A, Forenza N, Bassotti G, Grignani F, Bertotto A (1998) *Defective expression of Fas messenger RNA and Fas receptor on pulmonary t cells from patients with asthma*, Annals of Internal Medicine, 128 (5): 363-369.

Staley K, Blaschke AJ, Chun J (1997) *Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends*, Cell Death and Differentiation, 4: 66 -75.

Stassi G (2006) *Detection of apoptosis in tissues*, Apoptozis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri Kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Tomatır AG (2003) *Apoptoz; programlı hücre ölümü*, T. Klin. J. Med. Sci., 23: 499-508.

Topal D, Göral V, Topal AE (2004) *Helicobacter pylori infeksiyonunun apoptozisdeki rolü*, Güncel Gastroenteroloji, 8 (4): 248-251.

Tormanen U, Eerola AK, Rainio P, Vahakangas K, Soini Y, Sormunen R, Bloigu R, Lehto VP, Paakkö P (1995) *Enhanced apoptosis predicts shortened survival in non-small cell lung carcinoma*, *Cancer Research*, 55: 5595-5602.

Tüzün C (2002) *Biyokimya*, 4. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, s: 305.

Ulukaya E (2003) *Apoptozis ders notları*, Erişim: http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf., Erişim Tarihi: 04.05.2007.

Vairetti M, Ferrigno A, Bertone R, Richelmi P, Berte F, Freitas I (2005) *Apoptosis vs. necrosis: glutathione-mediated cell death during rewarming of rat hepatocytes*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1740: 367– 374.

Walker PR, Leblanc J, Sikorska M (1997) *Evidence that DNA fragmentation in apoptosis is initiated and propagated by single-strand breaks*, *Cell Death and Differentiation*, 4: 506 – 515.

Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M (1999) *Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis*, *Enzymology*, 17: 329-338.

Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T, Kawasaki H, Sugiyama T, Kawarada Y, Tanigawa N (1999) *Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods; antibody against single-stranded DNA and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) methods*, *Jpn. J. Cancer Res.*, 90: 188–193.

Westphal S, Kalthoff H (2003) *Apoptosis; Targets in pancreatic cancer*, *Molecular Cancer*, 2 (6): 1-14.

Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Velde CJH, Cornelisse CJ, Dierendonck JHV (1993) *A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA*, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 41 (1): 7-12.

Willingham MC (1999) *Cytochemical methods for the detection of apoptosis*, *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 47 (9): 1101–1109.

Wöhrmann T, Teredesai A (2002) *Metastasizing fibrosarcoma in a wistar rat*, *J. Vet. Med. A.*, 49: 538–540.

Wright SC, Wei QS, Kinder DH, Larrick JW (1996) *Biochemical pathways of apoptosis; nicotinamide adenine dinucleotide-deficient cells are resistant to tumor necrosis*

factor or ultraviolet light activation of the 24-kd apoptotic protease and DNA fragmentation, J. Exp. Med., 183: 463-471.

Wyllie AH (1980) *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation, Nature, 284: 555-556.*

Wyllie AH (1992) *Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues; an overview, Cancer and Metastasis Reviews, 11: 95-103.*

Yılmaz İ (2005) *Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi; ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin TUNEL yöntemi ile değerlendirilmesi, Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.*

Zhang CL, Wu LJ, Tashiro SI Onodera S, Ikejima T (2004) *Oridonin induces a caspase-independent but mitochondria and MAPK dependent cell death in the murine fibrosarcoma cell line L929, Biol. Pharm. Bull., 27 (10): 1527-1531.*

Zhang J, Xu M (2002) *Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis, Trends in Cell Biology, 12 (2): 84-89.*

Zhang W, Khanna P, Chan LL, Campbell G, Ansari NH (1997) *Diabetes-induced apoptosis in rat kidney, Biochemical And Molecular Medicine, 61: 58-62.*

ÖZGEÇMİŞ

Denizli ilinin Çal ilçesinin Bahadınlar köyü'nde 1981 yılında doğdu. İlkokulu, Bahadınlar ilkokulunda, Ortaokulu, Ortaköy ortaokulunda, Liseyi, Çal lisesinde tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2004 yılında mezun oldu. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda 2004 yılında Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2005 yılında Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2006 yılında evlendi. Halen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım ve hoşgörüsünü eksik etmeyen danışmanım ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK' e ve çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Kamil SEYREK, Doç. Dr. Funda KIRAL ve Yrd. Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŐ' a ve Yüksek Lisans Öğrencisi Hemşire Dilek SAÇU' ya, deneme aşamasında desteğini aldığım Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ülker EREN'e ve Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mustafa SANDIKÇI, Araş. Gör. Özay GÜLEŐ ve doktora öğrencisi Müge BOZKURT' a sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Eşim Araş. Gör. Dilek AKŞİT' e sabır, özveri ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

ÖZET

Fibrosarkom mezenkimal dokudan köken alan bağ dokunun kötü huylu tümörü olup daha çok kedi ve köpeklerde görülmekle birlikte tüm hayvan türlerinde ortaya çıkabilir. Hızlı ve infiltratif büyüyen bir tümördür. Rodentlerde en yaygın görülen mezenkimal tümörlerdendir ve ratlarda spontan olarak şekillenme olasılığı % 1-3, farelerde görülme olasılığı ise % 1-6 düzeyindedir. Apoptozis ise; gelişmiş organizmalarda hücreler arası ilişkilerin gereği olarak gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin, çevreye zarar vermeden programlı ölümüdür. Kanselerde erken teşhis yanında prognozun tayini, hastanın yaşamını uzatmada ve daha uygun tedavi şekillerinin tespit edilmesinde büyük önem taşımaktadır. Özellikle kedilerde aşı yerlerinde gelişen fibrosarkomlar önemli bir problem oluşturmakta ve bunun en başta gelen sebebi olarak ise aşı yerlerinde oluşan kronik yangılar ileri sürülmektedir. Son dönemlerde kanser üzerine yapılan çalışmalarda programlı hücre ölümünün önemli rol oynadığı bilinmektedir. Çalışmada ratlarda deneysel olarak 3-metilcholantren ile oluşturulan fibrosarkomlarda programlı hücre ölümü iki ayrı metotla gösterilmiştir. Böylece fibrosarkom ile programlı hücre ölümü arasındaki ilişki incelenmiştir. Aynı zamanda ELISA yöntemiyle DNA hasarı tespiti ve programlanmış hücre ölümünün immunohistokimyasal olarak saptanması karşılaştırılmıştır.

Araştırmanın materyalini 16 adet 8 haftalık ağırlıkları 150-200 gram olan erkek Sprague Dawley türü rat oluşturdu. Ratlar her grupta 8 adet olmak üzere iki gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol, ikinci grup deneme grubunu oluşturdu. Hayvanlara tüm deney boyunca kuru pelet yem ve içme suyu ad libitum olarak verildi. Deneme süresi 150-210 gün sürdü. Deneme süresinin başında deneme grubundaki ratların boyun bölgelerinin dorsoline 0,25 ml susam yağında çözdürülen 0,2 mg 3-metilcholantren fibrosarkoma oluşturmak üzere deri altı yolla tek doz enjekte edildi. Kontrol grubuna ise tek doz 0,25 ml susam yağı deri altı yolla enjekte edildi. Deney süresi boyunca hayvanlar periyodik olarak kontrol edilip tümoral oluşum yönünden palpe edildi. Deney süresinin sonunda ratlara eter anestezisi altında ötenazi uygulanarak nekropsileri yapıldı. Oluşan tümör kitlelerinde DNA kırılmaları, ELISA yöntemiyle Roche firmasının kitleriyle bakıldı. Alınan dokulardan Bcl-2 ve Bax için immunohistokimyasal boyama yapıldı.

Deneme ve kontrol grubundan alınan dokular homojenize edilip santrifüj işleminden sonra süpernatant ELISA' da kullanıldı. ELISA sonuçlarına göre deney grubunda DNA fragmentasyonu ortalama 0,262 U (=absorbans), kontrol grubundaki ratlarda ise 0,069 U olarak tespit edildi. Yani deney grubunda DNA fragmentasyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 4 katı artmış olarak tespit edildi.

Deneme ve kontrol grubundan alınan dokuların Bcl-2 ve Bax için immunohistokimyasal boyaması sonucunda, deney grubunda yoğun olarak bcl-2 ve bax pozitif hücreler tespit edilmiş olup tümörlerde apoptozis uyarısı alan hücrelerin bazılarının apoptozise bir süre daha gitmesi engellenirken bazılarının da artık apoptotik ölüme yönlendikleri tespit edilmiştir.

Elde edilen bulgular sonucunda, fibrosarkomalarda apoptozis sık görülen bir olay olup, DNA fragmentasyonu apoptozisin en önemli belirtisidir. Kanser tedavisi ile uğraşanların apoptozis, Bcl-2 ve Bax' ı göz önünde bulundurması gerektiği, literatür bilgileri doğrultusunda tümörün başlangıç evresinde apoptozisin azaldığı, tümörün proliferasyonla birlikte apoptozisin de arttığı kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler; Fibrosarkoma, apoptozis, Bcl-2, Bax, DNA fragmentasyonu, immunohistokimya, 3-metilkolantren, rat.

SUMMARY

Detection of Apoptosis in Experimentally Induced Fibrosarcomas Using DNA Fragmentation and Immunohistochemical Methods

Fibrosarcoma is deriving from mesenchymal tissue. It is one of the malignant tumors and usually seen in cats and dogs, however, it can be encountered in all animals. It is growing quite fast and invades other tissues rapidly. It is one of the mesenchymal tumors in rodents varying between 1-3 %, and in rats 1-6 %. Apoptosis is used for eliminating cells which are not functioning properly. Early diagnosis of tumors and follow-up prognosis are of great importance for the extension of life of cancer patients. Especially, fibrosarcomas in cats occur in vacation areas due to chronic inflammation. Recent studies on tumors showed that there is a connection between cancers and apoptosis. In this study, apoptosis in fibrosarcomas induced by 3-methylcholanthrene was investigated with two different methods. Thus, the relationship between apoptosis and fibrosarcomas is investigated. On the other hand, programmed cell death was investigated using immunohistochemical and ELISA methods and differences in results are compared.

Sixteen male Sprague Dawley rats were used in this study. They were 8 weeks old and their body weights were between 150-200 grams. Rats were allocated into two groups, each containing 8 rats. During the experiment, which took between 150-210 days depending on the appearance of tumor tissue, they were allowed free access to water and feed. In order to induce fibrosarcoma in rats, at the beginning of the experiment, animals were injected subcutaneously on the neck with 0,2 mg 3-methylcholanthrene dissolved in 0,25 ml sesame oil. To find out whether any tumoral tissue occurred, animals were palpated daily. At the end of the experiment, animals were killed under ether anesthesia and necropsy was performed. DNA fragments of tumor tissue cells were analyzed using ELISA (Roche), and localization of Bcl-2 and Bax was determined by immunohistochemical method.

Tissues obtained from the control and the experimental animals were homogenized, centrifuged, and the supernatant was used for ELISA procedure. In the experimental group, absorbance of the DNA fragmentation was 0,262 U, but in the control group it was 0,069 U. In

other words absorbance of DNA fragmentation of experimental animals was 4 times higher than that of controls.

Immunohistochemically there was a lot of Bcl-2 and Bax positive cells. Contrary to this in control animals there was hardly Bcl-2 and bax positive cells. This data indicates that in the tumor tissue it is observed some cells programmed to death by apoptosis but the others not.

In the light of this findings we got in the present study apoptosis is encountered frequently in fibrosarcoma and fragmentation of the DNA indicates apoptosis. Researchers who are engaged in curing of cancer patients should take into consideration of levels of Bcl-2 and Bax proteins. Furthermore, similar to the results of previous studies the rate of apoptosis seems to be very low at the beginning of the cancer however in the course of the time concomitantly the increase in proliferation of the tumor cells the rate of apoptosis increased dramatically.

Key words; Fibrosarcoma, apoptosis, Bcl-2, Bax, DNA fragmentation, immunohistochemistry, 3-methylcholanthrene, rat.