

## Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Özay GÜLEŞ<sup>1\*</sup> Ülker EREN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji- Embriyoloji AD, Aydın, Türkiye

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Histoloji- Embriyoloji AD, Aydın, Türkiye

Geliş tarihi: 20.11.2008

Kabul Tarihi: 03.12.2008

### ÖZET

Apoptoz (fizyolojik hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinen fizyolojik bir olaydır. Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal (DNA parçalanması, fosfotidilserin moleküllerinin hücre membranının dış yüzüne çıkması) ve morfolojik değişim (hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimcikler) gözlenir. Bu değişimleri saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. DNA fragmentasyonu histokimyasal olarak (TUNEL) gösterilebileceği gibi, biyokimyasal (agoroz jel elektroforezi) olarak da gösterilebilir. Hatta, ELISA ile de gösterilebilir. Transmisyon elektron mikroskopisi, apoptozun morfolojik olarak tanınması için iyi bir yöntemdir. Apoptoz ayrıca Caspase-3 (Kaspaz-3) metodu kullanılarak da belirlenebilir.

### Anahtar Kelimeler

Apoptoz, Fizyolojik Hücre Ölümü, DNA Parçalanması, TUNEL.

### Methods for Detection of Apoptosis

### SUMMARY

Apoptosis (physiological cell death) also known as suicide of cells is physiological event. When cells are determined to die by apoptosis, they indicate some biochemical (DNA fragmentation, phosphatidylserine translocated to the outer leaflet of apoptotic cell membranes) and morphological changes (cell shrinkage, chromatin condensation, apoptotic bodies) after indicate for apoptosis. These changes can be determined by means of various methods. DNA fragmentation can be determined by histochemical (TUNEL) and biochemical (agarose gel electrophoresis) methods and ELISA. Transmission electron microscopy is suitable method for morphological changes. In addition, apoptosis also can be determined by using caspase-3 method.

### Key Words

Apoptosis, Physiological Cell Death, DNA Fragmentation, TUNEL.

### GİRİŞ

Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle artan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir. Eğer bir organizmada bir hücreye artık gereksinim duyulmuyorsa, hücre içi haberci sistemleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Bu intihar süreci Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz ya da programlı hücre ölümüyle gerçekleşir (10, 20, 26). Hücre ölümleri fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak da adlandırılır (3, 9, 29). Canlılığın başarılı bir organ gelişimini sağlayabilmesi embriyonik gelişme sırasında gerçekleşen hücre ölümlerine bağlıdır (19, 26). Apoptoz; gelişim, dokularda hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanma gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak meydana gelir. Bunun yanında hücreler, hastalıklar veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğünde veya immün reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkar (11, 34, 37).

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelir (11).

Apoptotik indeks, apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı ile belirlenmektedir. Bunun için öncelikle apoptozun hücrelerde görünür hale getirilerek belirlenmesi gerekir. Bu amaçla çeşitli morfolojik ve biyokimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Hazırlanan bu derlemede apoptoza uğrayan hücrelerde meydana gelen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler belirtildikten sonra, kullanılan yöntemler hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

### Apoptotik Hücrede Gözlenen Değişiklikler

Apoptoz için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır (9, 32).

Apoptoza uğrayan bir hücrede laminin ve aktin filamentlerinin kesilmesi sonucu sitoplazma çekilmeye ve küçülmeye başlar. Kromatin ve çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin parçalanması sonucu çekirdekte kondensasyon başlar ve çoğu zaman çekirdek kromatinin çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle at nalı biçiminde görülür. Hücre büzülme ve küçülmeye devam eder ve makrofajların tanıyabileceği ve normal hücrelerden daha kolay ayırt edilebileceği membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan apoptotik cisimler meydana gelir

\*Sorumlu araştırmacı: ogules@adu.edu.tr

(22, 26, 35). Çekirdek de hücre gibi büzüşür ve bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nüklear porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar (22)

Apoptoz sırasında apoptotik hücrelerin membranlarında değişimler olur. En belirgin değişim normalde hücre membranının sitoplazmik yüzeyinde yer alan negatif yüklü fosfolipidlerin birimlerinin hücre membranının dış yüzeyine çıkmasıdır. Bunun sonucunda kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinler apoptotik hücre zarına bağlanmaktadır. Ayrıca normalde hücre zarında gizlenmiş olan N-asetil glikozamin ve N,N-diasetilşitabroz molekülleri apoptozda açığa çıkarlar ve makrofajlar tarafından tanınırlar (24). Apoptotik hücrelerde görülen morfolojik membran değişimlerinden biri de hücre içeriklerini içine alan ve membranla çevrili veziküller biçiminde apoptotik hücrelerden kopan tomurcuklardır. Bu küçük veziküller apoptotik cisim olarak da adlandırılırlar. Bu değişimler apoptotik sürecin sonlarına doğru görülür (26).

Apoptozun en belirgin özelliği hücre içi Ca ve Mg bağımlı endojen endonükleaz enziminin aktivasyonu ile kromozomal DNA'nın nükleozomal birimlere parçalanmasıdır. Apoptotik hücrelerin DNA'sı agaroz jel elektroforezinde merdiven basamağına benzer (ladder formasyonu) bir yapı biçiminde görülür. Bu, apoptoz için tipik bir görünüm sağlar (4, 7, 9). Fragmentasyon apoptotik hücrelerde CAD (caspase activated DNaz-kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz-) enzimi tarafından DNA'nın nükleozom birimlerine ayrılmasıyla sağlanır. CAD normal hücrelerde ICAD'a (inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease-kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü- DNA fragmentasyon faktör 45) bağlı inaktif formda bulunur ancak apoptoz sinyali alan hücrelerde kaspaz 3 tarafından aktive edilir ve bu enzim DNaz (endonükleaz) olduğu için çekirdek DNA'sının hızlı biçimde 180-200 baz çiftlik nükleozomal fragmanlara ayrılmasını sağlar (9, 26, 27).

Bu değişimlerin yanında erken dönemde apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (blebs) izlenebilir. Ayrıca, hücrelerin sitoplazmasında ortaya çıkan vakuoller ve bazı hücre tiplerinde "blister" olarak adlandırılan hücrenin sitoplazmasından dışarıya taşar gibi görülen bir veya birkaç tane büyük vakuol de gözlenebilir. Bu vakuoller (hayalet hücre- ghost cell) hücreden ayrılıp besiyeri içinde yüzebilirler (36).

#### *Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler*

##### *Hematoksilen-eozin boyama*

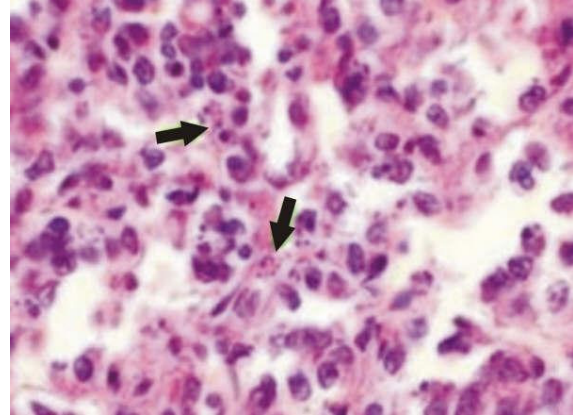
Hematoksilen-eozin (HE) ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir. HE hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir.

HE boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi (22, 36) (Şekil 1).

##### *Giemsa boyama*

Giemsa ile boyamada, hematoksilen-eozin ile boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekte

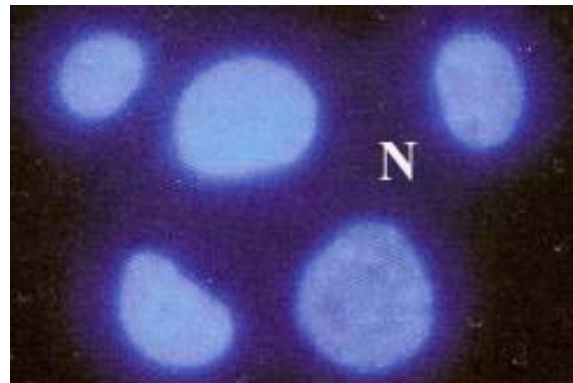
birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (39).



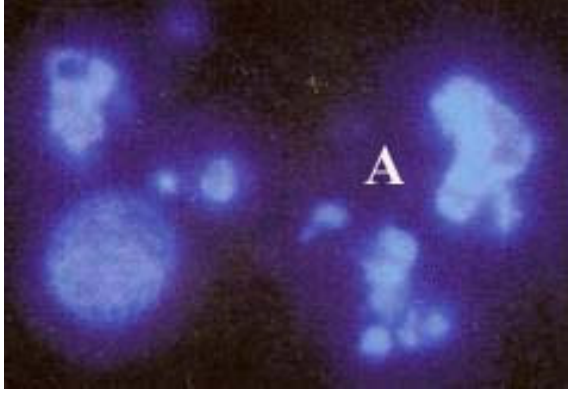
**Şekil 1.** Apoptotik hücreler (oklar) (HE boyama) (25).

##### *Floresan mikroskopi*

Floresan mikroskopi, floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI "4,6-diamidine-2'-phenylindole", propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC "fluorescein isothiocyanate") kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanınırlar. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. propidium iyodür) beraber kullanılır. Membranı sağlam olan (canlı) hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanırlar. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekroz ile ölüp ölmediklerinin ayırımı, hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır. Kromatin kondensasyonu veya nükleus fragmentasyonu olan hücrelerin apoptotik hücreler olduklarını düşündürür (36,39) (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Nekrotik, apoptotik ve normal hücre ayırımı Tablo 1'de özetlenmiştir.



**Şekil 2.1.** N, Normal hücreler- Hoechst boyama (31).



Şekil 2.2. A, Apoptotik hücreler- Hoechst boyama (31).

**Tablo 1.** Floresan mikroskopide apoptotik hücrelerin nekrotik ve normal hücrelerden ayırımı.

	Hoechst boyası	Propidiyum iyodür	Apoptotik morfoloji
Nekrotik hücreler	+	+	-
Apoptotik hücreler	+	-	+
Normal hücreler	+	-	-

#### Elektronmikroskopi

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği bir yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir (39) (Şekil 3).

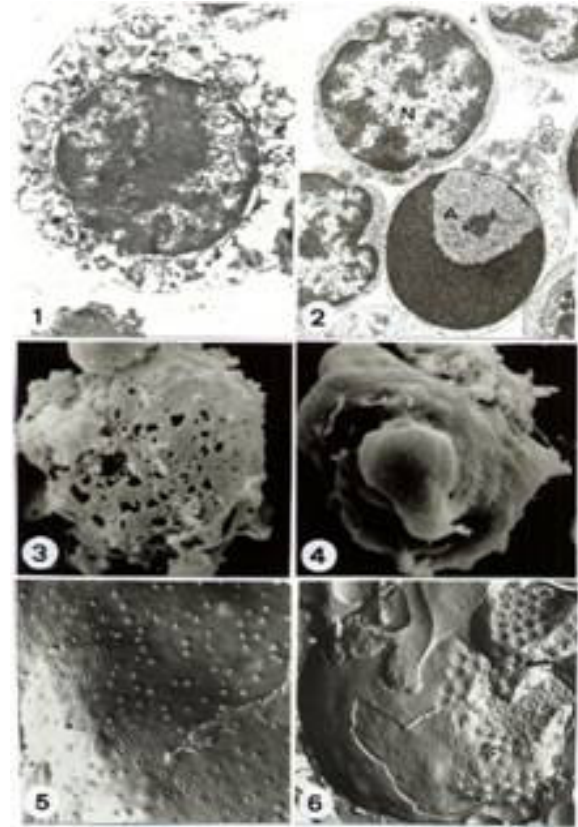
#### Faz kontrast mikroskopi

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları substratından (alt tabaka) ayrılacakları için besiyeri içinde yüzmeye başlarlar. Bu hücreler faz kontrast mikroskobu ile gözlenebilirler. Mitoza giden hücreler de faz kontrast mikroskobuyla gözlenebilirler. Fakat bu hücreler aynı zamanda apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karışabilirler. O yüzden ayrımları hemen hemen imkansızdır. Faz kontrast mikroskobu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler (blebs) 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 vakuol de gözlenebilir. Bu vakuoller hücreden ayrılıp besiyeri içinde yüzebilirler. İçleri boş küresel yapılar olarak gözükürler. Bu vakuoller olasılıkla bazı araştırmacıların hayalet hücre (ghost cell) olarak adlandırdıkları yapılardır. Hücre kültürü ortamında apoptoza giden hücrelerin başlangıçta hücre membranları intakt olmasına rağmen ileri dönemlerde sekonder nekroz gelişir ve böylece membran bütünlükleri bozulur.

Sekonder nekroz aşamasına kadar olan süre içinde non-vital boyalar denen (örn. propidiyum iyodür) boya ile boyanacak olurlarsa apoptoz başlamış olmasına rağmen hücreler bu boya ile boyanmazlar. Çünkü membran bütünlüğü halen tamdır. Sekonder nekroz geliştikten sonra membran bütünlüğü bozulur ve hücreler non-vital boya ile boyanma özelliği kazanmaya başlarlar.

Blisterlerin oluştuğu aşamada membran bütünlüğü halen tamdır ve bu aşamada nükleus morfolojisindeki değişiklikler floresan boya ile gözlenebilir. Fakat bu dönem uzun sürmez dakikalar içinde membran bütünlüğü bozulur. İstenirse hem faz kontrast mikroskobu hem de floresan mikroskobu aynı anda kullanılabilir. Böylece nükleusu renklendirilmiş ve belirgin bir şekilde ortaya konmuş hücrelerin faz kontrast mikroskobu fotoğrafları elde edilebilir (36).



Şekil 3. 1, Nekrotik Hücre 2, Apoptotik (A) ve normal (N) hücre 3, Nekrotik Hücre 4, Apoptotik Hücre 5, Normal Hücre 6, Apoptotik Hücre (38).

#### Anneksin V yöntemi

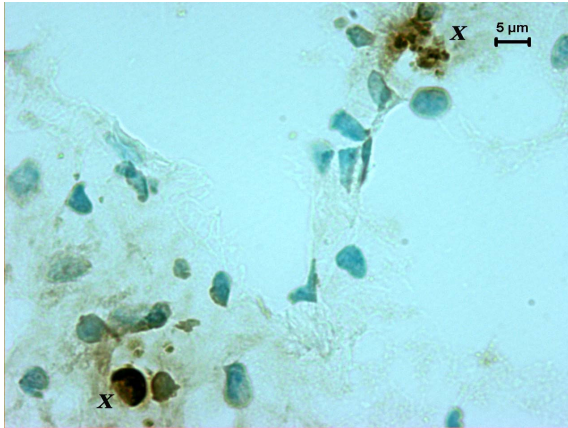
Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzüne transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (6, 12, 16, 21, 23, 33, 40). FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma



oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidyum iyodür eklenmektedir. Annexin V-FITC (green fluorescence) ve non-vital boya olan propidium iodide (red fluorescence) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (15, 21, 23, 33).

#### TUNEL yöntemi

DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar (13, 17, 39). Apoptotik parçalanma sonucu DNA uçları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme göreceli olarak daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur. Konvansiyonel parafin kesitleri, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak yapılan *in situ* işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğerlerinden ayırmada yeterli olmaktadır. Bu yöntem yaygın olarak "TdT-dUTP nick-end-labelling" sözcüklerinin kısaltılması olan "TUNEL" yöntemi adıyla anılmaktadır (1, 11, 17) (Şekil 4).



Şekil 4. Karaciğer dokusunda apoptotik hücreler (X).

#### M30 yöntemi

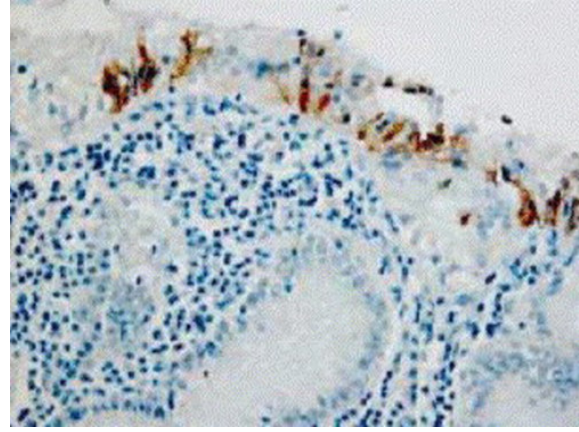
M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (18, 36) (Şekil 5).

Sitokeratin 18 (CK18) tek katlı ve glanduler epitel hücrelerinde bulunan tip 1 intermediate filament proteindir. Çoğunlukla akciğer, karaciğer, prostat, göğüs ve kolon kanser tiplerinde eksprese edilirken, lenfoid ve nöral hücrelerde bulunmaz (8).

#### Kaspaz-3 yöntemi

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının

bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metotla tespit edilebilirler (23, 36).



Şekil 5. M30 CytoDEATH ile pozitivite veren mide mukozasındaki apoptotik epitel hücreler (SABC boyama metodu) (14).

#### Agaroz jel elektroforezi

Agaroz orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamıdır. Ayırılacak moleküllerin büyüklüğüne bağlı olarak genelde % 0.3 ile 2 agaroz konsantrasyonları kullanılır.

En çok 50 kb'a kadar olan nükleik asitler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılabilir. Agaroz konsantrasyonu ayarlanarak jelde moleküllerin hareket ettiği porların çapı değiştirilebilir. Jelin konsantrasyonu arttıkça, porların çapı küçülür. Böylece küçük DNA parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için ise düşük agaroz konsantrasyonları kullanılarak nükleik asitlerin en iyi şekilde ayrışmaları sağlanır.

Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan ethidium bromide ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. DNA'nın jelde görünür hale gelmesi, ethidium bromide'in DNA'nın iki zinciri arasına girerek 300 veya 360 nm dalga boyundaki ışığı soğurması sonucu floresan etki göstermesi ile gerçekleşir (2).

Apoptotik hücrelerdeki endonükleaz aktivasyonu kromatinin oligonükleozomal parçacıklara ayrılmasına neden olur. Bu enzim kalsiyum ve magnezyum bağımlı olup, DNA'da tipik olarak 180-200 baz çifti ve katları biçiminde bir parçalanmaya yol açar. Bu parçalanma paterni, agaroz jel elektroforezinde merdiven biçiminde "ladder pattern" izlenir ve apoptoz için tipiktir (1, 4, 5, 7, 9). Agaroz jel elektroforez güvenilir sonuçlar veren kalitatif bir analiz yöntemidir (5, 30).

#### Western blotting

Western blotlama ya da immunoblotlama denilen yöntem, bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir yöntemdir. Bu metot istenilen bir proteine karşı yönlendirilen yüksek kalitede bir antikor kullanımına bağlıdır. Bu antikor prob olarak kullanılarak ilgili protein bir karışımın içinden saptanabilir. Western blot hücrede ne kadar protein biriktiğini gösterir (2).

Bu metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metotla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce

alt-fraksiyonlama yapılarak hücrenin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoz gittikleri anlaşılır (39).

#### Flow sitometri

Flow sitometre lazer kaynaklı florometre ile parçacık ışık yayılımı analizi bileşiminden oluşur. Flow sitometrede farklı moleküller, hücreler ve parçacıklar, düşük ve dik açılı ışık yayılımı kullanılarak büyüklük ve şekil olarak ayrılabilir. Bu hücreler, moleküller veya parçacıklar 13-phycoerithrin, FITC ve rhodamine-GG gibi farklı özel floresan işaretleyicilerle veya boya işaretli antikorlarla işaretlenebilir (1).

Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır.

Apoptoz flow sitometri uygulamasında iki şekilde belirlenir.

- Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- Anneksin V kullanılarak (15, 23, 33, 36).

#### ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

ELISA testi, viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonların tanısında ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan, serolojik tanı yöntemlerinden biridir. ELISA yönteminde, antijen-antikor kompleksine bir enzimle işaretli antiglobulinin ilave edilmesi ve sonra substratın eklenmesi ile eğer antijen veya antikor var ise renk oluşumunun gözlenmesi esasına dayanmaktadır. Duyarlı spesifik ve çabuk sonuç veren bir testtir.

Apoptozda görülen ilk olay, sitoplazma içine nükleozomların salınmasını takip eden DNA fragmentasyonudur (28). ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında, gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (23, 36).

ELISA analizinde, ELISA pleytlerindeki sitoplazmik nükleozomları belirlemek ve yakalamak için iki nükleozomal epitopa spesifik bir çift monoklonal antikor kullanılır. Bu analiz yöntemi agaroz jel elektroforez ile apoptotik DNA merdiveninin belirlenmesinden yaklaşık 500 kat daha fazla duyarlı ve çok sayıda örneğin test edilmesi açısından daha uygundur (28).

### SONUÇ

Apoptozun pek çok fizyolojik ve patofizyolojik süreçte önemli görevler üstlendiği açıktır. Histolojik olarak, apoptotik indeksle apoptotik hücre sayısının yaşayabilir hücrelere oranı bulunmaktadır ve bu indeks, apoptozun şiddetini ya da oranını belirtmektedir.

### KAYNAKLAR

- Aral H (1996): Apoptotik hücrelerin tanıma yöntemleri. Sendrom, 38-42.
- Bardakçı F, Yenidünya A F (2007): Moleküler biyoloji teknikleri 1:Nükleik asit analiz teknikleri (in) Moleküler

Biyoloji. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), 519-553, Nobel Yayın, Ankara.

- Bellamy C O, Malcomson, R D, Harrison, D J, Wyllie A H (1995): Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. Cancer Biology, 6: 3-16.
- Bortner C D, Oldenburg N B, Cidlowski J A (1995): The role of DNA fragmentation in apoptosis. Trends Cell Biol., 5: 21-6.
- Bossù P (2007): Qualitative analysis of dna fragmentation by agarose gel electrophoresis. Erişim: [http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/chap4.htm] Erişim Tarihi: 05.11.2007.
- Bratton D L, Fadok V A, Richter D A, Kailey J M, Guthrie L A, Henson P M (1997): Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. J. Biol. Chem., 272: 26159-26165.
- Carson D A, Rbiero J M (1993): Apoptosis and disease. The Lancet, 341: 1251-1254.
- Caulin C, Salvesen G S, Oshima R G (1997): Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. The Journal of Cell Biology, 138(6): 1379-1394.
- Cohen J J (1993): Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. American College of Physicians, CHEST, 103: 99-101.
- Cummings M C, Winterfold C M, Walker N I (1997): Apoptosis. Am. J. Surg. Pathol., 21: 88-101.
- Elmore S (2007) Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol. Pathol., 35(4): 495-516.
- Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'asta V, Gazzola G C (1998): Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. J. Histochem. Cytochem., 46: 895-900.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol., 119: 493-501.
- Grieken N C T, Meijer G A, Hausen A, Meuwissen S G M, Baak J P A, Kuipers E J (2003): Increased apoptosis in gastric mucosa adjacent to intestinal metaplasia. J. Clin. Pathol., 56: 358-362.
- Kockx M M, Muhring J, Knaapen M W M, de Meyer G R Y (1998): RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. Am. J. Pathol., 152: 885.
- Kopman G, Reutelingsperger C P, Kuijten G A, Keehnen R M, Pals S T, van Oers N H (1994): Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood., 84: 1415-1420.
- Kressel M, Groscurth P (1994): Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. Cell Tissue Res., 278: 549-56.
- Leers M P, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers F C, Bjorklund B, Nap M, Jorvall H, Schutte B (1999): Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. J. Pathol., 187: 567-572.
- Majno G, Joris I (1995): Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. Am. J. Pathol., 146: 3-15.
- Mak T (2003): The E. Donnall Thomas Lecture-apoptosis: "tis death that makes life live". Biol. Blood Marrow Transplant, 9: 483-8.
- Morrone S (2007): Annexin V. Purdue Cytometry CD-ROM Series, volume 4 Erişim: [http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/chap16.htm] Erişim Tarihi: 02.12.2007.
- Mountz J D, Zhou T (2001): Apoptosis and autoimmunity (in) A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions. WJ Kopman (Editör), Lippincott-Williams&Wilkins.
- Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermees I, Reutelingsperger C, Hanen C. (1998): Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. Apoptosis, 3: 115.

24. Öñiz H (2004): Apoptoz: Ölmeye yatmak. SSK Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi, 14(1).
25. Palazzo I G, Lega A, Farinha G S, Berrotarán N, Ortiz S (2005): Infrecuente neoplasia de utero: linfoma primario, presentacion de un caso. Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomia Patologica.
26. Pınarbaşı E (2007): Apoptozis (Programlı Hücre Ölümü) (in) Moleküler Biyoloji. A Yıldırım, F Bardakçı, M Karataş, B Tanyolaç (Editör), 423-468, Nobel Yayın, Ankara.
27. Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature., 391: 96-9.
28. Salgame P, Varadhachary A S, Primiano L L, Fincke J E, Muller S, Monestier M (1997): An ELISA for detection of apoptosis. Nucleic Acids Research, 25(3): 680-681.
29. Schwartzman R A, Cidloski J A (1993): Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. Endocrine Reviews, 14: 133-144.
30. Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaiissi A, Lemesre J L (2001): Antimonial-mediated dna fragmentation in leishmania infantum amastigotes. Antimicrob Agents Chemother, 45(7): 2064-2069.
31. Spector D L, Goldman R D, Leinwand L A (1998): Culture and Biochemical Analysis of Cells (in) Cells: A Laboratory Manual. DL Spector (Editör), 15.1-15.24, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
32. Squier M K, Miller A C, Malkinson A M, Cohen J J (1994): Calpain activation in apoptosis. J. Cell Physiol., 159(2): 229-237.
33. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C (1998): Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. Mol. Hum. Reprod., 4: 757.
34. Thompson C B (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 267: 1456-1462.
35. Trump B F, Berezsky I K, Chang S H, Phelps P C (1997): The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. Toxicol. Pathol., 25: 82-8.
36. Ulukaya E (2003): Apoptozis Ders Notları. Erişim: [http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisdersnotu.pdf] Erişim tarihi: 04.05.2007.
37. Vaux D L, Flavell R A (2000): Apoptosis genes and autoimmunity. Curr. Opin. Immunol., 12: 719-724.
38. Vitale M, Zauli G, Falcieri E (2007): *Apoptosis and necrosis*. Purdue Cytometry CD-ROM Series, volume 4, Erişim: [http://www.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/cytotech/apopto/data/chap10.htm] Erişim Tarihi: 02.11.2007.
39. Yılmaz İ (2005): Erişkin ratlarda deneysel varikosel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
40. Zhang G, Gurtu V, Kain S R, Yan G (1997): Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. Biotechniques, 23: 525-531.