

PATOLOJİK APOPTOZİS VE TANI YÖNTEMLERİ

Güngör Çağdaş DİNÇEL¹, Oguz KUL²

ÖZET

İlk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 de tanımlanan apoptozis, biyolojik görevlerini tamamlamış yapısal elemanları ya da DNA'sı hasar görmüş hücrelerin, ilişkili olduğu doku ve hücelere zarar vermeyecek bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan, genlerle kontrol altında tutulan ve gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyan programlı hücre ölümüdür. Apoptozisi fizyolojik olarak yaşamın her dönemimde görebiliriz. Patolojik apoptozis ise otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklar, kanser, kalp hastalıkları ve viral enfeksiyonlar gibi birçok hastalığın patogenezinde yakından ilişkilidir. Apoptozis emri alan bir hücrede kromatin yoğunlaşması görülür ve hücrenin boyutları küçülmeye başlar. Daha sonra apoptotik cisimciklere ayrılırlar. Bu apoptotik cisimcikler yüzeylerinde yeni reseptörlerle birlikte yakındaki fagositik sistem hücrelerini çağırarak fagotositoz ile uzaklaştırılır. Apoptozisin inhibisyonu/aktivasyonu tedavi için gen ürünleri ise tanı için potansiyel hedeflerdir. Bu makale; apoptozisin morfolojik özelliklerini ve nekrozdan farklarını, genetik düzenlenmesini, tanı yöntemlerini ve özellikle hastalıklardaki yakın ilişkisini içeren son literatür bilgileri gözden geçirilerek tartışılmış bir derlemedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Patogenezis, Hastalıklar

¹Yrd. Doç. Dr Gümüşhane Üniversitesi Şiran Mustafa Beyaz MYO, Laborant ve Veteriner Sağlık Programı

²Prof. Dr Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

İletişim / Corresponding Author: Güngör Çağdaş DİNÇEL

Tel: 5322897255, **E-posta:** gcdincel@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received: 18.06.2015

Kabul Tarihi / Accepted: 22.10.2015

PATHOLOGIC APOPTOSIS AND DIAGNOSTIC METHODS

ABSTRACT

First defined by Kerr et al. in 1972, the apoptosis is the programmed cell death which is kept under control by genes and needs energy to occur, allowing structural elements with completed biological duties or cells with damaged DNA to be removed without damaging the associated tissue and cells. Apoptosis can be seen physiologically in all stages of life. Pathological apoptosis is closely related in the pathogenesis many diseases, including autoimmune and neurodegenerative diseases, cancer, heart diseases and viral infections. Chromatin condensation is observed and the size of cell becomes smaller in a cell that receives the apoptosis order. Then they are fragmented into apoptotic bodies. These apoptotic bodies are removed by phagocytosis by calling nearby phagocytic system cells together with new receptors on their surfaces. Inhibition/activation of apoptosis and gene products are potential targets for treatment and diagnosis, respectively. This article is a compilation that discusses morphologic characteristics of apoptosis, its differences from necrosis, genetic regulation, diagnosis methods and close association with diseases by reviewing the latest literature.

Key Words: Apoptosis, Pathogenesis, Diseases

GİRİŞ

Apoptozis biyolojik görevlerini tamamlamış yapısal elemanları ya da DNA'sı hasar görmüş hücrelerin, ilişkili olduğu doku ve hücrelere zarar vermeyecek bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan, genlerle kontrol altında tutulan ve gerçekleşmesi için enerjiye ihtiyaç duyan programlı hücre ölümüdür. Embriyonik dönemden başlayarak tüm yaşam boyunca deri, gastrointestinal ve immün sistem gibi pek çok sisteme ait dokuların devamlılığı mitoz, hücre ölümü ve apoptozis arasındaki denge ile sağlanmaktadır. Organizmada, yaşam boyunca değişen derecelerde dejenerasyon ve nekroz şekillenir. Buna rağmen organ büyüklükleri açısından bakıldığında karaciğerin büyüklüğü sürekli sabit tutulur. İşte bu denge, apoptozis ve mitoz arasındaki hassas ilişki ile sağlanır (1-3).

Apoptozis de kendi içerisinde bir denge halindedir. Artması durumunda nörodejeneratif hastalıklara, azalması durumunda ise kanser ve fazla otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılamaması sonucu otoimmün hastalıklara yol açabilmektedir (3,4).

Apoptozisi hem fizyolojik hem de patolojik olarak yaşamın her döneminde görebiliriz. Anne karnındaki yavrunun gelişim aşamaları sırasında ayak ve el parmakları başlarda birleşiktir. Zamanla aralardaki hücrelerin apoptozise uğrayarak yıkımlanması ile parmakların birbirinden ayrılmasında, yaşlılığa bağlı olarak gelişen organ atrofileri ve laktasyon sonrası meme bezi gerilemelerinde ve proliferasyona uğrayan hücre topluluklarında fizyolojik bir süreç olarak düşünülür. Patolojik olarak ise; parankimatöz organlarda kanal tıkanmaları sonucu gelişen atrofi, radyasyon, kemoterapi ve hipoksi aracılığı ile oluşan hücre ölümleri, insulin bağımlı diabetes mellitus, sığırların respiratorik sinsityal virus enfeksiyonunda epitel hücre ölümleri, iskemik hasarlarda (Miyokard İnfarktüsü) patolojik olarak apoptozis şekillenmektedir (1,3,5,6).

I. TARİHÇE VE TERMİNOLOJİ

Hücrelerde görülen ölümlerle ilgili olarak ilk çalışmalar, 1920 yıllarında yeni histolojik boyama yöntemlerinin yaygın kullanımıyla birlikte başlamış ve bu alanda ilk bilgiler hücre dejenerasyonu ve nekroz konularında elde edilmiştir. Omurgalı ve omurgasızlardaki hücre ölümü, 1951'de Gluchsmann, 1966'da Gaunders tarafından tanımlanmıştır. 1965 yılında Edinburg Üniversitesi'nden Kerr, portal venin büyük bir kolunun ligatüre edilmesinden sonra karaciğer hücrelerinde değişik ölüm tiplerini tanımlamıştır. 1972 yılında yine Kerr, Wyllie ve Currie adındaki 3 İskoçyalı patolog Yunanca'da *apo*: ayrı, *ptosis*: düşen anlamlarına gelen ve

sonbaharda ağaç yapraklarının gövdeden ayrılmasına benzetilerek tanımlanan apoptozis terimini kullanmışlardır (7-9).

Wyllie deneysel apoptozisi, olgunlaşmamış T lenfositleri glukokortikoidlere maruz bırakarak göstermiş, Deke ve ark. ise; jel elektroforezi ile apoptoziste endonükleazların aktive olmaları sonucu DNA kırıklarının meydana geldiği göstermişlerdir (8,10).

Raffray ve Cohen, 1993 yılında, timüs hücreleri ile yapmış olduğu çalışmada yüksek dozlarda kullanılan steroidlerin bu hücrelerdeki etkilerini araştırmış ve timositlerin bu etki ile direkt apoptozise uğramak yerine, hücre ölümüne neden olan genleri aktive ederek hücreleri apoptozise yönlendirdiğini açıklamışlardır. Bu çalışmayla da apoptozisin genlerle kontrol edildiği anlaşılmıştır (11).

II. PATOLOJİK APOPTOZİS

Gerek hormonlara bağlı gerekse de kanal tıkanmasından sonra patolojik atrofiler görülebilir. Kastrasyon sonrası görülen prostat atrofisi ve glukokortikoid uygulamalarından sonra gözlemlenen timusta lenfosit kaybı hormonlara bağlı şekillenirken (12,13), parankimden zengin dokularda görülen atrofi ise genellikle kanal tıkanmasından sonra şekillenir (14). Otoimmün hastalıklardaki sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü (15), ultraviyole, kanser ilaçları, hipoksi, travma gibi çeşitli etkenlerle de oluşan hücre ölümünde patolojik apoptozis karşımıza çıkar (14).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda apoptozisin kanser, otoimmün bozukluklar, nörodejeneratif hastalıklar ve viral enfeksiyonlar gibi birçok hastalığın patogenezinde önemli rol oynadığı gerek deneysel gerekse de klinik çalışmalarla gösterildi (Tablo 1) (16,17).

Tablo 1: Hastalıklarda Apoptozisin Rolü (18,19)

HASTALIKLARDA APOPTOZİSİN ROLÜ	
APOPTOZUN ARTMASI	APOPTOZUN AZALMASI
Nörodejenaratif bozukluklar	Kanser
Creutzfeld-Jakob hastalığı	Blastom
Spinal muskular atrofi	Karsinom
Alzheimer hastalığı	Lösemi
Parkinson hastalığı	Seminom
Retinitis pigmentosa	Malign gliom
Huntington hastalığı	Sarkom
Amyotrofik lateral skleroz	Premalign hastalıklar
Hematolojik bozukluklar	Ataxia telangiectasia
Aplastik anemi	Xeroderma pigmentosum
Fanconi anemisi	Paroksimal nokturnal hemoglobinüri
Hodgkin hastalığı	Myelodisplastik sendromlar
Myelodisplastik sendromlar	Otoimmün bozukluklar
Polycythemia vera	Otoimmün lemfoproliferatif sendrom (tip I, II)
Otoimmün bozukluklar	Sistemik lupus erythematosus
Graft-versus-host hastalığı	Ateroskleroz
Fulminant hepatit	Metabolik bozukluklar
Hashimoto tiroiditis	Niemann-Pick hastalığı
İnsüline bağımlı diyabet	Osteoporozis
Skleroderma	Wilson hastalığı
Sjögren sendromu	Viral enfeksiyonlar
Multipli skleroz	Adenoviruses
Romatoid artrit	Baculoviruses
İskemik yaralanmalar	Epstein-Barr Virus
Miyokardial enfarktüs	Poxviruses
Böbrek enfarktüsü	Herpesviruses
İskemi ve reperfüzyon	Prematür ve fizyolojik yalanmada apoptoz
Felç	Down sendromu
Toksinlere bağlı hastalıklar	Erken yalanma (Progeria)
Pulmonar fibrozis	Xeroderma pigmentosum
Sepsis	
Alkole bağlı hepatit	
Bakteriyal ve viral enfeksiyonlar	
AIDS	
Salmonella typhimurium	
Neisseria meningitis	
Shigella flexneri	
Chlamydia trachomatis	
Ebola virüsü	
Helicobacter pylori	
Diğerleri	
Tümör karşı-atağı (immün ayrıcalık)	
Travmatik spinal kord yaralanması	

¹⁸Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B.¹⁹Tomatır AG.

III. APOPTOZİSTE GÖREV ALAN BAŞLICA MEDIATÖRLER VE ETKİ MEKANİZMALARI

Apoptozisin oluşum mekanizması incelendiğinde çok çeşitli ve sayıca fazla mediatörler tarafından kontrol edildiği görülür. Bu mediatörler arasında başlıca iyon (kalsiyum), molekül (seramid), gen (c-myc, p53), enzim (Kaspaz) ve hatta organeller (endoplazmik retikulum ve mitokondri) bulunmaktadır (3,20).

Kalsiyum iyonunun; endonükleaz, doku transglutaminaz ve bazı proteazların aktivasyonunda önemli görevleri bulunmaktadır. Apoptozisle ilişkili bir proteaz olan Kalbin, sistein proteaz ailesinin bir üyesidir. Kalbin'in aktive olabilmesi için Ca^{++} 'a ihtiyaç vardır ve hücre iskelet yapısında hasar meydana getirir. Apoptotik süreç boyunca hücre pH'sı hızla düşer, kalsiyum pompası yetersizliği sonucu hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur ve kalsiyum hücrede artar. Bu durum da, hücre için potansiyel zararlı etkilere sahip çok sayıda enzimi aktif hale geçirir (21,22,28).

C-myc (myelocytoma oncogene), transkripsiyon düzenleyici faktör proteindir. Başlıca hücre proliferasyonu ve apoptozisde görevlidir. C-myc protoonkogeni hücrenin büyümesinin programlanmasından sorumludur. Eğer hücrede uygun büyüme faktörleriyle birlikte c-myc yoksa büyümenin durduğu, her ikisi de yeterli düzeylerde ise çoğalma olur fakat büyüme faktörleri olmayıp sadece c-myc varsa apoptozis görülür (23).

Bcl-2 geni, üyelerinin bir kısmı apoptozisi tetiklerken (Bid, Bad, Bax), diğer bir kısmı (Bcl-2, Bcl-xl) inhibe eder. İlk olarak insan B hücreli foliküler lenfomasında tanımlanan Bcl-2 proteini mitokondrinin hem iç hem de dış membranında lokalize olur. Bunun yanında endoplazmik retikulum, çekirdek membranı dış yüzeyi ve sitoplazmada bulunabilmektedir. Mitokondri dış membranında bulunan Bcl-2, özellikle iyon transportunun düzenlenmesinden sorumludur ve sitokrom c salınımını da engeller (24,25).

Bcl-2 Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör-1'e (APAF1) tutunmuş olarak bulunur. Hücrenin içinden alınan apoptotik sinyaller APAF1'in mitokondrinin dış zarından ayrılmasına neden olur. Bunun sonucunda ise mitokondri dış zarının geçirgenliği artar. Bu sırada apoptozisi tetikleyen Bax hücre sitoplazmasında bulunur ve herhangi bir sebeple apoptotik bir uyarının alınması durumunda mitokondri membranına bağlandığı görülür ve burada deliklerin oluşmasına neden olur. Bu delikler, sitokrom c ve Apoptozis İndükleyici Faktörün (Apoptosis Inducing Factor) mitokondriden sitoplazmaya çıkmasını sağlar. Apoptozis indükleyici faktör

hücre çekirdeğine transloke olur. Apoptozom kompleksinin oluşması için sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkarak ATP, APAF1 ve Kaspaz 9 ile birleşmesi gerekmektedir. Sağlıklı hücrelerde Bad, mitokondri membranının dış zarında yerleşim gösterir. Apoptozis esnasında Bcl-xl'nin Bad'dan ayrıldığı sırada Bax farklılaşmaya uğrar (3,19,24).

Bcl-xl mitokondri membranının dışında bir yerleşim gösterir. Mitokondri membranının geçirgenliğinin düzenlenmesinde Bcl-2 ve Bcl-xl görev alırlar. Bu proteinler, Bad ve Bax gibi proapoptotik özellik taşıyan proteinleri inhibe ederek apoptozisi engellemede görev alırlar. APAF-1 üzerinden kaspaz aktivasyonunu Bcl-xl tarafından önlediği görülür. Bu proteinin apoptozisi engelleme fonksiyonu kaspazların öncü formlarını durdurmak ya da sitokrom c ve AIF gibi proapoptotik faktörlerin mitokondriden hücre sitoplazmasına çıkmasını bloke ederek gerçekleştirmektedir (20,24,26,27).

Seramid, membrana bağlı asit sfingomiyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür ve mitokondri hassasiyeti oluşturur. Apoptoziste ve hücre siklusunda rol oynar. Plazma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu ve hasarlara karşı apoptozisi başlattığı düşünülmektedir (28).

p53 Geni DNA tamiri yapan proteinlerin yazılımını sağlar. Normalde inaktif bulunan p53 geni hücrede çeşitli etkilerle (radyasyon, kemoterapi vb.) meydana gelen DNA hasarında, aktifleşerek hücre döngüsünü G1 fazında bloke eder ve hücrenin DNA'sını kontrol edebilmesi ve gerekirse tamiri için zaman tanır. Böylelikle hücre siklusu durdurulur ve DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. Normal hücrelerde mitozdan sonra siklus G1-S-G2 (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde bir döngü içindedir. Mitozu sona eren hücreler tekrar büyüme emri almadığı sürece G0 fazında istirahat halinde bulunurlar. G1, S, G2 fazları hücre siklusunun %90'lık büyük bir bölümünü kapsar. G1 fazı DNA sentezi için hazırlık yapıldığı aşamadır. Aynı zamanda protein ve RNA sentezi de bu aşamada gerçekleşir. Siklusun S fazı DNA'nın sentezlendiği aşamadır. G2 fazında ise protein sentezi ve hücre büyümeye devam ederken aynı zamanda RNA sentezi de bir yandan devam eder. Böylelikle hücre mitozu hazırlanır. Hücrenin maruz kaldığı dış etkenler sonucu (radyasyon, serbest radikaller) DNA hasarı meydana geldiğinde, hücre p53 düzeyini artırarak bu duruma yanıt verir. p53'ün düzeyi arttığında p21' in aktivasyonu sağlanır siklus G1 kontrol noktasında Rb (Retinoblastoma geni) proteinin daha fazla fosforlanması önlenerek durdurulur. DNA tamiri yapan proteinler, oluşmuş DNA hasarını onarabilirse hücre siklusundaki blok kalkar ve hücre çoğalmaya devam eder. P53 geni tarafından sentezlenen proteinler yardımıyla, bir hücrede normalde birbirini takip eden 7 kırılma onarılabılır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar

büyükse hücre onarımı yapılamaz ve apoptozis yolu açılır. Bu durumda p53 geni Bax proteininin (proapoptotik üye) aktivasyonunu sağlayarak mitokondri aracılığı ile apoptozisi başlatır. Böylelikle DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur. Apoptotik bir hücre DNA'sında yaklaşık 300.000 kırılma meydana geldiği tahmin edilmektedir (30). Bazı virüsler (Papilloma virüsü vb.) ya p53 aktivasyonunu durdurarak ya da Bax proteinine bağlanıp apoptozisi inhibe ederler. Böylelikle bu virüslerin enfekte ettikleri hücrelerin apoptozisten kurtuldukları görülür. Sonuç olarak ise virüsle tetiklenen karsinogeneze büyük bir katkıda bulunurlar (1,5,24,29).

İçsel ve dışsal kökenli sinyallerle hücre içinde bir grup proteaz aktive olur ve bunlar kaspaz (Caspase: Cysteine-Containing **A**spartate Specific Proteases) olarak isimlendirilirler. İnaktif olarak yani zimojen (prokaspaz) formda sitoplazmada bulunurlar. Aktif merkezlerinde sistein bulunduğundan dolayı sistein proteazlar olarak isimlendirilen enzim gruplarıdır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek kaspaz aktivasyon serisinin oluşumuna neden olurlar. Kaspaz 9, Kaspaz 8 gibi bazıları başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, Kaspaz 3, Kaspaz 7 gibi bazıları da efektör kaspazlar olarak bilinirler. Hücrenin apoptotik uyarıyı almasıyla aktive olan başlatıcı kaspazlar takiben efektör kaspazları aktifleştirirler. Aktive olmuş efektör kaspazlar ise kendisi ile ilişkili proteinleri parçalarlar. Bunun sonucunda da karakteristik apoptotik hücre morfolojisi şekillenir. Bunlar hücre iskeletinin ana bileşeni olan aktin filamanlarının yıkımıdır ki bu yıkım sonucu hücre normal şeklini kaybeder (10)

Elektron transport zincirlerinin bir proteini olan sitokrom c, mitokondrinin iç ve dış membranları arasında bulunan, apoptozis sürecinde kilitli bir kapının anahtarı olarak görev görür. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya çıkması hücrenin geri dönüşümsüz olarak apoptozis yoluna girdiğinin göstergesidir. Oluşan apoptozom kompleksi (sitokrom-c+APAF1+ATP) inaktif form olan prokaspaz 9'un aktif Kaspaz 9 çevrilmesine neden olur. Meydana gelen aktif Kaspaz 9 efektör kaspazlardan prokaspaz 3 ve prokaspaz 7'yi aktive ederek Kaspaz 3 ve Kaspaz 7'nin çekirdeğe girebilmesi için çekirdek porlarını normalden daha geniş bir konuma getirir. Aktif Kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) etkisiz hale getirir ve ardından ICAD'ın bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbest hale gelir. Bu durum ise apoptozisin önemli bulgularından biri olarak kabul edilen kromatin yoğunlaşmalarına ve DNA kırıklarıyla karşımıza çıkar. DNA hasarı tamirinde rol alan protein Poli ADP Riboz Polimerazdır (PARP). DNA zincir kırıklarına bağlanıp çekirdek proteinlerini modifiye etme görevini üstlenen PARP proteinin

DNA hasarını onarması Kaspaz 3 ile parçalanmasıyla önlenir. PARP aynı zamanda Ca/Mg'a bağlı ve DNA'yı apoptozs boyunca parçalayan endonükleazları inhibe eder. Endonükleaz aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekmektedir. Apoptoziste en önemli biyokimyasal olay bu enzimin aktivasyonudur. DNA replikasyonu ve tamiri için gerekli bir diğer enzim DNA Topoizomeraz II'dir. Kaspazlar bu enzimi inaktive ederek DNA hasarına yol açarlar. Apoptoziste etkilenen başka bir protein, çekirdeğin şeklini sağlayan Laminin'lerdir. Bu proteinin görevi çekirdek membranı ve kromatin arasındaki ilişkileri sağlamaktadır. Kaspaz 6 ile bu Laminin'ler parçalanır (4,10,31-34).

Kaspazlar apoptotik uyarılarla uyarılmadıkları sürece bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP (Apoptozis İnhibitörü) tarafından inhibe edilirler ve apoptotik mekanizma durdurulur (Tablo 2) (3).

Tablo 2: Kaspaz İnhibitör Ailesi (3)

IAP (The inhibitor of apoptosis) ailesi				
c-IAP-1	XIAP	Survivin	v-IAP	pIAP
c-IAP-2	NAIP	hILP	p35	crmA

³Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicologic Pathology 2007; 35: 495-516.

Kaspazlardaki defektler, kanser, otoimmün hastalıklar ve bazı nörolojik bozuklukların oluşmasına neden olurlar. Hatta, Kaspaz 8'in nöroblastomada tümör süpresörü olarak görev yaptığı gösterilmiştir (35).

Endoplazmik retikulum (ER), hücre içi kalsiyum dengesinde önemli görevleri vardır. ER aracılı apoptozis için oldukça önemli bir kaspaz olan Kaspaz 12, ER membranında yer alır. Daha önceleri, Ca⁺⁺ seviyelerinin ER'yi etkilemesi ile prokaspaz 12'yi aktive ettiğini tanımlanmıştır. Aktif Kaspaz 12 Kaspaz 9 ile birleşerek kaspaz aktivasyon serisini etkinleştirir. Kısacası Kaspaz 12, Kaspaz 9'u aktive ederek apoptozis meydana gelir (27,31).

Granzim ve Perforinler, mikroorganizmalarla enfekte edilmiş hücrelerin veya tümör hücrelerinin öldürülmesinde önemli görevler üstlenirler. Perforinler ve Granzimler normal olarak sitotoksik T Lenfositler ve doğal öldürücü hücrelerin sitoplazmik granüllerinde bulunurlar. Bu hücrelerin hedef hücreye birleşmesiyle Perforinler salınır ardından hedef hücrenin membranında delikler meydana getirilir. Devamında hücre içi kalsiyum düzeylerinin hızla artmasına yol açarlar. Prokaspaz 3 ve prokaspaz 7'nin etkin bir aktivatörüdürler ve

ayrıca Granzim, prokaspaz 8, prokaspaz 9 ve prokaspaz 10'un aktivasyonunda da görev alırlar (3,25).

IV. APOPTOZİSİN BAŞLATILMASI

Apoptozisin başlatılması için hücrenin genetik mekanizmalarla uyarılması gerekir. Bu uyarılar hücrenin içinden meydana gelebildiği gibi dış etkilere de kaynaklanabilmektedir (36).

A. Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller

A.1 Büyüme faktörleri ve yaşam sinyallerinin azlığı

Hücreler yaşamlarını sürdürebilmeleri için ekstrasellüler matriksten ve çevre hücrelerden alınan sinyallere ve önemli büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Verilen sinyallerin yeterli düzeyde ve düzenli olarak alınmaması halinde apoptozis uyarılabilmektedir. Büyüme faktörleri ortamdan uzaklaştırıldığı zaman, büyüme faktörüne bağımlı hücrelerin metabolizmalarında biranda gerçekleşen bozulmalar ve hücre siklusunda duraklamaların meydana geldiği görülmüştür. Etkinin devam etmesi durumunda ise hücrelerin apoptozise gittiği görülmüştür. Apoptozisi tetikleyici bir çekirdek proteini olan p53 aktivasyonuna bağlı olarak meydana gelir. Mesela nöronlar sinir hücresi büyüme faktörüne (NGF) ihtiyaç duyarlar, bu faktörün yetersizliğinde apoptozis görülebilmektedir (3,5).

A.2 Fas-Fas ligand aracılı apoptozis

Apoptoziste rol oynayan membran reseptörleri arasında oldukça önemli bir grup Tümör Nekrozis Faktör Reseptörleri (TNFR) ailesidir. TNFR içinde apoptozis tetikleyen reseptörlerden en önemlileri ise TNFR1 ve Fas'dır. Bu tip apoptoziste hücre yüzey reseptörü Fas aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas adaptör proteinle (FADD) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Bu durum ise prokaspaz 8'in aktifleşmesini sağlar ya da proapoptotik proteinler üzerinden efektör kaspazları uyarabilir (37).

Aktif Kaspaz 8'in Kaspaz 3'ü aktive ettiği yollar iki tanedir.

a) Doğrudan yol: Prokaspaz 3, Kaspaz 8 tarafından direkt parçalanır ve aktive edilir.

b) Dolaylı yol: Kaspaz 8 sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkabilmesi için Bcl-2 proteinini Bid ve onun terminal kısmına ayırır. tBid ve Bid'in mitokondri membranına transloke olduğu

görülür. Bu şekilde mitokondride delikler açılır. Meydana gelen apoptozom Kaspaz 9' aktiveştirir. Kaspaz 9 da prokaspaz 3'ü parçalayarak aktif Kaspaz 3'ü meydana getirir. Kaspaz 3'de Kaspaz 6 ve Kaspaz 7'yi aktiveştirir (33).

A.3 Tümör nekrozis faktör (TNF) aracılı apoptozis

Bir sitokin olan tümör nekrozis faktörün TNF reseptörleri (TNFR1) ile birleşmesiyle reseptörün hücre içinde bulunan parçası olan TNFR adaptör proteini (TRADD) ile etkileşime girer. TRADD ardından FADD ile birleşerek prokaspaz 8'i aktiveştirir. Sonra da yukarıda anlatılan yollarla apoptozise neden olur (37).

Sonuç olarak, bu da gösteriyor ki TRADD ve FADD olarak isimlendirilen bölgeler prokaspaz ile direkt veya indirekt ilişki içindedir. FADD direk etkili olurken TRADD, FADD üzerinden indirekt olarak etki etmektedir (7).

A.4 Sitotoksik T lenfositler aracılı apoptozis

Sitotoksik T lenfositler enfekte olmuş konak hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanımakta görevlidirler. Sitotoksik T lenfositlerin ana görevi tümör veya virüs ile enfekte olmuş hücrelerin öldürülmesidir ve bunu da başlıca hücrede apoptozisi tetikleyerek yaparlar. Yabancı antijenleri tanıdıkları hücre yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin membranlarındaki Fas reseptörlerini tespit ettikleri görülür ve birbirlerine tutunurlar. Hedef hücrelerin membranlarına sitotoksik T lenfositler tarafından delikler açılarak sitoplazmalarına Granzim B salgırlar. Salgılanan Granzim'in bu delikler vasıtasıyla hücreye girmesi sonucu hücre içinde prokaspaz 8'in aktivasyonu ve takiben kaspaz aktivasyon serisi başlar. Sonrasında enfekte veya kanser hücresi apoptozis sürecine girmiş olur (3).

A.5 Hücrelerin maruz kaldığı dış etkenler

Isı, hipoksi, kanser ilaçları, ultraviyole ayrıca serbest radikaller DNA hasarı oluşturarak apoptozis meydana getirebilirler. Buradaki mekanizma bu tür etkenlerin hücre DNA'sına zarar vermesi sonucu p53 genini aktive etmesi veya mitokondri hasarına yol açarak sitokrom c salınımına neden olup hücreyi apoptozise götürür (25).

A.6 Hücre içinden kaynaklanan sinyaller

İçsel yol ile tetiklenen apoptoziste merkezi rolü mitokondri oynar. hücre içi Ca^{++} seviyesinde artış, DNA’da meydana gelen hasar ve hücre içi pH’sında düşme gibi çeşitli apoptotik uyarılar mitokondrinin dış zarındaki geçirgenliği arttırarak çift membranı arasında bulunan bazı proteinlerin (sitokrom c) sitoplazmaya çıkışına neden olur ve hücreyi apoptozise götüren mekanizma aktifleştirilmiş olur (3,19).

V. APOPTOTİK HÜCRELERDE MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

Apoptozise uğramış hücrede görülen morfolojik değişiklikler oldukça karakteristiktir. Özellikle hücre çekirdeğinde meydana gelen yapısal değişiklikler ışık mikroskopik düzeyde bile tanıtıcı nitelik taşımaktadır.

Apoptozis, bir hücrede, çevre hücrelerle olan bağlantıların kopması ve büzülme ile karakterizedir. Bu yüzden de 1971 yılında Kerr bu durumu büzüşme nekrozu olarak da tanımlamıştır. Hücrelerde meydana gelen büzülmelerin nedeni, Cl^- , K^+ , Na^+ taşıyıcı sistemlerinin durması sonucunda hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin bulunmamasıdır. Bunun da plazma membranında bulunan iyon kanallarının ve pompalarının aktivasyondaki bozulmalar sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir. Apoptotik uyarım alan hücrenin, hacmi yarıya iner, çevre doku ile olan bağlantıları kesilir. Elektron mikroskopik incelemelerde, ilk olarak plazma membranının şekli bozulur ve tomurcuk benzeri çıkıntılar meydana gelir. Bu görünüm, maya tomurcuklarından esinlenerek “zeiozis” olarak tanımlanır. Hücre membranındaki meydana gelen tomurcuklanma ve takiben parçalara ayrılmanın nedeninin transglutaminaz enzimi olduğu bilinir. Apoptotik hücre membranı bu gibi enzimlerin aktivasyonu ile lizis riskine karşı güçlendirilir ve sonuç olarak membranlar bütünlüklerini korurlar. Ayrıca sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir. Enzim aktivasyonları sonucu hücre yüzeyinde oluşan tipik kabarcıklar bir süre sonra sağlam yapıli organelleri içeren çok sayıda apoptotik cisimcikleri oluştururlar (1,3,7,31).

Çekirdekte morfolojik olarak çok önemli değişiklikler gözlemlenir. Çekirdek membranının yakın alt kısımlarında kromatin yoğunlaşmaları görülür ve farklı büyüklük ve şekillerde çöktükleri görülür. Çöken kromatinin hilal ya da yoğun granüler tarzda yarımay şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleşim gösterdiği elektron mikroskopik incelemede gözlenir. Hücrede meydana gelen büzüşmelerin benzeri çekirdekte de meydana gelebilir ve zaman zaman membranla sarılı olarak parçalara ayrılabilir (3,7,32,38).

VI. APOPTOTİK CİSİMCİKLERİN FAGOSİTOZU

Hücresinin parçalanmasıyla çekirdek materyali ve sağlam hücresel organeller içeren zarla çevrili apoptotik cisimcikler oluşur. Normal hücre zarında fosfolipid asimetrisi vardır ve bu da sağlıklı zarların bir özelliğidir. Fosfolipidlerin, iç tabakada bulunan fosfatidilserin (PS) ve fosfatidiletanolamin ve dış tabakada bulunan fosfatidilkolinlerin asimetrik bir dağılım gösterdikleri görülür. Sağlıklı hücrelerde meydana gelen asimetri translokaz ile ATP'ye bağımlı olarak korunurlar. Apoptozis PS'nin dış yüzey tabakaya yerleşmesiyle sonuçlandığı görülür. Meydana gelen membran değişiklikleri çevredeki fagositik hücreler tarafından dikkat çekmeyi sağlarken transglutaminaz aktivasyonu ile membran parçalanır ve apoptotik cisimler ortaya çıkar. Oluşan apoptotik cisimcikler, sitokin salınımını ve inflamasyonun meydana gelmesini uyarmaksızın, makrofaj ya da komşu hücrelere, dış membrana transloke olmuş PS aracılığı ile "ye beni" sinyalleri gönderir. Sinyalleri alan fagositik veya komşu hücreler oluşan apoptotik cisimcikleri fagosit ederek çevre doku ve hücrelere zarar vermeden ortamdan uzaklaştırılmasını sağlarlar. Her ne kadar apoptotik cisimler hızla fagosit edilse de bazıları fagositozdan kaçabilir. Bunlar kendiliğinden şişme ve membran parçalanması ile dejenerasyona giderler. Buna sekonder nekroz denir ve morfolojik görünüm nekrozla aynıdır (5,23,39).

VII. APOPTOZİS İLE NEKROZ ARASINDAKİ FARKLAR

Nekroz patolojik bir ölüm şeklidir, fakat apoptozisin hem patolojik hem de fizyolojik durumlarda meydana geldiği görülmektedir. Apoptozis morfolojik olarak özgün ve meydana gelmesinde enerjiye ihtiyaç duymasına rağmen nekrozda herhangi bir özgünlük ve enerjiye ihtiyaç yoktur. Nekrozda hücrelerde şişme meydana gelir ve bunun nedeni ise hücrenin içine aşırı miktarlarda sıvının girmesidir. Ancak apoptozise giden hücre bu durumun tam tersine büzüştüğü ve küçüldüğü görülür. Nekrotik hücrelerde bu süre zarfında plazma membranlarının bütünlüğünü kaybettiği görülür. Takiben de hücrenin kendi materyallerinin dışarıya çıktığı görülür. Bunu takiben de yangısal reaksiyonların şekillenmesi kaçınılmaz bir hal alır. Oysa apoptotik hücre membranı bütündür. Plazma membranlarında herhangi bir hasarlanma oluşmadığı için komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından sessizce fagosit edilirler. Böylece herhangi bir yangısal süreç görülmez. Apoptotik hücre nekroza uğrayan hücreden farklı olarak apoptotik cisimciklere ayrılır. Apoptotik cisimciklerin içinde nükleus ve diğer hücre içi organeller bulunur. Apoptozisin en tanıtıcı yönü DNA'nın internükleozomal

bölgelerden 180–200 baz çifti ve bunların katları şeklinde DNA'yı parçalamasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde karakteristik merdiven görüntüsünün görülmesine neden olur. Fakat nekrozda düzensiz parçalanma söz konusudur, bu da jel elektroforezinde yayılmış bir bütün olarak görülür (3,7,9).

Tablo 4: Apoptozis ve Nekroz arasındaki farklar

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol Açan Nedenler	Viral enfeksiyon Hipermi Hipoksi İskemi Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları Şiddetli oksidatif stres	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu Radyasyon Yüksek doz glukokortikoid Kanser ilaçları Sitotoksik T lenfositler
Morfolojik Özellikler	Hücre membranı bütünlüğünün kaybı Kromatin yumaklaşması Hücre şişmesi Organellerin bütünlüğünün kaybolması Büyük vakuollerin oluşumu Hücre lizisi	Bütün hücre membranı, fakat membranda tomurcukların oluşumu Kromatinin nüklear membran altında toplanması ve yoğunlaşması Hücre küçülmesi Organeller sağlamdır Hücrenin mitokondri, ribozom, nucleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotic cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal Özellikler	Bozulmuş iyon hemostazisi ATP'ye ihtiyaç yoktur +4 °C'de gerçekleşebilir DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde yayılım görüntüsü) Postlitik DNA parçalanması	ATP gereklidir +4 °C'de gerçekleşmez DNA internukleozomal alanlarda 180-200 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü) Prelitik DNA fragmentasyonu
Diğer Özellikler	Hücreler gruplar halinde ölür Yangıya neden olur Lizozomal enzimler salınır Patolojik etkiler sonucu gerçekleşir	Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür Hem patolojik hem de fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler Yangı görülmez

Apoptozisde çekirdek karyoreksize uğrarken, nekrozda ortadan kaybolur yani karyolizis görülür. Apoptoziste, nekrozda şekillenenin aksine lizozomal enzim sindirimi yoktur (3,7,9).

Nekrozda zarar gören asıl hedef organel hücrenin enerji kaynağı olan mitokondridir, fakat apoptozisde hasarlanan hedef yapı hücre çekirdeğidir (40).

VIII. HÜCRE VE DOKULARDA APOPTOZİSİN SAPTANMASI

Apoptozisin tespiti için kullanılan yöntemler oldukça fazladır. İlk yıllarda apoptozis hücrelerdeki morfolojik yapı ile tanınıyordu. Günümüzde ise apoptozise özgü olduğu bilinen proteinlerin/kaspazların moleküler düzeylerde tespiti ile yapılmaktadır.

Apoptozisin belirlenmesinde başlıca; morfolojik görüntüleme, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve immunolojik yöntemler kullanılmaktadır.

A. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

A1. Işık mikroskopi tanısı

a. Hematoksilen Boyama: Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde hem en ucuz hem de oldukça kolay olan ve bu sebeplerle yaygın olarak kullanılan Hematoksilen ile boyamadır. Hematoksilen ile boyanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelenir (5).

Hematoksilen boyamada, kromatin boyandığından apoptozise uğramış hücreler çekirdek morfolojisine göre değerlendirilir. Hücre küçülmesi ya da sitoplazmik küçülme, kromatindeki yoğunlaşma ve çekirdek zarının periferinde toplanması, çekirdeğin küçülmesi (piknoz) veya parçalara ayrılması yaygın görülen değişikliklerdir (5).

b. Giemsa Boyama: Giemsa Boyama'da çekirdek morfolojisi temeline dayanarak apoptozise uğrayan hücreler tanımlanır. Sitoplazma sınırlarının Hematoksilen boyamaya kıyasla daha iyi seçildiği için yaygın kullanılır (5).

A2. Floresan mikroskopi kullanımı

Floresan maddelerin (Propidium İyodür, DAPI, Hoechst Boyası) kullanılmasıyla yapılan bir inceleme türüdür. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabilme özelliği gösterdiğinden hücrenin kromatini görünür hale gelir. Böylelikle de çekirdeği görünür hale gelmesi sağlanmış olur. Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, ölü hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanınır. Hematoksilen ve Giemsa boyamalarındaki boyama protokolleri gereği hücrelerin tamamı ölürler. Ortamdaki ölü ve canlı hücre ayırımının yapılabilmesi için canlı/ölü hücreleri boyayan Hoechst boyası ile birde yalnızca ölü hücreleri boyayabilen Propidium İyodür birlikte kullanılır. Bu kullanılan yöntemlerde hücre zarının bütünlüğünün

tam olup olmadığının tespiti hücrenin canlılık belirleyicisidir. Canlı hücreleri membranları bütün olduğu için Propidium İyodür ile boyanma göstermezlerken, tüm hücreleri boyayabilen Hoechst boyası gibi boyalarla da canlı ve ölü hücrelerin ayrımlarının yapılmasını sağlar. Bu şekilde boyanan hücreler floresan mikroskopu ile tespit edilir hale gelirler. Ölü hücrelerin apoptozisle mi yoksa nekroza uğrayıp mı öldükleri çekirdek morfolojisine bakılarak ayırt edilir (Tablo 3) (41, 42).

Hücrelerin ayrımında dikkat edilen kriterler:

- *Nekrotik hücreler:* Ölü oldukları doğrulanan (Hoechst Boyası ve Propidium İyodür pozitif) hücrelerin çekirdeğinde apoptotik değişiklikler gözlenmez (41, 42).

- *Apoptotik hücreler:* Apoptotik hücrelerde hücre zarı bütünlüğünü koruduğundan Propidium İyodür ile boyanmaz ama Hoechst Boyası pozitifdir. Burada önemli nokta sekonder nekrozun gelişmemiş olması gerekir. Apoptozise özgü çekirdek morfolojisi bu hücrelerde tanı koydurucudur (41, 42).

- *Canlı hücreler:* Hoechst Boyası'yla boyanırlar ve çekirdek normaldir ayrıca Propidium İyodür negatiftir (41, 42).

Tablo 3: Özel boyaların karşılaştırılması (41,42).

	Hoechst boyası	Propidiyum İyodür	Apoptotik Morfoloji
Normal Hücreler	+	-	
Apoptotik Hücreler	+	-	+
Nekrotik Hücreler	+	+	-

⁴¹Nguyen TV, Ndoye A, Hall LL, Zial S, Arredondo A, Chernyavsky AI, Kist DA, Zelickson BD, Lawry MA, Grando SA.

⁴²Riede N, Werner M.

A3. Elektron mikroskopik inceleme

Elektron mikroskopik değerlendirme apoptoziste en güvenilir yöntemdir. Bütün morfolojik değişiklikler kusursuz olarak izlenebilir. Üstelik hücresel detaylar (mitokondrinin

durumu, çekirdek/hücre membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı) da araştırılabilir. Ultrastruktural (elektron mikroskopik) incelemeye alınacak hücreler sırasıyla gluteraldehit ve osmium tetraoksitle fikse edilir. Propilen oksitle yıkanmadan ve Epon-resinle bloklanmadan önce dereceli alkol ya da aseton serilerinden geçirilir, 50–80 nm kalınlığında kesitler alınır ve uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanırlar. Yoğunlaşmış ve küçülmüş çekirdekler apoptozisin karakteristik özellikleridir (41,42).

A4. Faz kontrast mikroskobu

Bu tür mikroskopik inceleme sadece hücrelerin kültür ortamındaki hücre veya hücre topluluklarının incelenmesi amacıyla kullanılır. Ölen hücreler yapıştıkları yüzeyden ayrıldıkları için besiyerinde yüzmeye başlarlar. Bu yüzen hücreler faz kontrast mikroskobu yardımıyla gözlemlenebilir. Mitoza giden hücreler de faz kontrast mikroskobuyla rahatlıkla gözlemlenebilir. Burada önemli olan nokta bu hücrelerin, apoptotik hücrelerin erken evredeki görüntüleri ile karışabilmeleridir. Çünkü gerek mitozda gerekse apoptozisin erken dönemlerinde yuvarlak ve küçük olarak görüldükleri fark edilir. Faz kontrast mikroskobu ile apoptozise uğrayan hücrelerin üzerindeki karakteristik tomurcuklanmalar ve girintiler görülebilir. Apoptozise uğramış hücrelerin ilk dönemlerinde hücre membranları bir bütünlük gösterir ve zaman geçtikçe sekonder nekroz sonucu membran bütünlükleri bozulmaya başlar. Apoptozisin başlamasından sekonder nekroz gelişene kadarki süreçte hücrelerin non-vital (Propidium İyodür) boyalarla boyanmadıkları dikkati çeker. Halbuki bu hücreler apoptozise uğrayan hücrelerdir. Bu durum apoptotik cisimciklerin membran bütünlüğünün tam olmasıyla açıklanabilir. Fakat zamanla hücrede sekonder nekroz oluşuktan sonra bu membran bütünlüğü bozulmaya başlar ardından da hücrelerin non-vital boyalarla boyandığı görülür. Faz kontrast mikroskopunda herhangi bir boya kullanmadan da hücreleri gözlemlemek mümkündür (41).

B. İmmunohistokimyasal yöntemler

B1. Fosfatidilserin varlığının saptanması

Anneksinler, kalsiyum bağlayıcı membran proteinleridir ve yalnızca ökaryotik hücrelerde bulunurlar. Hücre bölünmesi, apoptozis ve büyümenin düzenlenmesi gibi çok çeşitli fonksiyonları vardır (22).

Normal sağlıklı hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise uğrarsa normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne çıkarlar. Dış yüzeye çıkan PS'ler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler tanımlanmış olur (22,40).

B2. TUNEL yöntemi

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) yönteminde görülen tepkime oldukça tanıtıcıdır ve yalnızca apoptozise uğramış hücre çekirdekleri boyanır. Yöntem Tdt'nin polideoksinükleotid polimerinin sentezini takiben DNA'nın 3-OH uçlarına özgün olarak bağlanması esasına dayanır. DNA kırıklarının in situ olarak tespit edilmesini sağlar. Kültürü yapılmış hücreler, donmuş kesitler, ve parafin bloklarda apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir. TUNEL'in sonuçları hem floresan mikroskopla hem de ışık mikroskop ile değerlendirilir (9).

B3. M30 yöntemi

M30 yönteminde; yeni antijenik bölgelerin ortaya çıkarak bunların da immunohistokimyasal yöntemle tespiti prensibine dayanır. Bu durum da sitokeratin 18'in kırılması ile meydana gelir. Sitokeratin 1 den 20 ye kadar numaralandırılır ve hücre iskeletinin temel proteinlerinden birisidir. 9 ve 20 arasındaki sitokeratinler asidik özellik taşırlar. Epitelyal hücreler ve karsinomlarda boyanma gösterir. Sadece sitokeratin 18' i eksprese eden dokularda (meme dokusu, karaciğer, bağırsak vb.) kullanılması mümkündür. Bu dokular ise epitelyal kökenli doku özelliği taşırlar (31,35,43,44).

Kaspaz 3 Sunumunun Saptanması

Kaspaz 3 yöntemiyle apoptotik hücrelerde görülen aktif Kaspaz 3 immunohistokimyasal yöntem ile belirlenir. Fakat bunun tespiti için dokuda apoptozise yol açan etkenin Kaspaz 3'ü aktive edip etmediğinin bilinmesi oldukça önemlidir. Bu önemli bilginin bilinmesi gerekir ki apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilsinler (20,31,44).

C. Biyokimyasal Yöntemler

C1. Agaroz jel elektroforezi

Apoptozisde DNA, 180-200 baz çifti ve bunun katları şeklinde (internukleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü meydana gelir. Apoptozisin karakteristik özelliği olan bu bulgu nekrotik hücrelerde görülmemektedir. O yüzden apoptozisin nekrozdan ayrılmasında, uygulaması kolay ve faydalı yöntemlerden birisidir (34).

C2. Western blotting

Western Blotting yöntemiyle apoptozise özgü proteinlerin kırılıp kırılmadıklarının (Kaspaz 3 aktivitesi Kaspaz substratlarına karşı spesifik antikor kullanılması) ya da var olup olmadıklarının belirlenmesi mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriden çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metodla tespit edilir. Yanlız, sitokrom c tespitinde, önce hücrelerin sitoplazmik ve mitokondriyal bölümleri ayrılmalıdır. Takiben, sitoplazmik bölümde sitokrom c'nin görülmesi halinde hücrelerin apoptozise uğradıkları anlaşılır. Çünkü sitokrom-c normalde sitoplazmada bulunmamaktadır (27,31).

C3. Flow sitometri

Hücre yüzeyi antijenlerini (Fosfotidilserin ve Anneksin V) ve bunları taşıyan hücreleri ayırmaya yarayan bir floresan antikor tekniğidir. Flow sitometri yardımıyla floresan maddelerle işaretlenmiş antikor kullanılarak, yüzey proteininin belirlenmesi oldukça kolaydır. Böylelikle de apoptotik hücreler rahatlıkla belirlenir. Aynı zamanda teknik azalan DNA'nın gösterilmesi prensibine de dayanmaktadır. DNA yoğunluğu normal hücreye nazaran hem apoptotik hücrede hem de apoptotik cisimciklerde daha azdır (3,4,31).

A) Propidium iyodür kullanılarak

B) Anneksin V kullanılarak

Propidium iyodür kullanılarak yapılırsa hücre boyutu ve içerdiği DNA miktarının karşılaştırılarak, azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu düşünülür ve böylece apoptotik hücre yoğunluğu tespit edilir (3,4).

D. İmmunolojik Yöntemler

D1. ELISA

ELISA yöntemi ile hem kültürü yapılmış hücre toplulukları hem de plazmada DNA kırıklarını tespit etmek mümkündür. Bununla beraber M30 seviyelerinin ölçümü de bu yöntemle yapılabilir (4).

D2. Fluorimetrik Yöntem

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayini prensibine dayanan yöntemdir. Bu yöntemde, hücre lizatları ile kaspazlar arasında bir tutunma meydana gelir. Sonra ortama substrat ilave edilir ve bu substratın özelliği ise floresan bir maddenin tutulu olmasıdır. Kaspaz aktivitesi ile uyumlu olarak ortaya floresan çıkar ve fluorimetre ile ölçülür (3,4).

SONUÇ

Sonuç olarak, apoptozisin dünü ve bugününe baktığımızda, son derece ilgi çeken ve günümüz teknolojisiyle beraber araştırmaların da ileri boyutlar kazanmasına rağmen, hala tam olarak açıklanamaması konuyu daha da ilgi çekici hale getirmektedir. Yeni tanı yöntemlerinin ve inceleme tekniklerinin gelişmesiyle apoptozisin tetiklenmesinden oluşumuna ve sonlanmasına kadarki süreçte, hala tanımlanamayan bazı bölümlerin açıklık kazanmasıyla; embriyoloji, biyoteknoloji, hastalık tanı ve tedavisi alanlarında eşsiz ilerlemelerin sağlanması kaçınılmaz görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin Önemi. Toraks Dergisi 2001; 2(1): 91-95
2. Parlakpınar H, Koç M, Acet A. Yaşlanmada Apoptozis Ve Melatoninin Etkisi. T Klin Tıp Bilimleri 2004; 24: 62-67
3. Elmore S. Apoptosis: A Review Of Programmed Cell Death. Toxicologic Pathology 2007; 35: 495-516.
4. Gewies A. Introduction to Apoptosis. ApoReview 2003; 5: 1-26.
5. Kiess W, Brian G. Hormonal Control Of Programmed Cell Death/Apoptosis. European Journal of Endocrinology 1998; 138: 482-491.
6. Özcan A, Atakişi E. Apoptosisin Biyokimyasal Önemi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 2003; 9(1): 95-100.
7. Cruchten VS, Broeck WV. Morphological And Biochemical Aspects Of Apoptosis, Oncosis And Necrosis. Anatomia, Histologia, Embryologia 2002; 31: 214-223.
8. Fausto NM. Cell Injury Cell Death. Erişim tarihi 2006; 31.05.2015 Erişim adresi: http://courses.washington.edu/hubio520/print/syllabus_cellinjurydeath.pdf
9. Yazar S, Tunca A. Apoptosis ve Epilepsi. Türkiye Klinikleri Dergisi 2007; 27: 889-893

10. Antar V. Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan Qvd-Oph' nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, Tıpta uzmanlık tezi, 2005
11. Raffray M, Cohen GM. Thymocyte Apoptosis As A Mechanism For Tributyltin-Induced Thymic Atrophy In Vivo. Archives of Toxicology 1993; 67 (4), 231-236.
12. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell Death In Health And Disease: The Biology And Regulation Of Apoptosis. Cancer Biology 1995; 6: 3-16.
13. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. The American Journal of Surgical Pathology 1997; 21: 88-101.
14. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; The Biochemistry And Molecular Biology Of Programmed Cell Death. Endocrine Reviews 1993; 14: 133-144.
15. Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today 1993; 14: 126-130.
16. Kiess W, Gallaher B. Hormonal Control Of Programmed Cell Death Apoptosis. European Journal of Endocrinology 1998; 18: 482-491.
17. Hetts SW. To Die Or Not To Die: An Overview Of Apoptosis And Its Role In Disease. Journal of the American Medical Association 1998; 278: 300-307.
18. Fadeel B, Orrenius S, Zhivotovsky B. Apoptosis in human disease: A New Skin For The Old Ceremony? Biochemical and Biophysical Research Communications 1999; 266: 699-717.
19. Tomatır AG. Apoptoz; Programlı Hücre Ölümü. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences 2003; 23: 499-508.
20. Zeiss CJ. The apoptosis-Necrosis Continuum: Insights From Genetically Altered Mice. Veterinary Pathology 2003; 40: 481-495.
21. Hockenbery D. Defining Apoptosis. American Journal of Pathology 1995; 146(1): 16-19.
22. Tandoğan B, Ulusu NN. Kalsiyum Bağlayıcı Proteinler. Türk Biyokimya Dergisi 2006; 31 (1): 36-40.
23. Evan G, Harrington E, Fanidi A, Land H, Amati B, Bennett M. The Role Of Apoptosis In Development, Tissue Homeostasis And Malignancy. Biological Sciences 1994; (345) 1313; 269-275.

24. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis Signaling By Death Receptors. *European Journal of Biochemistry* 1998;254, 439-459.
25. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Siniaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, DI Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. Cell death: Apoptosis Versus Necrosis. *International Journal of Oncology* 2000; 21(1): 165-70.
26. Cohen GM. Caspases: The Executioners Of Apoptosis. *Biochemical Journal* 1997; 15; 326, 1-16.
27. Saraival L, Silva RD, Pereira G, Gonçalves J, Real M. Specific Modulation Of Apoptosis And Bcl-Xl Phosphorylation In Yeast By Distinct Mammalian Protein Kinase C Isoforms. *Journal of Cell Science* 2006; 119, 3171-3181.
28. Desdicioğlu R. Ratlarda Ovulasyon İndüksiyonunu Takiben Spontan Siklofosamid Ve Radyoterapi Etkisiyle Oluşan Apoptosis Ve Sifingozin -1- Fosfat' In Siklofosamid Ve Radyoterapi İle Oluşan Apoptosis Üzerine Etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Tıpta uzmanlık tezi, 2005.
29. Cabadak H. Hücre Siklusu Ve Kanser. Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2008; 9(3) : 51-61
30. Zhang J, Xu M. Apoptotic DNA Fragmentation And Tissue Homeostasis. *Trends in Cell Biology* 2002; 12 (2): 84- 89.
31. Zhang A, WU Y, Lai HW, Yew T. Apoptosis - A Brief Review. *Neuroembryology* 2004; 05: 47-59.
32. Turgut B, Demir T, Celiker Ü. Oftalmolojide Apoptoz. *Fırat Tıp Dergisi* 2006; 11(1): 6-11.
33. Gültekin N, Karaoğlu K, Küçükateş E. Hücrede Apoptoz Ve Sağkalım Mekanizmalarının Keşfedilmesi Ve Yeni Potansiyel Tedavi Stratejileri. *Türk Kardiyoloji Derneği Arş* 2008; 36: 120-130.
34. Sharifi AM, Eslami H, Larijani B, Davoodi J. Involvement of Caspase-8, -9, and -3 In High Glucose-Induced Apoptosis In PC12 Cells. *Neuroscience Letters* 2009; 459: 47-51.
35. Vincent JK, Jill ML, Tal T. Proteolytic Regulation of Apoptosis. *Seminars in Cell and Devolopmental Biology* 2000; 11: 191-201.

36. Ozansoy M, Başak AN. Parkinson Hastalığında Programlanmış Hücre Ölümü. Parkinson Hastalığı Hareket Bozuklukları Dergisi 2006; (1): 54-61.
37. Özeç AV, Erdoğan H, Toker İM, Özer H, Arıcı MK. Pterijium Etiyopatogenezinde P53 Ve Apoptozisin Rolü. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2008; 30: 58-67.
38. Tan M. Autoimmunity and Apoptosis. The Journal of Experimental Medicine 1994; 9: 179
39. Oskay T, Erdem C.. Apoptoz Ve Dermatolojideki Önemi. Türkiye Klinikleri Dermatoloji 2000; 10: 213-221.
40. Kültürsay H, Kayıkçıoğlu M. Apoptozis Ve Kardiyovasküler Hastalıklar. Anadolu Kardiyoloji Dergisi 2002; 4: 323-9.
41. Nguyen TV, Ndoeye A, Hall LL, Zial S, Arredondo A, Chernyavsky AI, Kist DA, Zelickson BD, Lawry MA, Grando SA. Programmed Cell Death Of Keratinocytes Culminates In Apoptotic Secretion Of A Humectant Upon Secretagogue Action Of Acetylcholine. Journal of Cell Science 2001; 114: 1189-1204.
42. Riede N ve Werner M. Color atlas of pathology. Erişim tarihi: 31.05.2015 ErişimAdresi:https://books.google.com.tr/books?id=N5D_d5Wi3n8C&pg=PA128&lpg=PA128&dq=programmed+cell+death+apoptosis&source=bl&ots=TK_4EQAzh&sig=PG7MijSHTyz5xoVUYCBxEtdqnpQ&hl=tr&ei=hqouSoH_NouPsAbynZ28CQ&sa=X&oi=book_result&ct=result#v=onepage&q=programmed%20cell%20death%20apoptosis&f=false
43. Hücümenoğlu S, Avşar FM, Kafalı M EM, Öztürk E, Erdem G, Yılmaz Ş, Yalçın Ş. Meme Karsinomlarında S-100, Vimentin, Sitokeratin ve HMB-45 Ekspresyonu. Genel Tıp Dergisi 2004; 14(4): 133-138
44. Jain JK, Li A, Nucatola DL, Minoo P, Felix JC. Nonoxynol-9 Induces Apoptosis of Endometrial Explants by Both Caspase Dependent and Independent Apoptotic Pathways. Biology of Reproduction 2005; 73, 382–388.