



## Apoptotik Hücre Ölümü ve Toksikolojik Yanıtta Önemi

Dilek Güvenç<sup>1</sup> Tolga Güvenç<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

<sup>2</sup> Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye

### Özet

**Öz bilgi/Amaç:** Çok hücreli organizmalarda hastalıkların önlenmesi için doku ve organlarda uygun hücre sayısının devam ettirilmesi zorunludur. Hücre sayısındaki denge yeni hücre oluşumu ve sabit bir ölüm hızıyla sağlanır. Tüm memeli dokularında bu hassas dengenin devam ettirilmesinde hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptozun rolü büyüktür. Apoptoz, normal hücre döngüsü, bağışıklık sisteminin düzgün gelişimi ve işleyişi, hormona bağımlı atrofi, embriyonik gelişme ve kimyasal kaynaklı hücre ölümü gibi çeşitli işlemlerin hayati bir bileşeni olarak kabul edilir. Çeşitli ksenobiyotik kimyasallar, radyasyon ve toksinlerin neden olduğu akut ve kronik toksisite sonucu oluşan apoptotik sürece bağılı olarak nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün bozukluklar ve birçok kanser türü meydana gelebilmektedir. Bu derlemede apoptotik hücre ölümünün özellikle çeşitli çevresel kirleticiler ve kimyasalların neden olduğu toksikolojik yanıt açısından rolü değerlendirilmiştir.

**Sonuç:** Hücre ölümü ve hücre ölüm mekanizmaları toksikolojik değerlendirmelerde odaklanılması gereken önemli unsurlardan biridir.

*Anahtar Kelimeler:* Apoptoz, hücre ölümü, toksikoloji

## Apoptotic Cell Death and Its Importance in Toxicological Response

### Abstract

**Background/Aim:** In multicellular organisms, it is necessary to be maintained adequate number of cells in tissues and organs to prevent diseases. The role of apoptosis, which is one of the cell death types, in the sustaining delicate balance in all mammalian tissues is important. Apoptosis is known to be a vital component of various processes such as normal cell cycle, appropriate development and functioning of the immune system, hormone dependent atrophy, embryonic development and chemically induced cell death. Acute and chronic toxicity that are occurred by a variety of xenobiotic chemicals, radiation and toxins, can cause neurodegenerative diseases, ischemic damage, autoimmune disorders and many types of cancer, which depend on apoptotic processes. In this review, the role of apoptotic cell death was evaluated in terms of toxicological responses caused by a variety of environmental pollutants and chemicals.

**Conclusion:** Cell death and cell death mechanisms are one of the most important elements to focus in toxicological assessment.

*Key Words:* Apoptosis, cell death, toxicology

Correspondence to: Dilek Güvenç, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye. Email:dguvenc@omu.edu.tr

## Giriş

Yunanca sonbaharda yaprakların dökülmesi anlamına gelen apoptoz terimi ilk olarak İskoçya Aberdeen Üniversitesi'nde işbirliği yapan üç patoloğ tarafından kullanılmıştır. Kontrolsüz ve pasif bir hücre ölüm tipi olan nekrozun aksine, apoptoz; aktif, kontrollü, morfolojik değişikliklerle ilerleyen çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullarla başlatılan ve engellenen programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmıştır (Kerr ve ark., 1972).

Çok hücreli organizmalarda hastalıkların önlenmesi için doku ve organlarda uygun hücre sayısının devam ettirilmesi zorunludur. Hücre sayısındaki denge yeni hücre oluşumu ve sabit bir ölüm hızıyla sağlanır (Elliott ve Ravichandran, 2010). Tüm memeli dokularında bu hassas dengeyin devam ettirilmesinde hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptozun rolü büyüktür.

Programlanmış hücre ölümünün başlıca buluşları bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'da belirlenmiş olmasına rağmen benzer mekanizma ve genler memelilerde de tespit edilmiştir. Bu durum apoptozisin evrim sürecinde korunduğunu göstermektedir (Horvitz, 2003). Apoptotik hücre ölümü, hücrenin kendisinde aktif süreçlerin başlatılması sonucu ortaya çıktığından, hücresel intihar biçiminde tanımlanmıştır. Ölümde olan hücre, hem yapısal hem biyokimyasal hızlı değişikliklere uğrar. Morfolojik olarak hücre komşu hücrelerden uzaklaşır, yuvarlak hale gelir, psödopodları geri çekilir, kromatin yoğunlaşır, çekirdek ayrılması meydana gelir. Sitoplazmik organellerde küçük modifikasyonlar oluşurken plazma membranında kabarcıklar şekillenir. Hücre, zarla çevrili tomurcuklar halinde kopar (apoptotik cisim), komşu hücreler veya makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (Kerr ve ark., 1972).

Günümüzde apoptozu karakterize eden morfolojik değişikliklere aracılık eden ve bunlara eşlik eden moleküler değişiklikler belirlenmiştir. Bu işlemlerin çoğu, spesifik hücre içi substratların proteolitik bölünmesiyle başlatılır. Sonuç olarak apoptotik süreci ve hücrelerin ortadan kaldırılmasını kolaylaştırmak için yapısal ve sinyal değişiklikleri şekillenir. Apoptozun başlangıcında, normalde plazma membranının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserinin plazma membranının dış yüzeyine çıkması gözlenir. Deneysel olarak, bu olay apoptoz için önemli bir erken belirteç olarak kullanılırken *in-vivo* ortamda ise fagositoz için ölmekte olan hücreleri tanımlayan ve hedefleyen bir 'bul-beni' sinyali olarak kullanılmaktadır (Andersen ve Rathmell, 2015).

## Apoptozun Temel Unsurları

### Kaspazlar

Çoğu toksik stres, sistein proteaz ailesine ait olan kaspazlar (cysteine-dependent aspartate-directed proteases) adı verilen enzimlerin aktivasyonu ile hücreleri öldürürler. Kaspaz enzimleri, 1990'ların başında *C. elegans*'da belirlenen CED-3 geninin memeli homologu olup, hücre ölüm yolağının ana regülatörü olarak görev alırlar (Yuan ve Horvitz, 1990). Hücrede inaktif olan kaspazlar proteolitik olarak birbirlerini aktiveleştirirler ve hedef proteinleri keserek apoptoza neden olurlar. Kaspazlar apoptoz sırasında çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşmasından sorumludurlar. Genellikle başlatıcı (kaspaz-2, -8, -9, -10) ve efektör (kaspaz-3, -6 ve -7) kaspazlar olarak iki gruba ayrılırlar. Farklı başlatıcı pro-kaspazlar farklı yollarla aktive edilir. Örneğin, pro-kaspaz-9, sitotoksik uyarılar tarafından indüklenen mitokondriya aracılı apoptozda yer alırken, pro-kaspaz-8, ölüm reseptörü aktivasyonu sırasında görev yapar (Hengartner, 2000; Nicholson, 1999; Orrenius, 2004).

## Mitokondri ve Bcl-2 protein Ailesi

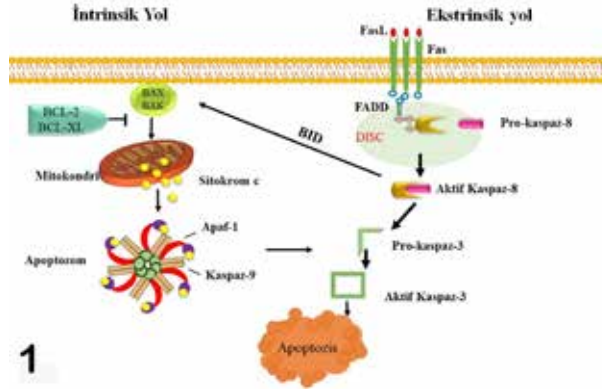
Mitokondri apoptotik sinyallerin iletilmesinde önemli bir organeldir. Apoptoz sırasında dış mitokondrial zar sitokrom c de dahil intermembran proteinlerine geçirgen hale gelir. Toksinlerden radyasyona bağlı DNA hasarına kadar değişen ölüm uyarıları, mitokondriyal intermembran boşluktan sitokrom c'nin salınmasını tetiklemek için mitokondriye iletilir. Genel olarak apoptozun ana karar noktası olarak görülen sitokrom c'nin salınması, mitokondriya yüzeyinde bulunan Bcl-2 familyası üyeleri Bax ve Bak'ın aktivasyonunu içeren mitokondriyal dış membran permeabilizasyonu (MOMP) olarak bilinen bir süreç ile gerçekleşir. Serbest kalan sitokrom c prokaspaz-9' u apoptozom kompleksi oluşturmak üzere aktif hale getirir. Apoptozom sitokrom c, apoptotik proteaz aktive eden faktör -1 (Apaf-1) ve ATP'nin katılmasıyla oluşan çoklu protein kompleksidir. Ardından efektör kaspazların aktivasyonu ile apoptotik süreç tamamlanır. Mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunun regülasyonu proapoptotik ve antiapoptotik iki alt gruptan oluşan Bcl-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir. Hücrenin kaderi bu alt gruplar arasındaki dengeye bağlıdır. Anti-apoptotik üyeler, MOMP'yi önleyen Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 ve Bcl-W'den oluşur. Bunlar özellikle Ca olmak üzere iyon transportunu düzenlerler. Proapoptotik üyeler ise Bax, Bak, Bid, Bim, Bad, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler ise sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını artırarak apoptozu indüklerler (Andersen ve Kornbluth, 2013; Danial ve Korsmeyer, 2004; Kroemer ve ark., 2007; Orrenius ve ark., 2015)

## Ekstrinsik ve İntrinsik Apoptozis

Apoptotik hücre ölümü ekstrinsik (ölüm reseptörü yolu) ve intrinsik (mitokondriyal yol) olmak üzere iki farklı sinyal yolu ile başlatılabilir. Her iki sinyal yolunun kaspaz aktivasyonu ve oligamerizasyon gibi pek çok ortak özelliği vardır. Ekstrinsik yol, plazma zarındaki tümör nekroz ailesinin (TNF) ölüm reseptörleri tarafından aktiflenir, doku homeostazında ve inflamatuvar yanıtta önemli rolü vardır. Ölüm reseptörlerine (Fas, DR5, TNFR) ligandlarının (Apo1L, CD95L, TRAIL, FasL, TNF-alfa) bağlanmasıyla reseptörler trimerik hale dönüştürülür ve prokaspaz-8 ve FADD (Fas-activated protein with death domain) gibi adaptör proteinlerin eklenmesiyle de DISC (death-inducing signaling complex) adı verilen yapı oluşturulur. Bu aşamadan sonra aktif hale gelen kaspaz-8 ya doğrudan ya da Bid'i keserek kaspaz 9 üzerinden dolaylı olarak intrinsik mekanizmada kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktiflenen kaspaz-3, kaspaz aktive edici DNaz (CAD) aktivasyonu ile DNA'nın alt birimlerine fragmente olmasına neden olur (Curtin ve Cotter, 2003; Roy ve Nicholson, 2000) İntrinsik yolda ise, özellikle genotoksik ve endoplazmik retikulum stresi gibi bazı stres faktörleri proapoptotik proteinlerden Bid'i keserek Bax ve Bak'ın aktiveleşmesine ve MOMP'a neden olur. Böylece mitokondriya membran porlarından sitokrom-c'nin sitosole salınmasına neden olur. Sitokrom-c, Apaf-1 ve procaspase-9 birleşerek apoptozom kompleksini oluştururlar. Aktif kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive ederek diğer kaspaz şalesinin tetiklenmesini sağlar (Riedl ve Salvesen, 2007; Youle ve Strasser, 2008). (Şekil 1)

Ekstrinsik apoptoz organizma tarafından yönetilirken, intrinsik yol stres tepki olarak aktiveleştirilir. İntrinsik yolu aktiveleştirilen stres faktörleri arasında DNA hasarı, hücre içi iyon konsantrasyonunun değişmesi, endoplazmik retikulum stresi gibi çok çeşitli intraselüler (dolayısıyla 'intrinsik') stres faktörü bulunmaktadır. Bu nedenle intrinsik apoptoz, mutlaka ölüm reseptörlerinin aktivasyonunu gerektirmeyen ve tetraklorodibenzo-p-dioksin, çeşitli ağır metaller, ditiyokarbamatlar ve bakteriyel toksinler

gibi toksinler tarafından *in-vitro* olarak uyarılan hücre ölümü şeklindedir (Andersen ve Rathmell, 2015).



Şekil 1. Kaspaz şelalesinin başlıca yolları.

Figure 1. The major pathways to caspase cascade.

### Toksikolojide Apoptoz

Çeşitli ksenobiyotik kimyasallar, radyasyon ve toksinlerin neden olduğu akut ve kronik toksisite sonucu apoptozun lehine veya aleyhine işleyen süreç sonunda nörodejeneratif hastalıklar, iskemik hasar, otoimmün bozukluklar ve birçok kanser türü meydana gelebilmektedir (Corcoran ve ark., 1994; Elmore, 2007).

Kimyasal ajanlar ve toksinler hücre ölümüne neden olabilirler. Hücrelerin ne zaman ölmeye karar verdikleri ve bu kararı sağlayan sinyal ve stres türlerinin neler olduğu önemlidir. Hücrenin sağlıklı olarak canlılığını devam ettirebilmesi, içinde bulunduğu mikroçevre koşullarına bağlıdır. Hücre metabolizması, hormon üretimi ve hücre proliferasyonu gibi spesifik sinyalleri ve süreçleri başlatmada hücrelerin birbirleri ile temasları ve etkileşimleri önemli rol oynamaktadır. Hücrelerin oluşturduğu bu sinyaller sadece fonksiyonları değil aynı zamanda hücrenin hayatta kalmasını da kontrol eder. "Sosyal Kontrol" modeli olarak tanımlanan bu modele göre normal temas ve sinyallerinden kendilerini çıkaran hücreler ölüme mahkûmdur. Bu modele göre tüm hücrelerin hayatta kalmak için doğru yerde ve doğru zamanda olması gerekmektedir. Aynı zamanda hücre ölümünü teşvik eden sinyallerden daha çok canlılık sinyallerinin anahtar rol oynadığı vurgulanmıştır (Raff, 1992).

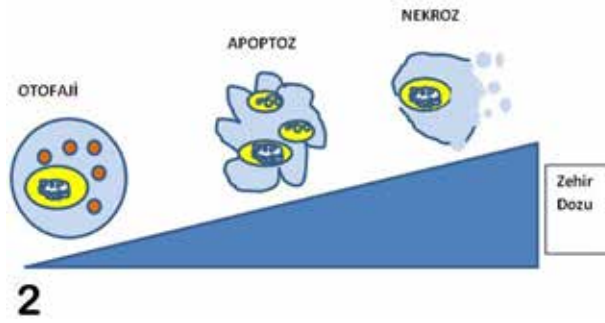
Bu sinyaller ve hücrenin ölüme karşı korunma mekanizmaları karmaşıktır. Hücre hayatta kalma sinyalleri çeşitli yollarla etki gösterebilir ve bunları kesmek için yapılacak herhangi bir işlem, hücre ölümüne neden olabilir. Hücrenin sağ kalımını muhafaza eden bazı direkt sinyal yolları olsa da, bazı sinyaller aynı zamanda hücreleri canlı tutmak için gerekli olan temel hücresel işlemleri ve fizyolojiyi desteklemek için de görev yapar (Rathmell ve ark., 2000). Bu sinyaller ortadan kaldırıldığında veya baskılandığında hücreler enerji veya temel hücresel fonksiyonlar için gerekli olan önemli metabolik yolları sürdürme yeteneklerini kaybederler ve ölüm süreci etkinleşir. Zehirler hayatta kalma sinyal mekanizmalarına veya diğer temel hücre fizyolojisi süreçlerine müdahale ederek bu tür ölümleri indükleyebilir. Aslında hücrelerin hasar ve stresle baş edebilme yetenekleri vardır. Ancak kimyasallar, zehirler ve ksenobiyotikler hücrede bulunan sağ kalım sinyallerine rağmen tamiri mümkün olmayan hasara yol açabilirler. DNA da tamiri mümkün olmayan hasar oluşabilir. Mitokondrinin veya temel metabolik süreçlerin hasar görmesi sonucunda enerji üretilmesi önlenir. Aynı şekilde açılmış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi temizlenemeyen agregant oluşumuna neden olabilir. Bu ve benzeri diğer koşullarda, hücre ölüm mekanizması genellikle hücrenin ortadan kaldırılması için harekete geçirilir (Andersen

ve Rathmell, 2015).

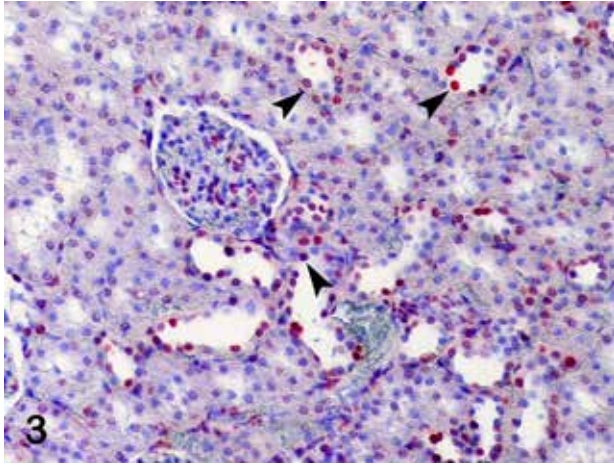
Toksinlerle indüklenen hücre ölümü genetik olarak kontrol edilir ve bir hücrenin ölmesi veya hayatta kalması gen ürünleri tarafından belirlenir. Bu gen ürünlerinin farklı düzeylerde eksprese edilmesi dokuların toksinlere duyarlılığını belirleyen önemli kriterdir. Hücre ölümüne neden olan stres faktörlerine karşı eşik değer hücrenin rolüne ve yenilenme hızına göre değişmektedir. Örneğin nöronlar hücre ölümüne oldukça dirençli iken lenfositler gibi hemotopoitik hücreler hücre stresine ve ölüm mekanizmalarına daha duyarlıdır. Sonuç olarak, yeni hücre oluşumu ve hücre ölümü arasındaki dengeleme ihtiyacı, hücrelölümüne bağlı ölüm eşikini büyük ölçüde etkileyecektir. Bu denge birçok zehirli patolojik etkisinde önemli rol oynamaktadır. Duyarlı hücreler üzerinde daha büyük bir etki oluşurken diğer hücreler zehirlere bağlı hasara ve ölüme karşı koyabilirler. Böylece yenilenmesi zor dokularda hücreler korunur. Ancak hayatta kalan hücrelerden bazıları zehirlerin uzun süreli etkilerinden kaynaklı hasar görebilir (Andersen ve Rathmell, 2015; Roberts ve ark., 1997).

Akut stresler apoptozis veya nekrozu tetiklerken birçok kalıcı stres, hücrede lipid, protein ve organeller de dahil stoplazmik bileşenlerin çift zarlı bir yapıya gizlendiği ve hücrenin kendini yemesi (self-eating) süreci olan ve otofaji olarak tanımlanan hücre ölüm şeklini harekete geçirir (Andersen ve Rathmell, 2015). Başlangıçta toksik hücre ölümünün nekrotik tip olduğu düşünülürken doza ve/veya hücre tipine bağlı olarak otofajik ve apoptotik farklı hücre ölüm tiplerine neden olabileceği açıktır (Şekil 2). Karbontetraklorür veya bromobenzen maruziyetine bağlı hepatositlerin ölümü bunun klasik bir örneğidir. Bromobenzenle indüklenen CYP450 aktivasyonu aracılı ve glutasyon tükenmesine bağlı hücre ölümü 1970'li yıllarda nekrotik hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir. Ancak ilerleyen yıllarda hasar veren ajanın daha düşük yoğunluklarında apoptozise neden olduğu gösterilmiştir (Orrenius ve Zhivotovsky, 2006; Wyllie, 1987). *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarla birçok kimyasal ajanın toksisitesini apoptoz aracılığı ile meydana getirdiği desteklenmiştir. Timosit ve lenfositlerde glukokortikoidlerle indüklenen apoptozis bu konudaki çalışmaların ilk örneklerindedir. Daha sonraları 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksinin timositlerde Ca aracılı endonükleaz aktivasyonu yoluyla apoptozis neden olduğu daha yüksek dozlarda ise *in vivo* timik atrofi oluşturduğu bildirilmiştir (McConkey ve ark., 1988). Yine benzer olarak, etoposid ve organokalay bileşikleri timositlerde (Gennari ve ark., 2000; Sun ve ark., 1994), sikloheksimid (Ledda-Columbano ve ark., 1992) ve thioasetamid (Ledda-Columbano ve ark., 1991) hepatositlerde apoptozis neden olmuştur. Testiküler hasar sonrasında germ hücrelerinin ortadan kaldırılmasında apoptotik yollarından Fas-sinyal yolağı önemli rol oynamaktadır. Sertoli hücrelerini hedef alan ve işlevlerini bozan 2,5-heksandiyon, mono-2-etilheksil fitalat gibi toksik maddelere veya radyasyona maruz kalma, hem Fas hem de FasL ekspresyonunu artırmıştır (Richburg, 2000). Veteriner hekimlik, zirai mücadele ve halk sağlığı alanlarında kullanımları yaygın olan pestisitlerin hedef dışı canlılarda akut veya kronik zehirliliklerinde apoptozisin de içinde olduğu hücre ölüm tiplerinin rolü önemlidir. *In vivo* bir çalışmada sentetik piretroit insektisitlerden olan permetrinin nefrotoksitesisi kaspaz-9 bağımlı apoptotik hücre ölümü ve doza bağlı olarak da nekrozla ilişkilendirilmiştir (Şekil 3). Bunun aksine dopaminerjik nöronlarda ise apoptotik hücrelere rastlanmadığı ekspresyonu artmış olan alfa-bazik kristallin ve ısı şoku proteini-70 gibi stres proteinlerinin apoptozis karşı koruyucu bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Güvenç ve ark., 2013a; 2013b). Benzer olarak piretroit insektisit siflutrin ratlara uygulandığında nöronlarda apoptotik hücre belirlenemezken

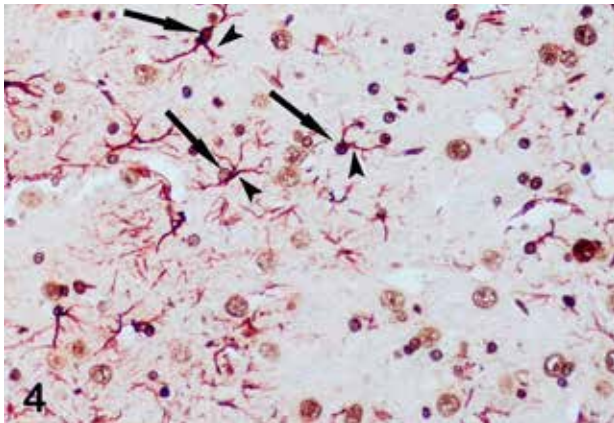
astrositlerde kaspaz-9 ve kaspaz-3 pozitif apoptotik hücreler gözlenmiştir (Şekil 4) (Guvenc ve ark., 2014).



Şekil 2. Doz ile hücre ölümü arasındaki ilişki.  
Figure 2. Relationship between dose and cell death.



Şekil 3. Böbrekte permetrin maruziyetine bağlı apoptotik tubulus epitel hücreleri (ok başları). TUNEL boyama, Mayer'in hematoksileni ile karşıt boyama, X240.  
Figure 3. Apoptotic tubul epithelium cells in kidney, related with exposure to permethrin (arrow heads), TUNEL staining, Mayer's hematoxylin counterstaining, X240.



Şekil 4. Astrositlerde apoptozis. TUNEL pozitif çekirdekler (oklar) ve GFAP pozitif astrositler (ok başları), TUNEL ve immunoperoxidaz ikili boyama, Mayer'in hematoksileni ile karşıt boyama, X240.  
Figure 4. Apoptosis in astrocytes. TUNEL positive nucleus (arrows) and GFAP positive astrocytes (arrow head), TUNEL and immunoperoxidase double staining, Mayer's hematoxylin counterstaining, X240.

HepG2 hücrelerindeki kadmiyum (Cd) ile indüklenen apoptotik sinyal yolu Fas upregülasyonu, kaspaz-8'e bağımlı Bid kesilmesi, mitokondrial membran permeabilizasyonu, sitokrom c salınımına bağlı olarak gerçekleşmiş ve N-asetil sistein uygulaması apoptozu engellemiştir (Oh ve Lim, 2006). Ayrıca Cd kaspaz-3 aktivasyonu ile kortikal nöron kültüründe (Lopez ve ark., 2003), mTOR (mammalian target of rapamycin) sinyal yolu üzerinde human neuroblastoma (SH-SY5Y) hücre hattında (Chen ve ark., 2011), direk kaspaz-3 ardından kaspaz-3 ve ERK1/2, p38 ve JNK MAPK'nın fosforilasyonu ile indirekt kaspaz-8 ve kaspaz-3 aktivasyonu ile insan kökenli osteoblast hücrelerinde (hFOB 1.19) (Brama ve ark., 2012), insan bronşial epitel hücrelerinde (16HBE) (Zhou ve ark., 2013) apoptozise neden olmuştur. Metaller (Ni, Cu, Zn, Pb, As ve Hg gibi) su ekosistemlerinde biyokümülyasyonla bu ortamda yaşayan canlılarda özellikle balıklarda apoptozu indükleyerek toksikasyona neden olmaktadır (Das ve ark., 2012; Hasan ve ark., 2010; Luzio ve ark., 2013; Omar ve ark., 2012; Wang ve ark., 2015; Zheng ve ark., 2014). Günümüzde endüstriyel gelişime paralel olarak ilaç sektörü gibi biyomedikal alanlarda kullanımı yaygınlaşan nanomateryaller hücre ölümüne neden olabilmektedirler. Solunum yolları için potansiyel tehlike arz eden çinkooksit (ZnO) nanopartikülleri konsantrasyona ve zamana bağlı olarak insan bronş epitel hücre hattı (BEAS-2B) ve insan alveolar adenokarsinom hücre hattında (A549) oksidatif strese neden olmuş, reaktif oksijen türlerini (ROS), hücre içi Ca düzeyini ve apoptozis ile ilgili genlerin ifadesini artırmıştır (Ahamed ve ark., 2011; Huang ve ark., 2010). Benzer olarak ZnO nanopartikülleri deri kökenli hücrelerde kısa süreli maruziyette yangı oluşturmaksızın apoptozise neden olurken, uzun süreli maruziyette ROS üretimini artırmış ve mitokondrial aktiviteyi azaltmıştır (Vandebriel ve De Jong, 2012). Çok sayıda *in vitro* çalışmada, bakteriyel ekzotoksinlerin patogenezi apoptoz ile ilişkilendirilmiştir. *Shigella dysenteriae'* nin shiga ekzotoksinleri Stx1 ve Stx2, hücre hatlarında apoptozu başlatan son derece güçlü toksinlerdir. Epitelial hücrelere Stx1 veya Stx2 uygulanması, Bax'ın ekspresyonunu artırarak Bid'i aktivelemiştir. Tersine, Bak'ın RNAi aracılı susturulması veya Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu, shiga toksinin neden olduğu apoptozu engellediği ve shiga toksinin, pro-ve anti-apoptotik Bcl-2 familyası proteinlerinin dengesini değiştirerek apoptozise neden olabileceği bildirilmiştir (Lee ve ark., 2009). Psödomonas ekzotoksin A (PE) da shiga toksinleri gibi konakçı hücre protein sentezini inhibe eder ve apoptozu indükler. PE'nin bir anti-apoptotik Bcl-2 familyası proteini olan Mcl-1'in degradasyonunu tetiklediğini ve bunun ardından Bak ve MOMP'nin aktivasyonuna neden olduğunu ortaya koymuştur (Du ve ark., 2010).

Yukarıda verilen örneklerde olduğu gibi toksik maddelerin direkt ya da indirekt yolla etkilediği çok sayıda yeni hedef moleküller bulunmakla birlikte birçoğu hücre içi Ca düzeyini ve/veya redoks dengesini etkilerler. Bu nedenle Ca ve ROS'lar kritik öneme sahiptir. Uzun zamandan beri Ca'un hücre içi yaşamsal fonksiyonları yönettiği ve hücre sağ kalımı için gerekli olduğu bilinmektedir. Hücrede Ca'un aşırı artışı veya dengenin bozulması sitoksisiteye yol açarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Hücre içi Ca homeostazında mitokondri aktif olarak rol alır (Carafoli, 2002; Orrenius ve ark., 2010). Apoptotik sinyallerin mitokondri aracılı ilerlemesiyle MOMP, mitokondrial proteinlerin serbest bırakılması ve subsellüler apoptotik olaylar dizisi gerçekleşir. MOMP pro-apoptotik Bcl-2 familyası proteinleri (özellikle Bax ve Bak) tarafından por oluşumu ve mitokondrial şişme sonucu membran yırtılması da dahil olmak üzere birkaç farklı mekanizma ile

oluşabilir. Ca aracılı sitotoksistide kalsiyuma bağlı protein kinazlar ve fosfatazlar, nitrik oksit sentazlar, endonükleazlar, transglutaminazlar, fosfolipazlar ve proteazlar da dahil olmak üzere birden fazla potansiyel hedef vardır ve genellikle çoklu sitotoksik mekanizma aktif hale gelir (Orrenius et al., 2010). Birçoğu mitokondriyal solunum ürünü olan ROS'lar nükleik asit, fosfolipit ve proteinler gibi hücrel makromolekülleri hasara uğratabilirler. Normal solunum esnasında tüketilen moleküler oksijenin yaklaşık % 1-2'si, ROS'ların çoğunun öncüsü olarak görülebilen süperoksit anyon radikallerine ( $O_2^-$ ) dönüştürülür (Cadenas ve Davies, 2000). ROS'lar için kritik bir hücrel hedef olan mitokondriyal DNA hasara uğradığında solunum ve enerji üretimi gibi hücrel yaşamsal faaliyetler etkilenir. Ayrıca oksidatif stresin potansiyel olarak zararlı bir etkisi de hücre ölümünün bazı modlarında kilit rol oynayan Ca-bağlı MOMP'un kolaylaştırılmasıdır (Orrenius ve ark., 2010). Sitozole geçişi ile apoptotik kaskadı başlatan sitokrom c, normalde anyonik fosfolipit olan kardiyolipin aracılığında mitokondri iç zarına bağlı halde bulunur. Kardiyolipin oksidasyonu sitokrom c'ye olan bağlanma afinitesini azaltır ve kardiyolipinin oksidatif modifikasyonu mitokondri iç zarından sitokrom c mobilizasyonunu kolaylaştırır (Ott ve ark., 2002).

Sonuç olarak, hücrelerin toksinlere maruz kalması temel hücrel işlemlerde değişiklikler meydana getirir. Hücrel stres sağkalım sinyallerini aştığında hücrenin ölüme doğru ilerleyen bir sürece girmesi kaçınılmazdır. Hücre ölümünün şekli, hücre türüne, stres türüne ve hasarın boyutuna bağlı olarak değişen karmaşık bir yapıdır. Hasar düşük olduğunda, hasar gören hücreler hızla temizlenebilirken, hasar aşırı olduğunda, nekroz ve hücre ölümü nihayetinde organ işlevi tehlikeye girecektir. Dokulardaki toksikolojik etkilerin karmaşıklığını değerlendirmek için bu dengenin anlaşılması kritik önem taşır. Bu nedenle toksikologlar, toksikokinetik, reseptör tanıma ve seçici moleküler lezyonlar gibi faktörleri hedeflemenin yanı sıra, dokuya özgü toksisiteyi incelerken bu hücre ölüm eşiklerinin doğasına da odaklanmalıdır.

## Kaynaklar

- Ahamed M, Akhtar MJ, Raja M, Ahmad I, Siddiqui MKJ, Alsalmi MS, Alokayan SA (2011). ZnO nanorod-induced apoptosis in human alveolar adenocarcinoma cells via p53, survivin and bax/bcl-2 pathways: role of oxidative stress. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(6), 904-913.
- Andersen JL, Kornbluth S (2013). The tangled circuitry of metabolism and apoptosis. *Molecular cell*, 49(3), 399-410.
- Andersen JL, Rathmell JC (2015). Cell Death Pathways in Toxicological Response. *Mammalian Toxicology*, 75-83.
- Brama M, Politi L, Santini P, Migliaccio S, Scandurra R (2012). Cadmium-induced apoptosis and necrosis in human osteoblasts: role of caspases and mitogen-activated protein kinases pathways. *Journal of endocrinological investigation*, 35(2), 198-208.
- Cadenas E, Davies KJ (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 222-230.
- Carafoli E (2002). Calcium signaling: a tale for all seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1115-1122.
- Chen L, Xu B, Liu L, Luo Y, Zhou H, Chen W, Shen T, Han X, Kontos CD, Huang S (2011). Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(5), 624-632.
- Corcoran GB, Fix L, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA, Buttyan R (1994). Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, 128(2), 169-181.
- Curtin JF, Cotter TG (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular signalling*, 15(11), 983-992.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
- Das S, Unni B, Bhattacharjee M, Wann SB, Rao PG (2012). Toxicological effects of arsenic exposure in a freshwater teleost fish, *Channa punctatus*. *African Journal of Biotechnology*, 11(19), 4447-4454.
- Du X, Youle RJ, Fitzgerald DJ, Pastan I (2010). Pseudomonas exotoxin A-mediated apoptosis is Bak dependent and preceded by the degradation of Mcl-1. *Molecular and cellular biology*, 30(14), 3444-3452.
- Elliott MR, Ravichandran KS (2010). Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *The Journal of cell biology*, 189(7), 1059-1070.
- Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Gennari A, Viviani B, Galli CL, Marinovich M, Pieters R, Corsini E (2000). Organotin induce apoptosis by disturbance of  $[Ca^{2+}]_i$  and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes. *Toxicology and applied pharmacology*, 169(2), 185-190.
- Guvenc D, Aksoy A, Gacar A, Atmaca E, Das KY, Guvenc T (2014). Evaluation of changes in monoamine levels and apoptosis induced by cyfluthrin in rats. *Toxicology Research*, 3(5), 331-340.
- Guvenc D, Kabak Y, Atmaca E, Aksoy A, Guvenc T (2013a). Examination of caspase-dependent apoptotic and necrotic changes in rat kidney exposed to different doses of permethrin. *Biotechnic & Histochemistry*, 88(2), 76-85.
- Guvenc D, Kabak YB, Atmaca E, Aksoy A, Guvenc T (2013b). Biological significance of the overexpression of HSP70 and alpha B-crystallin in rat substantia nigra exposed to different doses of permethrin. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 64(1), 47-55.
- Hasan M, Ahmed M, Akhand A, Ahsan N, Islam M (2010). Toxicological Effects and Molecular Changes Due to Mercury Toxicity in Freshwater Snakehead (*Channa punctatus* Bloch, 1973). *Int. J. Environ. Res*, 4(1), 91-98.
- Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770.
- Horvitz HR (2003). Nobel lecture: Worms, life and death. *Bioscience reports*, 23(5), 239-303.
- Huang C-C, Aronstam RS, Chen D-R, Huang Y-W (2010). Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicology in vitro*, 24(1), 45-55.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239.
- Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 87(1), 99-163.
- Ledda-Columbano G, Coni P, Curto M, Giacomini L, Faa G, Oliverio S, Piacentini M, Columbano A (1991). Induction of two different modes of cell death, apoptosis and necrosis, in rat liver after a single dose of thioacetamide. *The American journal of pathology*, 139(5), 1099.
- Ledda-Columbano G, Coni P, Faa G, Manenti G, Columbano A (1992). Rapid induction of apoptosis in rat liver by cycloheximide. *The American journal of pathology*, 140(3), 545.
- Lee M-S, Cherla RP, Leyva-Illades D, Tesh VL (2009). Bcl-2 regulates the onset of Shiga toxin 1-induced apoptosis in THP-1 cells. *Infection and immunity*, 77(12), 5233-5244.
- Lopez E, Figueroa S, Oset-Gasque M, Gonzalez M (2003). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced by cadmium in cortical neurons in culture. *British journal of pharmacology*, 138(5), 901-911.
- Luzio A, Monteiro SM, Fontainhas-Fernandes AA, Pinto-Carnide O, Matos M, Coimbra AM (2013). Copper induced upregulation of apoptosis related genes in zebrafish (*Danio rerio*) gill. *Aquatic toxicology*, 128, 183-189.
- McConkey DJ, Hartzell P, Duddy SK, Hakansson H, Orrenius S (1988). 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin kills immature thymocytes by  $Ca^{2+}$ -mediated endonuclease activation. *Science*, 242(4876), 256.
- Nicholson D (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation*, 6(11), 1028-1042.

- Oh S-H, Lim S-C (2006). A rapid and transient ROS generation by cadmium triggers apoptosis via caspase-dependent pathway in HepG2 cells and this is inhibited through N-acetylcysteine-mediated catalase upregulation. *Toxicology and applied pharmacology*, 212(3), 212-223.
- Omar WA, Zaghloul KH, Abdel-Khalek AA, Abo-Hegab S (2012). Genotoxic effects of metal pollution in two fish species, *Oreochromis niloticus* and *Mugil cephalus*, from highly degraded aquatic habitats. *Mutation Research/Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 746(1), 7-14.
- Orrenius S (2004). Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicology letters*, 149(1), 19-23.
- Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2015). Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 460(1), 72-81.
- Orrenius S, Nicotera P, Zhivotovsky B (2010). Cell death mechanisms and their implications in toxicology. *Toxicological Sciences*, 119(1), 3-19.
- Orrenius S, Zhivotovsky B (2006). The Future of Toxicology Does It Matter How Cells Die? *Chemical research in toxicology*, 19(6), 729-733.
- Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(3), 1259-1263.
- Raff MC (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 356(6368), 397.
- Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB (2000). In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Molecular cell*, 6(3), 683-692.
- Richburg JH (2000). The relevance of spontaneous-and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicology letters*, 112, 79-86.
- Riedl SJ, Salvesen GS (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(5), 405.
- Roberts RA, Nebert DW, Hickman JA, Richburg JH, Goldsworthy TL (1997). Perturbation of the mitosis/apoptosis balance: a fundamental mechanism in toxicology. *Toxicological Sciences*, 38(2), 107-115.
- Roy S, Nicholson DW (2000). Cross-talk in cell death signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 192(8), F21-F26.
- Sun X-M, Carthew P, Dinsdale D, Snowden RT, Cohen GM (1994). The involvement of apoptosis in etoposide-induced thymic atrophy. *Toxicology and applied pharmacology*, 128(1), 78-85.
- Vandebriel RJ, De Jong WH (2012). A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnology, science and applications*, 5, 61.
- Wang B, Feng L, Jiang W-D, Wu P, Kuang S-Y, Jiang J, Tang L, Tang W-N, Zhang Y-A, Liu Y (2015). Copper-induced tight junction mRNA expression changes, apoptosis and antioxidant responses via NF- $\kappa$ B, TOR and Nrf2 signaling molecules in the gills of fish: preventive role of arginine. *Aquatic toxicology*, 158, 125-137.
- Wyllie A. (1987). Apoptosis: cell death under homeostatic control *Mechanisms and Models in Toxicology* (pp. 3-10): Springer.
- Youle RJ, Strasser A (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(1), 47.
- Yuan J, Horvitz HR (1990). The *Caenorhabditis elegans* genes *ced-3* and *ced-4* act cell autonomously to cause programmed cell death. *Developmental biology*, 138(1), 33-41.
- Zheng G-H, Liu C-M, Sun J-M, Feng Z-J, Cheng C (2014). Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway. *Aquatic toxicology*, 147, 105-111.
- Zhou Z, Wang C, Liu H, Huang Q, Wang M, Lei Y (2013). Cadmium induced cell apoptosis, DNA damage, decreased DNA repair capacity, and genomic instability during malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *International journal of medical sciences*, 10(11), 1485.