

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SPİNAL KORD İSKEMİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA KASPAZ-3  
AKTİVİTESİ VE MELATONİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DEMET DOĞAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA  
TEMMUZ 2008**

**Tezin Başlığı:** Spinal Kord İskemi Oluşturulan Sıçanlarda Kaspaz-3 Aktivitesi ve Melatoninin Koruyucu Etkisinin Araştırılması

**Tezi Hazırlayan:** Demet DOĞAN

**Sınav Tarihi:** 10.07. 2008

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Sınav Jürisi Üyeleri:**

Prof. Dr. Murat ÖZMEN



Doç. Dr. Hikmet GEÇKİL



Yrd. Doç. Dr. Songül AYDEMİR

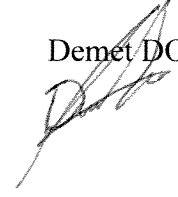


Prof. Dr. Ali şAHİN  
Enstitü Müdürü

## Onur Sözü

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum **“Spinal Kord İskemi Oluřturulan Sıçanlarda Kaspaz-3 Aktivitesi ve Melatoninin Koruyucu Etkisinin Araştırılması”** başlıklı bu çalışmanın, bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dűşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakçada yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Demet DOĞAN



# ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

## SPİNAL KORD İSKEMİ OLUŞTURULAN SIÇANLARDA KASPAZ-3 AKTİVİTESİ VE MELATONİNİN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Demet DOĞAN

İnönü Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

65+ vii sayfa

2008

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Songül AYDEMİR

Kaspazlar, hücre ölümü yani apoptozisde anahtar rol oynarlar. Deneysel iskemi ve travmatik beyin yaralanması sonucunda oluşan nöronal hücre ölümü, kaspaz-3` ün aktive olmasıyla gerçekleşmektedir. Bu çalışmada spinal kord iskemisi yapılarak, iskemide kaspaz-3 aktivitesi ve güçlü bir antioksidan hormon olarak bilinen melatoninin, yeterince bilinmeyen anti-apoptotik özelliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Sinir sisteminde iskemi, nörodejenerasyon, inflamatuvar hastalıklar ve travmatik yaralanmalarda nöronal hücre ölümünün bir şekli olan apoptoz gözlenir. Kaspazlar apoptozun ortaya çıkışında önemli hücre içi proteazlardır. Kaspazlar hücrede inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Kaspaz-3` ün nöronal gelişim ve yaralanmada oldukça önemli olduğu gösterilmiştir. Bu proteazın bozulması nörolojik defektlere yol açar.

Çalışmamızda 30 adet yetişkin erkek Wistar tipi albino sıçanlardan 4 grup oluşturuldu: 1.grup (Kontrol), 2.grup (Deneysel spinal kord iskemi oluşturulan grup), 3.grup (Melatonin uygulanan grup), 4.grup (Melatonin+İskemi oluşturulan grup). Hayvanlara anestezi yapıldıktan sonra spinal kord iskemi modeli uygulandı. Bütün denekler 48 saat yaşatıldıktan sonra spinal kord örnekleri alındı. Bu dokularda kaspaz-3 aktivitesinin gözlenmesi için Western-Blot tekniği uygulandı.

Kontrol grubuna göre spinal iskemi grubundaki kaspaz-3 bandı belirgin bir şekilde görülürken, melatonin uygulamasıyla melatonin+iskemi grubunda bu bandın görünürlüğü ortadan kaybolmuştur.

Bu sonuçlar iskemi uygulamasına bağlı kaspaz-3 aktivitesinin dolayısı ile apoptozisin arttığını, melatoninin ise kaspaz-3 aktivitesini inhibe ederek spinal kord iskemi hasarını önleyebileceğini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Spinal kord iskemi, Kaspaz-3, Melatonin

## **ABSTRACT**

Master Thesis

### **DETERMINATION OF CASPASE-3 ACTIVITY AND PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN AFTER SPINAL CORD ISCHEMIA IN RATS**

Demet DOĞAN

Inonu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

65+ vii pages

2008

Supervisor: Assist. Prof. Songül AYDEMİR (PhD)

Caspases, play a major role in apoptosis which is known cell death. Neuronal cell death that takes place at result of experimental ischemia and traumatically brain injury occurs with activation of caspase-3. In this study, we aimed to investigate the activity of caspase-3 in ischemia and strong antioxidant hormone melatonin's anti-apoptotic property which is not entirely known, using spinal cord ischemia.

In the nervous system, apoptosis, a type neuronal cell death, is observed at ischemia, neurodegeneration, inflammatory diseases, and traumatically injury. Caspases are the important intracellular proteases in the development of apoptosis. Caspases are inactive in cell and proteolytically activated each other. It is showed that caspase-3 is fairly important for neuronal development and injury. Breaking of these proteases causes neurological defects.

In our study, thirty adult Wistar Albino rats were divided into 4 groups: Group 1: control, group 2: experimental spinal cord ischemia, group 3: melatonin (50mg/kg) treated group, and group 4: melatonin (50mg/kg) followed ischemia. After animals were anesthetized, spinal cord ischemia model was used. All animals were kept alive for 48 hours and then spinal cord samples were removed. In these tissues, caspase-3 activities were analyzed using Western blot technique. While, caspase-3 band has been obviously visible in the spinal cord ischemia group compared with control, this band disappeared with melatonin treatment in the melatonin plus ischemia group.

These results indicated that caspase-3 activity increased in the ischemia, consequently increased apoptosis, and that melatonin can be prevented to spinal cord ischemia injury inhibiting caspase-3 activity.

**Key Words:** Spinal cord ischemia, Caspase-3, Melatonin

## TEŞEKKÜR

Bu çalıőmanın her aşamasında yardım, öneri ve desteğini benden esirgemeyen, her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan tez danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Songül AYDEMİR' e,

Çalıőmalarımın deneysel aşamasında bana destek sağlayan İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Nöroloji ve Beyin Cerrahi' sinden Doç. Dr. Ayhan KOÇAK' a,

Çalıőmalarımın deneysel aşamasında benden hiçbir laboratuvar araç gerecini esirgemededen kullanmama izin veren Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakóltesi Dekanı Prof. Dr. Nihat DİLSİZ' e,

Spinal kord iskemi oluşturulan sıçanlarda kaspaz-3 aktivitesi ve melatoninin koruyucu etkisinin araştırılması (BAP 2006/56) konulu projemizi destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi' ne,

Yardım istediğimde her zaman imdadıma yetişen sevgili eőime,

Beni yetiőtirip büyüten sevgili annem ve babama,

**teőekkürü bir borç bilirim.**

# İÇİNDEKİLER

	ÖZET.....	i
	ABSTRACT.....	ii
	TEŞEKKÜR.....	iii
	İÇİNDEKİLER.....	iv
	ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
	ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
	SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
<b>1.</b>	<b>GİRİŞ</b> .....	1
1.1.	Kaspazlar ve Apoptozis.....	3
1.2.	Apoptozis.....	3
1.2.1.	Apoptozisin Görüldüğü Olaylar.....	5
1.2.2.	Apoptozisin Bozulmasının Sonuçları.....	7
1.2.3.	Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları.....	8
1.2.3.1.	Apoptozisin Başlatılması.....	9
1.2.3.2.	Hücre içi Proteazların Aktivasyonu.....	14
1.2.3.3.	Hücre içi Biyokimyasal ve Morfolojik Değişimler.....	16
1.2.3.4.	Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar.....	18
1.2.3.5.	Fagositoz.....	21
1.2.4.	Apoptozisin Spinal Kord Yaralanmalarındaki Rolü.....	22
1.3.	Kaspazlar.....	23
1.3.1.	Kaspazların Yapısı ve Sınıflandırılması.....	24
1.3.2.	Kaspazların Aktivasyonu.....	27
1.3.3.	Kaspaz İnhibitörleri.....	30
1.3.4.	Kaspaz Substratları.....	32
1.3.5.	Apoptozisde Kaspaz-3' ün Yeri ve Önemi.....	35
1.4.	Melatonin ve Genel Özellikleri.....	33
1.5.	Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	38
<b>2.</b>	<b>KAYNAK ÖZETLERİ</b> .....	40
<b>3.</b>	<b>MATERYAL VE YÖNTEM</b> .....	43
3.1.	Deney Grupları.....	43
3.2.	Anestezi.....	43
3.3.	Spinal Kord İskemisinin Oluşturulması.....	44
3.4.	Melatonin Uygulanması.....	44
3.5.	Proteinlerin SDS-PAGE ile İncelenmesi.....	44
3.6.	Western Blot Yöntemi İle Kaspaz Aktivasyonunun Belirlenmesi.....	47
<b>4.</b>	<b>ARAŞTIRMA BULGULARI</b> .....	50
4.1.	SDS- PAGE Jel Elektroforezi Sonuçları.....	50
4.2.	Western Blot Sonuçları.....	51
<b>5.</b>	<b>TARTIŞMA</b> .....	53
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	58
<b>7.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	65

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Fare pençelerinin embriyonik gelişimi.....	6
Şekil 1.2.	Mağara balıklarında gözün dejenerasyonu.....	6
Şekil 1.3.	Fas-Fas Ligand aracılı apoptozis.....	11
Şekil 1.4.	TNF (tumor necrosis factor) aracılı apoptozis.....	11
Şekil 1.5.	Apoptotik yollar ve hedefleri.....	12
Şekil 1.6.	Apoptozis mekanizması.....	15
Şekil 1.7.	Apoptotik cisimler.....	17
Şekil 1.8.	Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar.....	19
Şekil 1.9.	Fagositoz.....	22
Şekil 1.10.	Kaspazlar ve diğer isimleri.....	24
Şekil 1.11.	Kaspazların sınıflandırılması.....	26
Şekil 1.12.	Aktif kaspazın yapısı.....	27
Şekil 1.13.	Kaspaz kaskadı .....	28
Şekil 1.14.	Hücre ölümünün oluşumu .....	29
Şekil 1.15.	Kaspaz ve substrat reaksiyonu.....	33
Şekil 1.16.	Melatoninin kimyasal yapısı.....	35
Şekil 3.1.	Jelin PVDF membrana aktarılması.....	47
Şekil 4.1.	SDS-PAGE elektroforezi.....	50
Şekil 4.2.	Western-Blot tekniğiyle elde edilen kaspaz-3' ün görüntüsü.....	51



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Apoptozisi düzenleyen proteinler.....	15
Çizelge 1.2.	Apoptozis ve nekroz arasındaki belirgin farklar.....	18
Çizelge 1.3.	Sentetik kaspaz inhibitörleri.....	31

## SİMGELER VE KISALTMALAR

APAF-1	Apoptotik proteazı etkinleştiren faktör
CARD	Kaspazı aktive eden bölge
CRM-A	Sitokin yanıt değiştirici A
CTL	Sitotoksik T lenfosit
DED	Ölüm oluşturan bölge
DISC	Ölümü başlatan sinyalleme yapısı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ER	Endoplazmik retikulum
FADD	Fas' a bağımlı ölüm bölgesi
FAK	Fokal adezyon kinaz
FAS	Hücre yüzey reseptörü
FLIP	Fllice İnhibitör Protein
HPV	İnsan papilloma virüsü
IAP	Apoptozis inhibitör proteini
ICE	İnterlökin 1 $\beta$ dönüştürücü enzim
N	Newton
NFP	Nörofilament proteinleri
NF $\kappa$ B	Çekirdek kapa B faktörü
NGF	Sinir büyüme faktörü
p53	Pro-apoptotik protein
PAK-2	p21 ile etkileşen kinaz
PIDD	p53 uyarıcı protein
RAIDD	RIP ile ilişkili ICE1\CED3 benzeri protein
TNF	Tümör nekroz faktör
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü
TRADD	TNFR' e bağlı ölüm bölgesi

## 1. GİRİŞ

Son otuz yılda histopatoloji, genetik ve moleküler biyolojide yapılan yoğun araştırmalar bütün hayvansal hücrelerin kendilerini öldürecek genetik bir düzene sahip olduğunu ortaya koymuştur. Normal koşullar altında zedelenmiş veya yaşlanmış hücreler organizmanın hücresel homeostazisinin sağlanması için apoptozis olarak adlandırılan hücre ölümü ile kendilerini feda ederler. Hücresel ölümden en önemli görevlilerden biri kaspaz denilen enzimlerdir. Hücrenin bir nevi ölüm makinalarıdır.

Omurilik yaralanmaları günlük aktivitenin kısıtlanmasına neden olan ve yaşam kalitesini etkileyen temel bir sağlık sorunudur. Oldukça sık görülen spinal kord (omurga ve omurilik) yaralanmaları hayat boyu devam eden sakatlıklara neden olduğu için büyük bir önem taşımaktadır. Spinal korda yönelik her türlü hasar etkeni, spinal kordun iskemisine ve zedelenmesine neden olur [1].

*İskemi*, bir dokuyu besleyen kan damarlarının, belli bir zaman dilimi içinde bir pıhtı veya mekanik etkenle tıkanması sonucu dokuların beslenmesinin bozulmasıyla ortaya çıkan patolojik bir durumdur [1, 2]. İskemik hasarın giderilmesi için bu kritik zaman dilimi içinde dokunun tekrar oksijen ile beslenmesi gerekmektedir. İskemi oluşmuş dokunun kan akışının, ilaçlarla veya mekanik müdahalelerle tekrar sağlanmasına *reperfüzyon* denilmektedir. İskeminin kritik süresi dolmadan, doku reperfüze edilirse hücreler ölümden kurtulabilir. İskemi süresinin uzaması reperfüzyona rağmen ölüm riski olan hücrelerin sayısını artırır ve dokuda geri dönüşümsüz hasarlara yol açabilir.

Spinal kord, iskemiye en duyarlı organdır [1]. İskemi sonrası gelişen spinal kord hasarında pek çok faktör etkilidir. Metabolizmanın canlılığının sürdürülmesi için ihtiyaç duyulan enerji eksikliğinin yanında oksidatif stres, eksitotoksisite (glutamat artışı) ve gen ekspresyonundaki değişiklikler önem taşır. Bu faktörler arasında belkide en önemlisi reperfüzyon sonrasında oluşan serbest oksijen radikallerine bağlı hücre membranındaki lipidlerin peroksidasyonu ve yaygın hücre ölümü olarak kabul edilmektedir. Serbest oksijen radikallerinin sitokinler üzerinden sinir dokusunda iskemi ve reperfüzyon sonrası oluşan inflamatuvar reaksiyonların gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle bu toksik radikallere yönelik girişimler sinir dokusunun iskemi reperfüzyon hasarından korunmasında büyük önem taşımaktadır [3].

Organizmada serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Bu sistemin düzenli işlemesi organizmanın sağlıklı bir biçimde yaşamını sürdürmesi bakımından oldukça önemlidir. Ancak iskemi sonrasında yüksek miktarda oksijenin süratli bir şekilde sisteme dahil olması sonucunda serbest radikal miktarındaki artış doğal savunma sistemini aşmakta ve sonuçta hücre hasarına kadar giden bir patolojik durum ortaya çıkmaktadır [1].

İskemik yaralanma sonrasında spinal kordda, nöronlarda ve glial hücrelerde hücre ölümünün bir şekli olan apoptozis gözlenir. Hücre apoptozisinden sorumlu olan kaspazlar iskemi sonrasında ve genetik kontrolle aktive olurlar. Özellikle kaspaz-3 efektör kaspaz olarak bilinir ve DNA tamir mekanizmasında yer alan enzim ve moleküllerin parçalanmasında aktif rol oynar. Dolayısıyla kaspaz-3 enziminin aktifliği apoptozis olayında oldukça önemlidir [4].

Birçok serbest radikal süpürücü ve antioksidanın iskemi-reperfüzyon hasarında yararlı etkileri gösterilmiştir. Pineal bezden salgılanan melatonin, direk olarak radikal süpürücü ve güçlü bir antioksidandır. Bununla birlikte melatoninin yüksek lipofilik bir yapıya sahip olduğu çok iyi bilinmektedir [5, 6]. Bu özelliği sayesinde hücrenin tüm komponentlerine kolayca girebilir ve iskemik dokuda oluşabilecek hasarlara karşı koruyucu olabileceğini kanıtlamaktadır [1].

Yaptığımız bu çalışmada, spinal kord iskemi oluşturulan sıçanlarda apoptozisten birinci derecede sorumlu olan kaspaz-3 enzim aktivitesi ve güçlü bir antioksidan olan melatoninin koruyucu etkisinin özellikle anti-apoptotik özelliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 1.1. Kaspazlar ve Apoptozis

Kaspazlar apoptozisde önemli bir yer teşkil ederler [4, 7]. Apoptozis gelişim sırasında ve normal hücrel homeostazis' in sağlanmasında aktif rol oynar. Bir sistein proteaz olan kaspazlar apoptozisin iç veya dış sinyallerle (DNA hasarı, UV vb.) uyarılması sonucu aktifleşerek hücreyi geri dönüşümsüz bir yola sokarlar [8]. Bu süreçte kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)' a neden olurlar. Bu mekanizma hücre ölümü esnasında (fizyolojik veya orta şiddette zedelenme sonrası) yüksek oranda korunmakta ve zarar görmemektedir [9].

Kaspazların apoptozise olan katkıları iyi planlanmış bir askeri operasyonu andırmaktadır. 15 çeşit olan kaspazlar apoptozisin farklı aşamalarında görev almaktadırlar. Kaspazların herhangi bir inhibitör (FLIP, Crm-A) tarafından aktiviteleri engellenmediği sürece hücre ölümünde aktif rol oynarlar [8, 10].

Apoptozis sırasında sitoplazmadaki major belirleyici faktör kaspaz aktivasyonudur ve mitokondriyel değişikliklerle ilişkisi vardır. Kaspaz aktivasyonunu takiben yapısal proteinlerin (aktin, fodrin, lamin A-B vb.) yıkımı gerçekleşir [7]. Kaspazlar tıpkı makaslar gibi hücrede, çekirdekteki yapı proteinlerini ve enzimlerini parçalayarak etkisiz hale getirirler. Kaspazlar ile önce hücrelerin etrafı ile olan ilişkileri kesilmekte, sonra hücre iskeletini yeniden organize etmektedirler. En son da DNA replikasyonunu ve tamirini sonlandırmaktadırlar. Böylece DNA tahrip edilip, çekirdek yapısı bozulur, fagositoz için gerekli hücre sinyallerinin üretilip açığa çıkması sağlanır ve son olarak apoptotik cisimcikler hücrede bozulmaya yol açar [10, 11].

Kaspaz inaktivasyonu olan hücrelerde, hücre ölüm şeklinin apoptozisten nekroza çevrildiği dikkate alınır, kaspaz aktivasyonunun apoptozisdeki anlamı daha açık olarak görülür. Dolayısıyla kaspaz aktivasyonu olmadan apoptozisin olmayacağı belirgindir [7, 12].

## 1.2. Apoptozis

Apoptozis, eski Yunanca *apo* (ayrı) ve *ptosis* (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılmış bir sözcüktür. Bu nedenle bazı hücrelerin sonbahar yaprakları gibi adeta kuruyarak vücudu terketmesi ve arkadan gelen hücrelere yer açmasıyla gerçekleşen

hücre ölüm tipi, klasik Yunan tarihçisi olan James Cormack' ın önerisiyle "*apoptoz*" olarak adlandırılmıştır [7].

Apoptozis terimi, bilimsel olarak ilk defa İskoçyalı araştırmacılar Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır [4, 8, 9].

Apoptozis, gelişmiş organizmalarda hücrelerarası ilişkilerin gereği olarak artık gereksinim duyulmayan ve fonksiyonları bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan genetik olarak kontrol edilen bir olaydır [10, 11]. Ayrıca bu olayın gelişmekte olan omurgalı ve omurgasız canlıların yanı sıra bitkilerde de meydana geldiği görülmüştür [10].

Embriyonik dönemden başlayarak tüm yaşam boyunca apoptotik mekanizma mevcuttur. Bazı hücreler yıllarca yaşarken, bazıları ise sadece birkaç saat yaşarlar. Örneğin; bağırsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürken, derinin epidermal hücreleri 20-25 günlük bir süre sonunda ölmektedirler. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır [11, 12].

İlk önceleri hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmesine rağmen bugün patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bilinmektedir [4, 13, 14].

Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı ve fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir [10, 11].

Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir. Apoptozis, mitozisden 20 kat daha hızlı gerçekleşmektedir [15]. Mitozis (yapım) ve apoptozis (yıkım) dokuda sürekli bir denge halindedir [4, 12, 15]. Normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yeni hücre yapımının günde yaklaşık  $1 \times 10^{11}$  hücreyi bulduğu hesaplanmıştır [14, 15]. Bu dengenin apoptozisin lehine veya aleyhine bozulması birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunur. Görüldüğü gibi apoptozis mekanizması, organizmada doğru bir şekilde işlemelidir. Olmaması gerekirken gerçekleşen, hızlanmış veya tam tersine yavaşlamış apoptozis organizma için tehlikelidir. Apoptozisin gereksiz yere oluştuğu veya hızlandığı hastalıklara örnek olarak AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, insüline bağımlı diyabet, hepatit C enfeksiyonu gibi hastalıklar verilebilirken; apoptozisin yavaşladığı hastalıklara ise otoimmün hastalıklar ve kanser örnek olarak verilebilir [9, 10, 14, 16, 17].

### 1.2.1. Apoptozisin görüldüğü olaylar

Apoptotik hücreler organizmanın bazı hücre ve dokularında sürekli olarak oluşmaktadır ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir [14, 18].

Apoptozisin görüldüğü başlıca olaylar şunlardır:

#### A. Fizyolojik olaylar

1. Embriyogenez ve fütogenez sırasında normal gelişimin sağlanabilmesi amacıyla oluşmuş olan hücrelerin bir kısmı apoptozise gitmektedir. El ve ayak parmaklarının arası başlangıçta kapalıyken parmaklar arasındaki hücreler apoptoz ile yıkılmasıyla parmaklar ayrılır [10, 13, 16]. Fare pençelerinin embriyonik gelişimi sırasında da aynı olay gözlenmektedir (Şekil 1.1).

2. Kurbağaların metamorfoz sürecinde kuyrukları kaybolur ve böylece yetişkin forma geçerler [10, 12, 19]. Mağara balıklarında gözün dejenerasyonundan da aynı şekilde apoptozis sorumludur (Şekil 1.2).

3. İmmün sistemin çok önemli hücreleri olan T lenfositler, timusta olgunlaşırlar. Bu hücrelerin etkisiz olanları veya organizmanın kendi dokularına karşı reaksiyon verme potansiyeli taşıyanları kan dolaşımına girmeden önce apoptozisle ortadan kaldırılır [13, 19, 20].

4. Beyinde sinapsların oluşumu sırasında bazı nöronlar apoptozisle ortamdan uzaklaştırılır [21, 22].

5. İnce bağırsaktaki kriptaların tabanlarında oluşan yeni hücreler, kriptaların uçlarına doğru göç ederler ve 3-4 gün süren bu göç sonunda ölüerek bağırsak boşluğuna dökülürler [4, 16, 19].

6. Derinin keratinositleri, derinin bazal tabakasında oluştuktan sonra derinin üst tabakasına doğru göç ederler. Bu göç esnasında derinin her tabakasında çeşitli farklılaşma özellikleri gösterip en sonunda derinin organizmayı dış etmenlerden koruyucu ölü tabakasını oluşturmak üzere apoptozise giderler [16, 19].

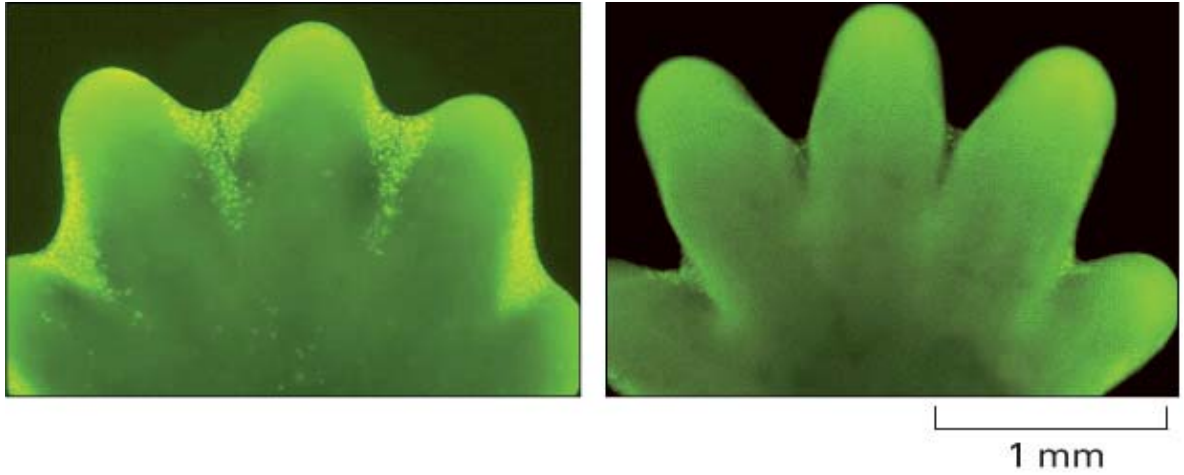
7. Erişkinlerde hormon yetersizliğine bağlı olarak oluşan organların işlevlerinin azalmasında apoptozis rol oynamaktadır. Örnek olarak laktasyon sonrası meme bezlerinde gerileme ve menapozda ovaryum foliküllerinin atrezisi (dejenerasyonu) verilebilir [4, 13].

8. Menstruasyon esnasında uterusun iç duvarındaki hücreler ölürler ve menstruasyon kanı ile uzaklaştırılırlar böylece uterusun iç tabakası olan endometrium apoptozis ile

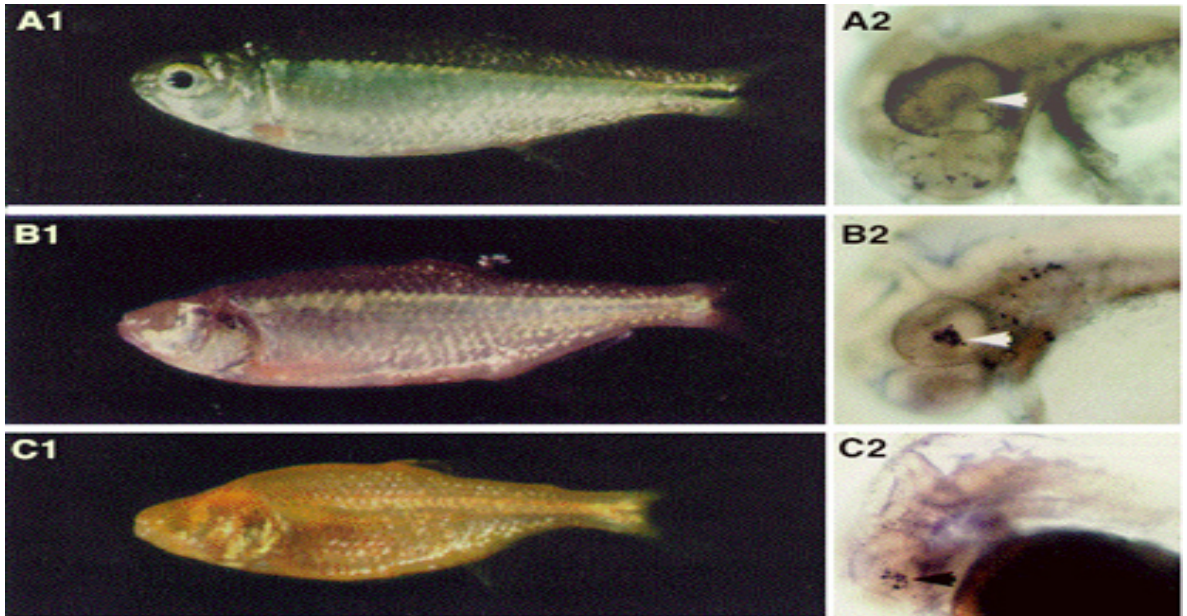
dökülerek uzaklaştırılır [16, 19].

9. 1mm uzunluğunda bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*' in başlangıçta 1090 olan hücre sayısının 131 tanesi apoptozisle azalır. Böylece hermofrodit olan kurtçuk yetişkin forma dönüşür [8, 14].

10. Yaşlılıkta apoptozis izlenmektedir [5, 6].



Şekil 1.1 Fare pençelerinin embriyonik gelişimi



Şekil 1.2 Mağara balıklarında gözün dejenerasyonu



## **B. Patolojik olaylar**

1. Virüslerle enfekte olmuş veya kalıcı DNA hasarı oluşmuş hücreler, sıklıkla apoptozis yoluyla kendilerini öldürürler. Eğer bu hücreler, apoptozise gidemezse ileride kanser gelişimine neden olabilirler [15, 18].
2. Tümörlerde hem büyüme hemde gerileme aşamasında hücre ölümü gözlenmektedir (kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisi) [23].
3. Çeşitli zedeleyici etkenlere (ısı, radyasyon, antikanser ilaçları, hipoksi vb.) bağlı olarak hücre ölümü oluşmaktadır [15, 24, 25].

### **1.2.2. Apoptozisin bozulmasının sonuçları**

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, apoptozis yoluyla hücre ölümünün artması ya da azalmasının pek çok hastalığın oluşumunda etkin rol oynadığı gösterilmiştir [26, 27].

#### **Azalışı**

**-Malignite (Kanser):** Malign hastalıklar klasik olarak kontrolsüz hücre artışının olduğu hastalıklar olarak bilinmektedir. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen dolayısıyla beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisiyle malign hücrelere dönüşürler. Kansere neden olan bazı virüsler enfekte ettikleri hücrelerde fizyolojik apoptozisi engeller. Bu şekilde davranan iki tip Human papilloma virüsü (HPV)' nün serviks kanseri (rahim ağzı kanseri) oluşturdukları saptanmıştır. HPV virüslerinden biri E6 adında protein üreterek apoptozisi başlatan p53' e bağlanır ve apoptozisi inaktive eder. Bazı kanser türlerinde ise apoptozisin aktive olmasını sağlayan proteinleri etkileyerek apoptozis oluşumunu engellerler (lenfoma kanseri). Kanser hücreleri virüsler olmadan da apoptozisi engelleyebilir (B hücre lösemisi). Akciğer kanserinde ise p53 geni mutasyona uğramış veya kayıp olduğu pekçok hastada gözlenmiştir [11, 12].

**-Otoimmünite:** Virüsler hücreleri enfekte ettiklerinde girdikleri hücreye kendi proteinlerini sentezletirler. Oysa o hücrenin kendisi için gerekli proteinlerin yapımını durdururlar. Bu yüzden o hücrede apoptozis indüklenir ve hücre ölür (hepatit virüsleri vb.) [11, 15].

## **Artışı**

**-Nörodejeneratif hastalıklar:** Nöronlar sinaptik bağlantılar uygun şekilde kurulduktan sonra bir daha bölünemeyen yani çoğalamayan hücrelerdir. Dolayısıyla yenilenemediklerinden ömür boyu yaşarlar. Oysa Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi hastalıklarda apoptozisi tetikleyerek nöronların öldüğü bilinmektedir [15, 26, 27].

**-İskemi-Reperfüzyon hasarı:** Çeşitli yaralanmalar sonucu farklı dokularda meydana gelen hasarlarla dokulara yeterli besin sağlanmayabilir. Bu durumda hücreler apoptozise gider ve hasar devam ettikçe apoptozisin hızı artar ve hücre geri dönüşümsüz bir yola girer [28, 29].

**-AIDS:** AIDS' in en önemli belirtisi CD4 T-hücrelerinin (lenfosit) kanda çok düşük seviyelere inmesidir. Bu düşüşe hasta etkin immün cevap veremez ve hücre ölümü gözlenir [11, 19].

**-Toksik Nedenli Karaciğer Hasarı:** Bilindiği gibi vücuda alınan toksik maddelerin detoksifikasyonu karaciğerde gerçekleşmektedir. Bu toksik maddeler apoptozisin başlamasını tetikleyerek hücre ölümünü hızlandırır [30].

**-İnsüline Bağımlı Tip Diyabet:** Bu hastalıkta insülin salgılayan hücreler apoptozisle ölmektedir [4, 19].

Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar **apoptozis** ve **nekroz**' dur. Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir [8, 14, 31].

### **1.2.3. Apoptotik hücre ölümünün aşamaları**

Apoptozis hücrenin içinden veya dışından gelen sinyallerle başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile sona erer [10, 13, 16].

- I) Apoptozisin başlatılması**
- II) Hücre içi proteazların aktivasyonu**
- III) Hücre içi biyokimyasal ve morfolojik değişimler**
- IV) Fagositoz**

### 1.2.3.1. Apoptozisin başlatılması (Sinyal üretimi)

Hücrenin apoptozise gidebilmesi için ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek hücre içi veya hücre dışı bir sinyale ihtiyaç vardır [15, 31].

#### ***Hücre Dışı Sinyaller***

- a) Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği
- b) Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu
  - FAS-FAS Ligand aracılığıyla gerçekleşen apoptozis
  - TNF aracılığıyla gerçekleşen apoptozis
- c) Sitotoksik T lenfosit aracılığıyla gerçekleşen apoptozis
- d) Dış etmenler (iskemi, toksinler, radyasyon)

#### ***Hücre İçi Sinyaller***

- a) DNA hasarı
- b) Hücre içi kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) düzeyi artışı
- c) Hücre içi pH artışı
- d) Metabolik veya hücre siklus bozuklukları

#### **Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller**

***a) Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği:*** Hücreler çevre hücrelerden ve ekstraselüler matriksden gelen yaşam sinyallerine ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller düzenli bir şekilde ve yeterli miktarda olmazsa hücreler apoptozise giderler. Örneğin nöronlar sinir büyüme faktörü (NGF) yetersizliğinde apoptozis gösterebilirler. Çevreden gelen sinyallerin kesilmesi ile hücre ölümü başlamaktadır. Büyüme faktörlerine bağımlı hücre kültürlerinde büyüme faktörleri çekildiği zaman hücrelerin metabolizmalarında ani bozulmalar ve hücre siklusunda duraklama olduğu gözlenmiştir (sitokin, büyüme hormonları) [12, 13, 16].

***b) Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu:*** Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler. Apoptozisde rol alan membran proteinleri içinde en önemli grup tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Bu reseptörlerin biyolojik etkileri çeşitlidir ve apoptozis ile sınırlı değildir. Bir kısmı

apoptozis oluştururken bir kısmı proliferasyona (hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalması) neden olur. Bir kısımda her ikisinde de görev alır. TNFR içinde apoptoz oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1` dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan parçaları “adaptör proteinlere” bağlanır. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlarda apoptozis için başlatıcı olan kaspazlara bağlanırlar (prokaspaz 8) [7, 8, 16, 32].

### ***1- Fas-Fas Ligand aracılığıyla gerçekleşen apoptozis:***

Bu tip apoptozis hücre yüzey reseptörü olan Fas (CD95, APO-1) aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde olan parçası Fas adaptör proteinle (FADD-Fas adaptör protein with a death domain) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini (death inducing signal complex-DISC) oluşturur. Bu olayda prokaspaz 8` in aktifleşmesini sağlar (Şekil 1.3) [12, 14, 26, 33].

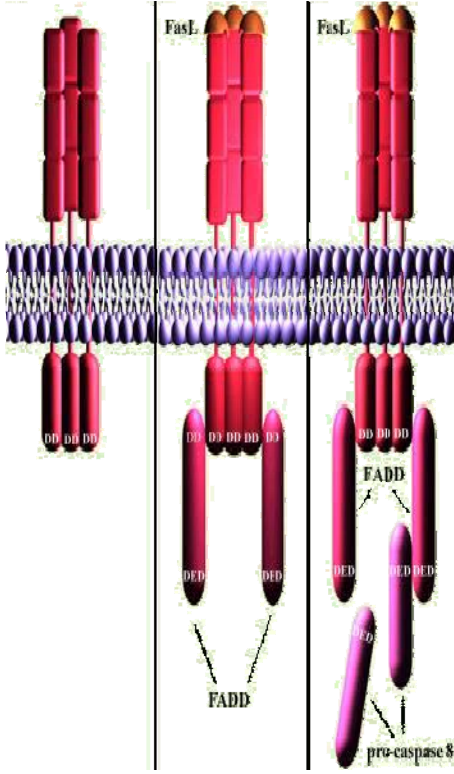
Fas Ligand membrana bağlı veya çözülebilir olabilir. Çözülebilir Fas ligand (FasL, CD95L) immün sistem hücreleri tarafından oluşturulur. Bu ligantın T hücreleri membranında bulunan Fas reseptörlere bağlanmasıyla, immün reaksiyonla aktive olmuş ve görevlerini tamamlamış olan lenfositlerin apoptozisle yok edilmeleri sağlanmış olur [33, 34].

### ***2- TNF (tumor necrosis factor) aracılığıyla gerçekleşen apoptozis:***

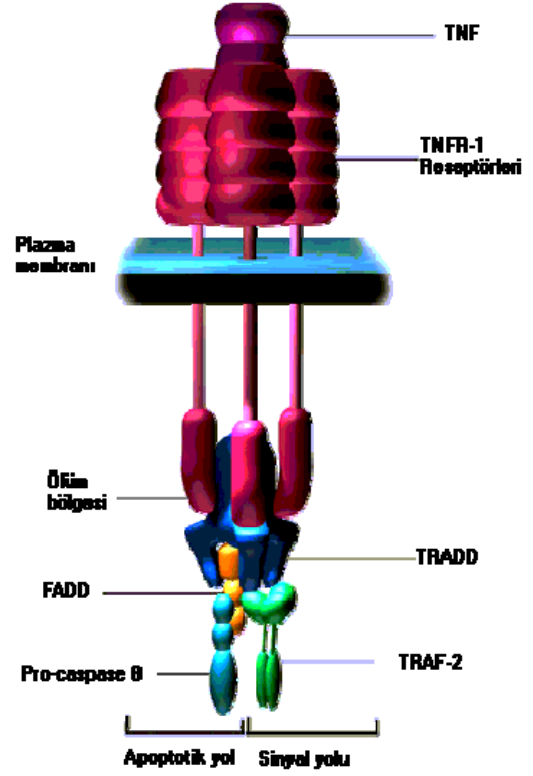
Bir sitokin olan TNF` nin TNF reseptörleri ile birleşmesi (TNRF1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör protein (TRADD- TNFR ) ile etkileşir. TRADD (adaptör protein ölüm bölgesi) daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz 8` i aktifleştirerek apoptozise yol açar (Şekil 1.4) [15, 18].

Fas reseptörünün aksine TNFR1` in TRADD` la etkileşmesi her zaman apoptozisle sonuçlanmaz. TRADD, FADD yerine başka adaptör proteinlere bağlanabilir. Bunun sonucunda önemli bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör-B (NF<sub>k</sub>B) harekete geçebilir. Bu durumda hücre canlı kalır. Hücrede hangi yolun seçildiği açık değildir. Ancak hücrede aktif NF<sub>k</sub>B (bazı tümörlerde bulunur) bulunduğu zaman hücrenin canlı kaldığı düşünülmektedir [20, 32, 33].

## (Ölüm Reseptörleri)



Şekil 1.3 Fas-Fas Ligand aracılı apoptozis



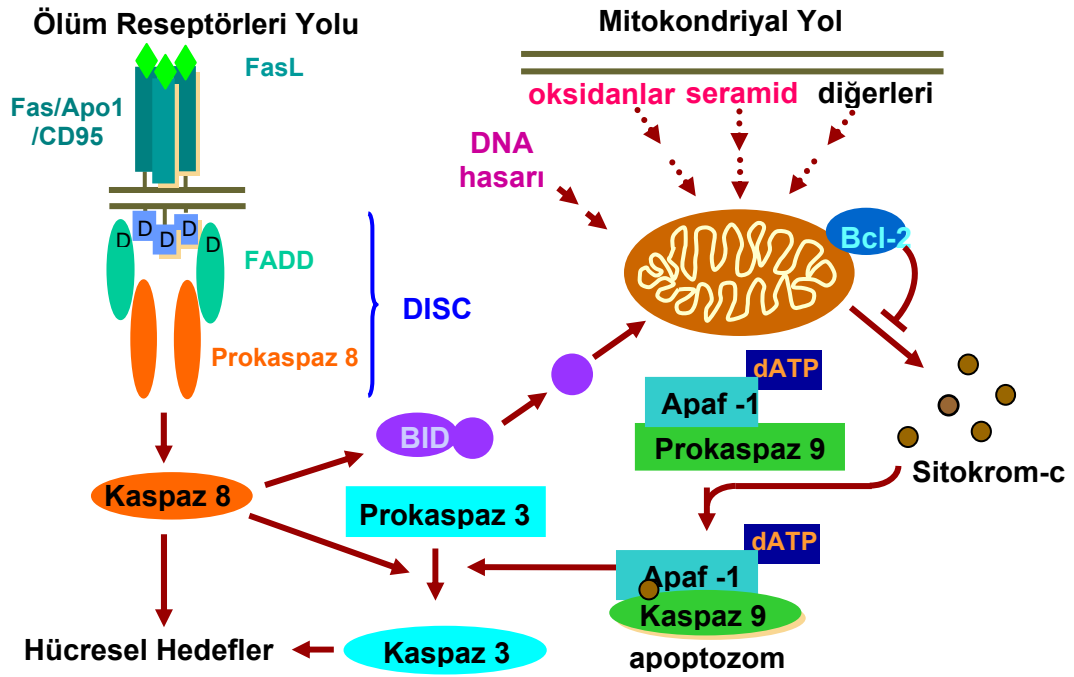
Şekil 1.4 TNF (tümör nekroz faktörü) aracılı apoptozis

**c) Sitotoksik T lenfosit aracılığıyla gerçekleşen apoptozis:** Sitotoksik T lenfositler (CTL) infekte olmuş konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. CTL'lerin ana görevi malign veya virüs ile infekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir. Yabancı antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. CTL'ler sitoplazmalarında granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen apoptozis oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler. Perforin, transmembran por oluşturucu proteindir. CTL'ler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak granzim B salgırlar. Granzim B hedef hücrelere giderek kaspazları aktive eder [7, 12, 15, 16].

**d) Hücrelerin maruz kaldığı dış etkenler:** Hipoksi, ısı, antikanser ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apoptozise neden olabilirler. Bu etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptozis meydana getirirler [12, 24, 34].

## Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller

*a) DNA hasarı:* Hücrede herhangi bir nedenle (radyasyon, kemoterapi) DNA hasarı oluştuğunda eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusu G1 fazında durdurulur ve hücreye DNA' sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozisine neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir [35]. Tümör baskılayıcı bir gen olan p53 geni insan tümörlerinde %80 mutasyona uğradığı tespit edilmiştir. Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p21 geni hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücrenin siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenmiş olur. p53 geni DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse hücre siklusundaki blok kalkar [36]. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni bax proteinini (bcl-2 grubu proteinlerinden, pro-apoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (Şekil 1.5) [10, 19, 29, 35].



Şekil 1.5 Apoptotik yollar ve hedefleri

**b) Hücre içi kalsiyum ( $Ca^{++}$ ) düzeyi artışı:** Apoptotik süreç boyunca hücre içine sürekli kalsiyum girişi olur. Sitoplazmadaki  $Ca^{++}$  iyonu miktarındaki hafif artış c-myc, ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptozise gitmesine neden olur. cAMP ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler. Hücre içi cAMP konsantrasyonundaki artışın çeşitli hücre tiplerinde apoptozisi uyardığı gözlenmiştir.  $Ca^{++}$  dan bağımsız olarakda apoptozisin gerçekleşebileceği gösterilmiştir. Sitoplazmada artan  $Ca^{++}$ , inaktif durumdaki  $Ca^{++}$  bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptozise özgü internükleozomal DNA kırıklarının oluşmasına neden olur [33, 37].

Kalsiyum iyonları hücre içinde eşit oranda dağılmamıştır. Endoplazmik retikulum içinde sitoplazmadan daha fazla  $Ca^{++}$  iyonu mevcuttur. Endoplazmik retikulumda yüksek  $Ca^{++}$  iyonu olmasını sağlayan ve sitoplazmadan  $Ca^{++}$  taşıyan  $Ca^{++}$ -ATPaz pompasının inhibe edilmesi durumunda, sitoplazmada  $Ca^{++}$  yoğunluğunun artması ile hücrenin apoptozise gittiği gözlenmiştir [11, 19].

Endoplazmik retikulum aracılığıyla gerçekleşen apoptozis mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleşen apoptozisden farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılığıyla gerçekleşen apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalar  $Ca^{++}$  seviyelerinin ve kalpainin ER' u etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7' nin salınımı ile prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı olduğu bulunmuştur. Aktifleşmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir, kaspaz-9 ile aktifleşerek kaspaz kaskadını aktive eder. Son çalışmalar, in-vitro ve in-vivo olarak kaspaz-12' nin kaspaz-9' u aktive ettiğini göstermiştir [19, 37, 38].

$Ca^{++}$  iyonu, inaktif durumdaki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi gizli enzimleri aktive ederek apoptozise neden olur [4].

**Kalsiyuma bağlı endonükleazlar:** Endonükleazlar sitoplazmada artan  $Ca^{++}$  tarafından aktif hale getirilir. DNA zinciri,  $H_1$  histon bölgesinden 180-200 baz çifti ve katları uzunluğunda parçalara ayrılır [12, 33, 37].

**Transglutamazlar:** Apoptozisde hücreler büzülür ve küçük parçalara ayrılır. Bu parçalar, transglutamazların yaptığı protein çapraz bağlanmaları ile kimyasal maddelere karşı dayanıklı hale getirilir [38].

**Proteazlar:** Proteazlar histonları ve kromatin yapısını düzenleyen proteinleri

parçalarlar. Kalsiyum bağımlı nötral bir proteaz olan “kalpin” hücrenin iskelet yapısını bozar. Lizozomal bir proteaz olan katepsin-D apoptozisin geç evresinde ortaya çıkan bir endopeptidazdır ve lizozomların proteolitik aktivitesinin oluşumunda önemlidir [32, 37].

***Lipit modifiye edici enzimler:*** Normal hücrelerin plazma membranlarında fosfolipid asimetrisi vardır (Membran fosfolipitlerinin hücre içi ve dışında kalan kısımları farklıdır). Bu asimetri ATP’ ye bağımlı fosfolipid translokaz enzimi tarafından sağlanır. Apoptotik süreç oluştuğunda bu enzim etkilenir ve zar asimetrisi bozulur. Makrofajlar hücreyi yabancı bir hücre olarak algılar ve fagosite ederler [12].

***Protein kinazlar:*** Protein fosforilasyonunda rol oynayan zar ve sitoplazma enzimlerinin apoptotik sinyallerin iletiminde önemli oldukları kanıtlanmıştır. Bu enzimlerden protein kinaz-A apoptozisi sağlarken, protein kinaz-C apoptozisi durdurur [39].

### **1.2.3.2. Hücre içi proteazların aktivasyonu**

İç ve dış sinyallerle hücre içinde bulunan bir grup proteaz aktive olur. Bu proteazlara “kaspaz” adı verilir [40]. Kaspazlar başlatıcı, sonlandırıcı ve inflamasyonda rol alanlar olmak üzere üç gruba ayrılır [38, 39]. Memeli hücrelerinde 15 çeşit kaspaz tespit edilmiştir [31, 41].

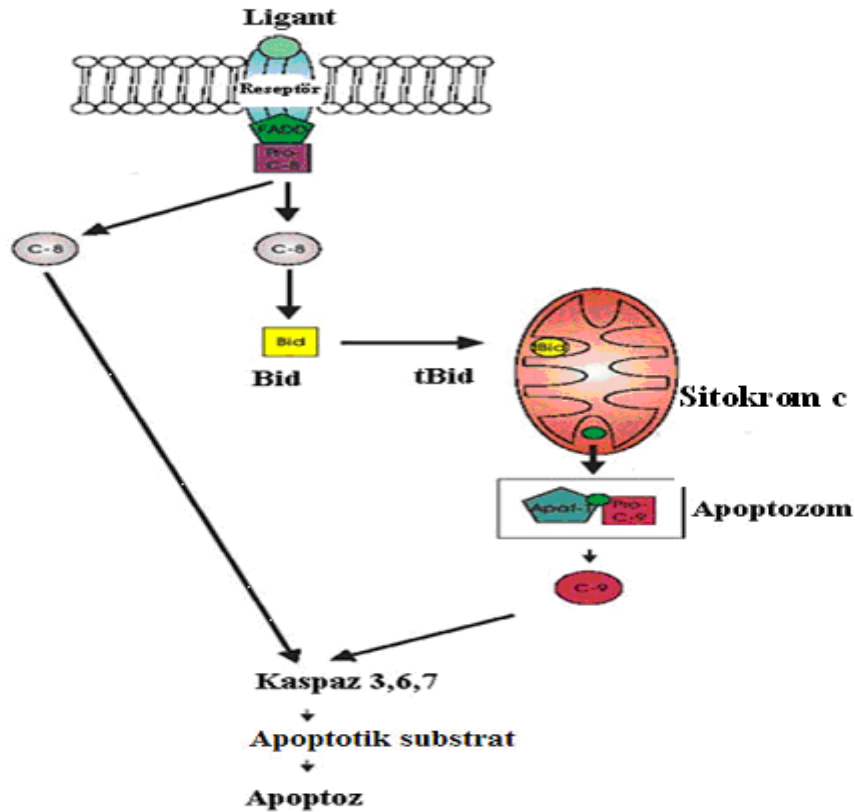
Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığıyla, iç sinyaller ise mitokondri aracılığıyla başlatıcı kaspazları, aktive olan başlatıcı kaspazlar da zincirleme olarak diğer kaspazları aktive ederler [39, 42]. İç sinyallerle oluşan apoptozisde mitokondri önemli rol oynar [40, 43]. Mitokondrinin aktivasyonu apoptotik süreçte geri dönülemez noktayı gösterir. Sinyaller dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına neden olurlar. Mitokondri dış zarının geçirgenliğini bazı proteinler ayarlamaktadır ki bunların en önemlisi bcl-2 grubu proteinlerdir [39, 43, 44]. Bcl-2 ailesi birbirine zıt iki gruptan oluşur. Bu gruptaki proteinlerin bir kısmı anti-apoptotik (apoptozisi baskılayıcı) bir kısmı pro-apoptotiktir (apoptozisi tetikleyici) (Çizelge 1.1). Bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom-c’ nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir (apoptozisin başlaması) yada sitokrom-c’ nin sitoplazmaya salınması baskılanır (apoptozisin inhibisyonu) [38, 39].



**Çizelge 1.1** Apoptozisi düzenleyen proteinler

<i>Anti-apoptotik Proteinler</i>	<i>Pro-apoptotik Proteinler</i>
Bcl-2	BAX
Bcl-xL	BAK
Bcl-w	BAD
Mcl-1	Bcl-xS
c-Abl	p 53
Rb	c-Fos, c-Jun
	BİD

Bcl-2 proteini anti-apoptotiktir ve mitokondri dış membranına ve apoptoz proteaz aktive edici faktör1 (Apaf 1)' e tutunmuştur. Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumunda serbest hale geçen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil eder [45]. Hücrenin içinden alınan apoptotik sinyaller Apaf-1' in mitokondriden ayrılmasına neden olur, bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Bu geçirgenlik artışı, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom-c' nin sitozole çıkmasına yol açar. Sitokrom-c' nin sitoplazmada Apaf-1, kaspaz-9 ve ATP ile birleşmesi ile oluşan yapıya "apoptozom" denir (Şekil 1.6) [39, 40, 46]. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3' ü aktive ederek apoptozise neden olur [47].



**Şekil 1.6** Apoptozis mekanizması

Bir hücrede hücre içi bcl-2/bax oranı hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceğine karar vermede son derece önemlidir. Eğer bax fazla ise hücre apoptozise gidecektir, bcl-2 fazla ise apoptozis inhibe olacaktır [38, 48].

İnsanda bcl-2 ailesine üye 23 gen tanımlanmıştır. Bu sayede dokuya spesifik ilaçlarının üretimi mümkün olacaktır [40, 44, 49].

### **1.2.3.3. Hücre içi biyokimyasal ve morfolojik değişimler**

Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozisten birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır [13, 19, 48]. Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentez edilirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kalkmakta ve böylece denge sağlanmaktadır [14, 15].

#### **Biyokimyasal Değişiklikler**

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinleri yıkarlar [46, 47].

##### **1. Hücre iskeletinin yıkılması:**

Kaspazların aktive olmasıyla, hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteinin aktif hale gelmesini sağlar. Böylece hücre normal şeklini kaybeder. Hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovillüslerin diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır [15, 19].

##### **2. DNA kırıklarının oluşturulması:**

Hedef proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkararak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren  $Ca^{++}$ - $Mg^{++}$  bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur [37, 39]. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılmalar oluşur [42].

##### **3. Hücre membran değişiklikleri:**

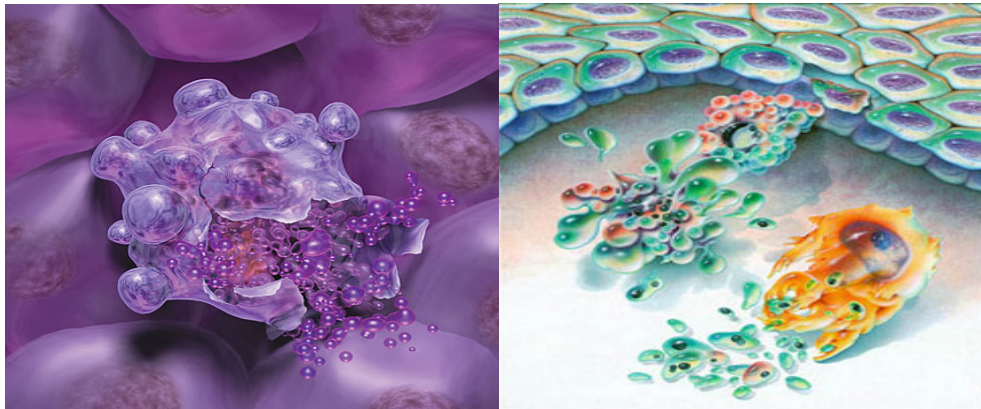
Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozulur. Sağlıklı hücrelerde plazma zarının iç yüzünde bulunan *fosfatidilserin* yer değiştirerek zarın dış yüzüne yerleşir. Bu değişim fagositik hücreler için sinyal görevi görür [15, 19]. Transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar, membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar [39].

## Morfolojik Değişiklikler

Hücreler özelleşmiş yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Böylece hücreler su kaybederek küçülüp, büzülürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir. Membranlar bütünlüklerini korurlar. Organeller ise genelde sağlamdır, bazen ribozomlarda çökme izlenebilir. Sitoplazmada yüzeye paralel olarak yerleşmiş olan mikrofilament kümeleşmeleri ve endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür. Bu genişlemelerin sitoplazmadaki suyun endoplazmik retikuluma geçmesi ile oluştuğu sanılmaktadır. Genişleyen sisternalar hücrenin yüzeyi ile birleşerek yüzeyde krater manzarası oluştururlar ancak mitokondriler genellikle normal yapılarını korurlar [16, 23].

Morfolojik olarak en önemli değişiklikler nükleusta izlenir. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak değişik şekil ve büyüklükte çöker. Elektron mikroskopundaki incelemede kromatinin yoğun granüler yarımay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği gözlenir [19]. Çekirdekte hücre gibi büzülür ve bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Nükleer porlar kromatinin membrana komşu olmadığı bölgelerde yoğunlaşırlar [7, 10].

Apoptoz hematoksilen-eozin ile boyanmış kesitlerde ışık mikroskopunda da izlenebilir. Hücreler koyu eozinofilik sitoplazmalı, bir veya birkaç parçalı çekirdekli olarak görünür. Çekirdek kromatininin, çekirdek membranının iç yüzüne yerleşmesi nedeniyle hilal veya yarımay şeklinde izlenebilir. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara ayrılır. İçlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller ve bazılarında çekirdek parçaları da mevcut olan “*apoptotik cisimler*” meydana gelir (Şekil 1.7) [4, 23].



Şekil 1.7 Apoptotik cisimler

#### 1.2.3.4. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar

Nekroz esnasında hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz, yüksek ATP seviyeleri apoptozis için gerekli olur. Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir [13, 19].

Buda mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir [39, 48].

Apoptozis hücrede yarattığı değişikliklerle nekrozun bir parçası gibi algılanabilir. Ancak nekrozdan farkları Çizelge 1.2' de gösterilmiştir.

**Çizelge 1.2** Apoptozis ve nekroz arasındaki belirgin farklar

<b>Apoptozis <i>İntihar</i></b>	<b>Nekroz <i>Katletme</i></b>
(Kontrollü ölüm)	(Kontrolsüz ölüm)
İç ve dış sinyallerle başlar.	Dış etkenlerle başlar. (iskemi, toksin, radyasyon)
Enerji gerektirir.	Enerji gerektirmez.
Tek hücre etkilenir.	Hücre topluluklarını etkiler.
Hücre büzüşür, fagosit olur.	Hücre şişer, patlar ve içeriğini çevreye boşaltır (Na,su girişi).
Fizyolojik bir olaydır.	Patolojik bir olaydır.
İnflamatuvar yanıt oluşmaz.	Belirgin bir inflamasyon vardır. (ağrı, kızarıklık, kabarıklık, yara izi vb)

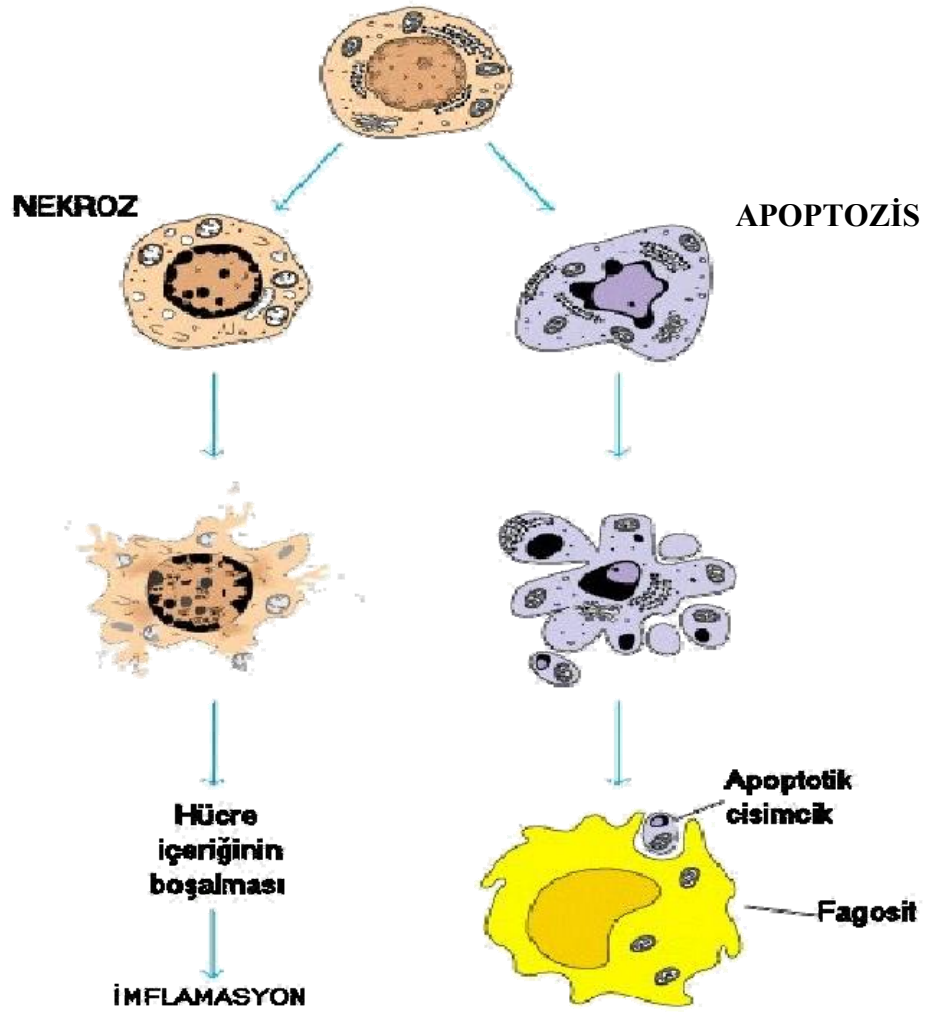
#### **Fiziksel Farklılıklar**

1- Apoptozis iç ve dış sinyallerle başlarken (büyüme faktörlerinin eksikliği, hücre yaşlanması, Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu, HIV, kanser ilaçları, çok şiddetli olmayan oksidatif stress vb.), nekroz sadece dış etkenlerle (iskemi, hipoksi, viral enfeksiyonlar, radyasyon, şiddetli oksidatif stress vb.) oluşur [19, 38].

2- Apoptozisde hücreler tek tek ölürken, nekrozda hücreler gruplar halinde ölür [11, 27].

3- Apoptozis hem fizyolojik (hormonal dengenin bozulması vb.) hemde patolojik şartlarda meydana gelirken, nekroz sadece patolojik etkiler sonucu gerçekleşir [13, 14].

4- Nekroza uğrayan hücre inflamasyona neden olur, kemotaktik maddeler yayar, lizozomal enzimler salınır ve böylece makrofajlar tarafından tanınıp fagosite edilir. Apoptozisde inflamasyon görülmez, apoptotik cisimciklerin oluşmasıyla komşu epitel hücreleri veya makrofajlar tarafından farkedilip fagosite edilir (Şekil 1.8) [11].



Şekil 1.8 Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar

## **Morfolojik Farklılıklar**

- 1- Apoptozisde hücre zarında veziküller oluşur. Nekrozda ise hücre zarında vezikül oluşumu yoktur, total parçalanma olur [16].
- 2- Apoptozisde zarı tomurcuklanmalar görülür ancak zar bütünlüğü bozulmaz. Nekrozda ise zar bütünlüğü bozulur [23].
- 3- Apoptozisde sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülürken, nekrozda sitoplazma ve mitokondride şişme, membranda yırtılma, kromatinde erime görülür ve iltihap oluşumu riskini artırır [19].
- 4- Apoptozisde hücre mitokondri, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere bölünerek son bulur. Nekrozda ise total hücre parçalanması olur yani hücre lizise uğrar [11, 16].
- 5- Apoptozisi başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisiyle organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapı oluşturur. Nekrozda ise organeller bozulur [27].

## **Biyokimyasal Farklılıklar**

- 1- Apoptozisde iyon kontrollü, enzimatik olaylar mevcuttur. Nekrozda iyon homeostazisi bozulmuştur [10].
- 2- Apoptozis enerji (ATP) gerektiren aktif bir süreç olup +4 °C’ de gerçekleşmez. Nekroz ise pasif bir süreç olup enerji gerektirmez +4 °C’ de gerçekleşebilir [23].
- 3- Apoptozisde rastgele olmayan, DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır. Böylece agaroz jel elektroforezinde apoptozis için karakteristik “ladder pattern” denilen merdiven şeklinde kırılmalar oluşur. Nekrozda ise DNA rastgele parçalanır. Agaroz jel elektroforezinde “smear” (dağınık, yapışkan) görüntüsü oluşur [40].
- 4- Apoptozisde hücre ölümünün erken safhasında (prelitik) DNA parçalanması gözlenirken, nekrozda hücre ölümünün geç safhasında (postlitik) DNA parçalanması görülür [19].
- 5- Apoptozisde mitokondri etkin bir rol oynarken nekrozda böyle bir durum yoktur [48].

### 1.2.3.5. Fagositoz

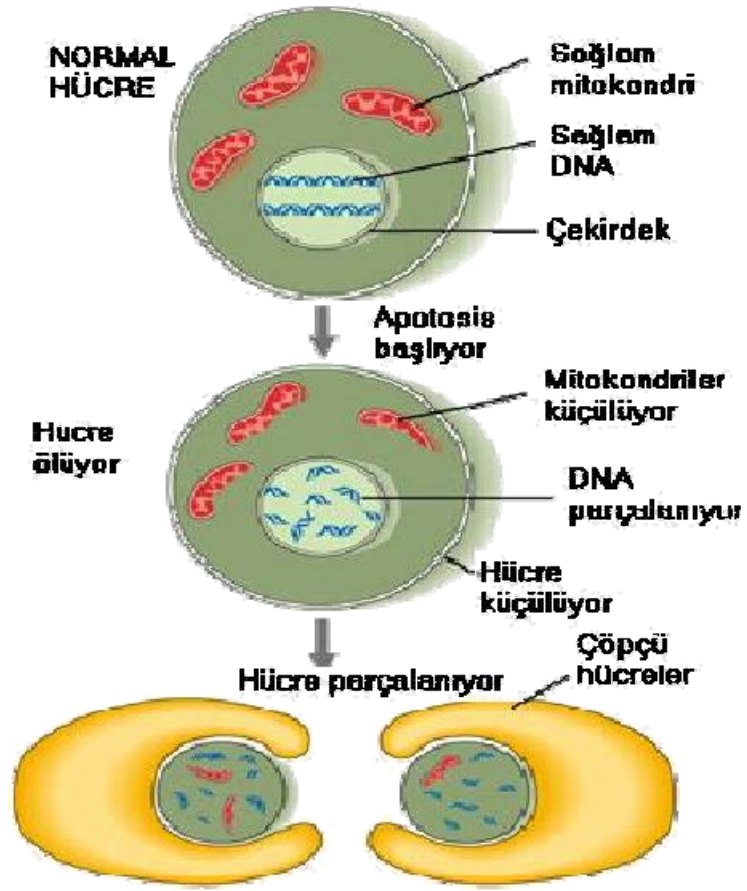
Ölüm mekanizması nasıl olursa olsun, ölü hücrelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Gerek nekroz gerekse apoptozisde ölü hücre fagositozla ortadan kaldırılır (Şekil 1.9) [18, 23]. Apoptozis sırasındaki hücre zarı değişimleri komşu hücrelerin ölü hücreyi fagosit etmesi için gerekli tüm uyarıları verecek şekilde düzenlenir. Oluşan apoptotik hücreler, hücreler arası alana dağılırlar veya lümene dökülürler.

Dokuda 4-9 saat tanınabilir halde kalan apoptotik hücreler daha sonra fagozomlar içinde birkaç saat kadar görülebilir, sonra da sindirilemeyen materyal olarak kalırlar [33].

Apoptotik cisimlerin makrofajlar tarafından tanınmasında, normalde hücre zarının iç membranda yer alan fosfatidilserinin apoptotik mekanizmayla birlikte hücre zarının dış kısmına çıkmasıyla olur [50]. Ayrıca fibronektin benzeri bir serum proteini olan ve doku hücrelerinin birbirine bağlanmasını kolaylaştırdığı bilinen vitronektin reseptörünün rol oynadığı belirlenmiştir. Apoptotik cisimlerin makrofajlarca tanınmasında rol oynayan diğer reseptörler; trombospondin reseptörleri olan  $\alpha$ vB ve CD-36 ile Fas reseptörüdür [40].

Trombospondin, trombositler tarafından sentezlenen ve hücre içi granüllerde depolanan bir glikoprotein olup, trombosit bağlanmasında otokrin büyüme düzenleyicisi olarak işlev görmektedir. Trombospondine trombosit dışında epitel hücrelerinin ekstraselüler matrikslerinde, düz kas hücrelerinde ve fibroblastlarda da rastlamak mümkündür. Fakat bu hücrelerdeki fonksiyonu bilinmemektedir. Fas, tümör nekroz edici faktör (TNF) ve sinir büyüme faktörü (NGF) ile yapısal benzerlik gösteren bir hücre yüzeyi proteini olup, apoptozisin başlamasında rol oynar [12]. Apoptotik hücrenin tanınmasında lektinin de rolü olabilir. Bilindiği üzere lektin, hücre yüzeyinde bulunan karbonhidrat yapısındaki reseptörlere bağlanabilen bir proteindir [4, 47].

Apoptozisde izlenen hücre zarı değişiklikleri, apoptotik hücre zarındaki bu moleküller aracılığı ile makrofajlara ve çevre hücrelere iletilerek hücrenin fagositozuna yol açar [19].



Şekil 1.9 Fagositoz

#### 1.2.4. Apoptozisin spinal kord yaralanmasındaki rolü

Spinal kord hasarının patogenezinde nekroz hücre ölümünün bilinen tek mekanizmasıydı. İlk olarak santral sinir sistemi hasarında apoptozisin varlığı fokal ve global serebral iskemide gösterilmiştir [51].

Akut spinal kord yaralanması sonrası gelişen nörolojik hasar primer mekanik yaralanmayla birlikte yaralanma sonrasında gelişen sekonder yaralanmayı izleyen nekroz ve daha geç görülmeye başlayan apoptozise bağlıdır. Spinal kord iskemisi sonrası nöronlarda sekonder yaralanmayı oluşturan ve apoptozise götüren olaylar, hücre içi  $Ca^{++}$  artışı, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonun artışıdır. Spinal kord yaralanmalarında sekonder olaylara bağlı hücre ölüm mekanizması kaspaz-3 ve kalpaine bağlıdır. Mitokondriye ait yaralanmaları olan lezyonlarda yaralanmadan 4 saat



sonra nöronlardan kalpain salınımında ciddi bir artış görülmüştür [22, 27]. Spinal kord lezyonlarında yaralanmayı takiben kaspaz aracılığıyla gerçekleşen apoptozis, sitozole sitokrom-c salınımı ve bax/bcl-2 oranında artış görülür. Böylece nöronlarda ve glial hücrelerde apoptozis gözlenir [28, 29].

Spinal yaralanmaların şiddeti ve seviyesi son derece önemli olup hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceğine karar verilir. Özellikle iskemiyle hücre homeostazisini sağlayan Na-K pompası benzeri mekanizmaların çalışması engellenir. İskemik dokuda serbest radikallerin etkisiyle göç eden nötrofiller, salgıladıkları proteazlar ile endotel hücre parçalanmasına neden olurlar [31, 34].

Oksijen ve glukozun ortamda bulunmadığı hücre kültürlerinde nöronlar esas olarak eksitotoksik nekrozla ölmekte, fakat eksitotoksisite kombine uygulanan NMDA reseptör ve AMPA/kainate reseptör antagonistleri ile bloke edildiğinde nöronlar apoptozise geçiş yaparak ölmektedirler [38, 43]. Apoptozisin veya bir diğer adıyla programlanmış hücre ölümünün spinal kord yaralanmasını takip eden doku hasarına katkıda bulunan çok önemli bir yol olduğu sıçan, maymun ve insanlarda yapılmış çalışmalarda gösterilmiştir [52].

Apoptozis sıkı düzenlenmiş bir süreç olup bu bulgular spinal kord yaralanmasının tedavisi için apoptotik yolların müdahalesine fırsat sağlar [53].

### 1.3. Kaspazlar

Apoptozisde hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler olarak bilinirler [39, 50]. Kaspazlar (Cystein-containing **AS**partate **Prote**ASEs) sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptit bağına kırarlar [38]. Merkezlerinde sistein yer aldığı için sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir. Şu ana kadar 15 tanesi tanımlanmış olup farklı isimlerle de adlandırılmaktadırlar (Şekil 1.10). 12 tanesi insanda tespit edilmiştir [41]. Hücrede zimojen (inaktif) olarak bulunurlar ve proteolitik olarak birbirlerini aktiveleştirirler. Hücrede düşük konsantrasyonlarda monomer halinde bulunurlar [50, 54]. Kaspaz-15 yeni belirlenmiş bir enzim olup, sadece plesantali memelilerden domuz ve köpekte tanımlanmıştır. İnsanda ve sıçanda bu enzim bulunmamaktadır [41].

Kaspazlar apoptozisi aktive eden sinyaller tarafından tetiklenip, apoptozisin her üç yolunda da aktif olarak rol alırlar [39].

- Kaspaz-1 (ICE)
- Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)
- Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)
- Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICeren)
- Kaspaz-5 (ICErelm, TY)
- Kaspaz-6 (Mch2)
- Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)
- Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)
- Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)
- Kaspaz-10 (Mch4)
- Kaspaz-11 (ICH-3)
- Kaspaz-12
- Kaspaz-13 (ERICE)
- Kaspaz-14 (MICE)
- Kaspaz-15

Şekil 1.10 Kaspazlar ve diğer isimleri

### 1.3.1. Kaspazların yapısı ve sınıflandırılması

Kaynağına ya da ölüm uyarana bakılmaksızın apoptozise giden tüm hücrelerde sistein proteaz aktivitesi gözlenmiştir. Kaspazların apoptozla ilk ilişkisi bir nematod olan *Caenorhabditis Elegans'* in genetik analizi sırasında ortaya çıkmıştır [40, 55]. CED-3, CED-4 ve CED-9 genleri *Caenorhabditis Elegans'* daki apoptozu düzenlemekte olup memelilerde de bu genlerin homologlarının bulunduğu anlaşılmıştır. Memelilerdeki karşılığı ise ICE (interleukin-1 beta dönüştürücü enzim) yada diğer ismiyle kaspaz-1' dir. Her ne kadar kaspaz-1 hücre ölümüyle açık bir ilişkiye sahip olmasada, ilk önce tanımlanan bu geniş ailenin bir üyesidir [15, 50].

Bcl-2, Apaf-1 ve kaspaz proteaz ailesi, CED-3, CED-4 ve CED-9' un memelilerdeki analogları olarak tanımlanmıştır. Kaspaz ailesi CED-3' ün, Bcl-2 ailesi ise CED-9' un homologudur [39].

Kaspazlar benzer aminoasit dizilimine sahiptirler, yapısal ve substrat spesifikliğinde benzer özellikleri paylaşırlar [38]. Tüm kaspazlar proenzimler şeklinde üretilirler. Bu durumda kaspazlar 3 kısımdan meydana gelir (30-50 kD). Bunlar;

**NH<sub>2</sub> terminal kısım** (sub-2), **geniş altünite** (20 kDa veya p20) ve **küçük altünite** (10 kDa veya p10)' dir. Terminal kısım yüksek değişkenlik gösteren bir dizilime sahiptir ve uzundur, aktivasyonun düzenlenmesini içerir. Diğer iki kısım ise tüm kaspazlarda benzer özellikler gösterir [55].

Proteolitik süreç içinde aktivasyona uğrayan kısımlar arasında yani geniş ve

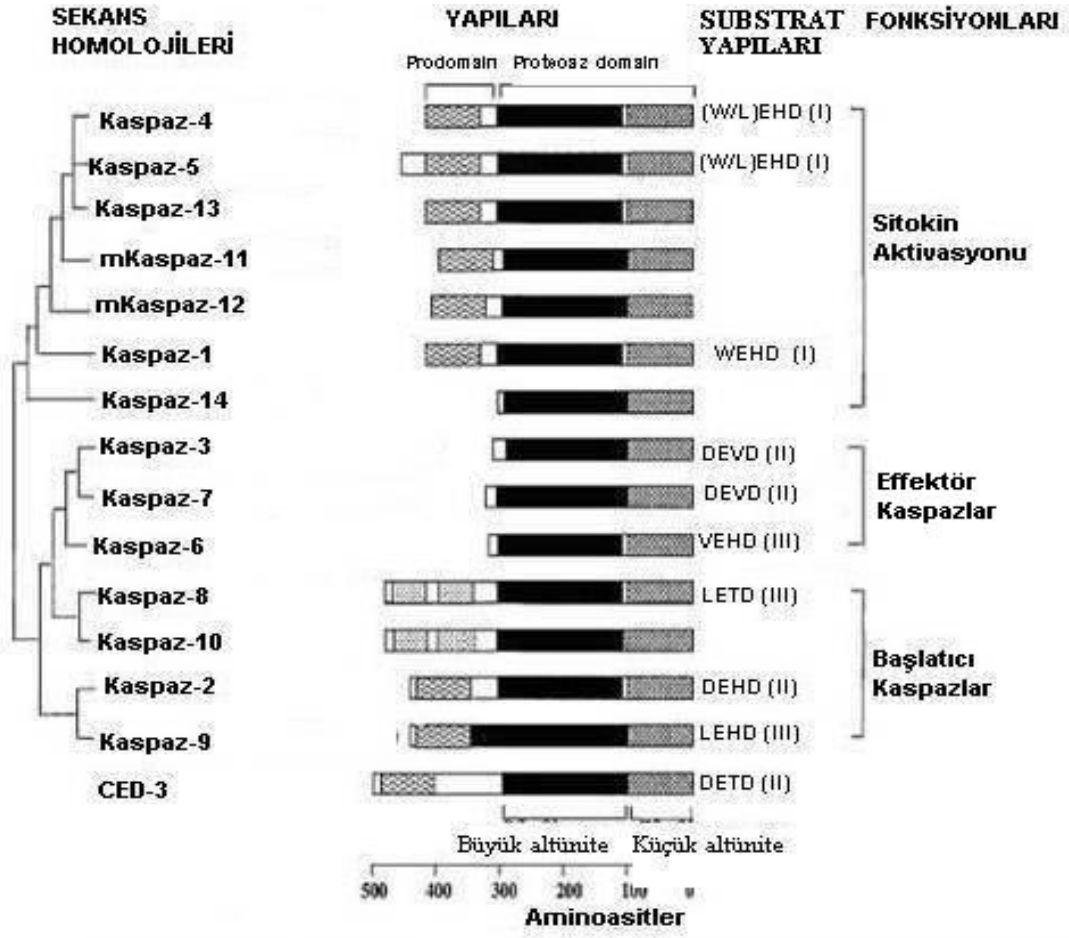
küçük subunitler arasında heterodimer oluşturacak şekilde birleşmeler oluşur. Bazı prokaspazların yapısında iki alt üniteyi birbirinden ayıran 10 aminoasitlik bağlayıcı bölgelerin varlığı tespit edilmiştir [50].

Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana gruba ayrılırlar (Şekil 1.11).

**1- Başlatıcı kaspazlar (apoptozisi başlatanlar):** Kaspaz 2, 8, 9, 10' nu içermektedir. Uzun prodomaine sahiptirler. Bu kaspazlar pro-apoptotik sinyalleri alarak, sinyalin alt kısmında kalan diğer kaspaz üyelerinin aktive olmasını sağlarlar. Herbiri 100 aminoasitten oluşan başlatıcı kaspazlar, transmembran proteinleri veya sitotoksik etkiye sahip maddeler ile etkileşerek aktif hale geçerler. Bu kaspazlar, adaptör ve düzenleyici proteinlerin farklı kombinasyonları ile etkileşime girerek apoptotik mekanizmanın hücre içerisinde farklı yönlerde devam etmesine neden olurlar. Kaspaz-2' nin aktivasyonu için ölüm bölgesi içeren PIDD (p53 uyarıcı protein) ve adaptör protein olarak RAIDD (RIP ile ilgili protein) olması gerekir [35, 38].

**2- Eftör kaspazlar (apoptozisi yürütenler):** Kaspaz 3, 6, 7' yi içermektedir. Kısa prodomaine sahiptirler. Bu kaspazlar çeşitli hücre içi proteinleri enzimatik reaksiyonlarla parçalarlar ve apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar [14, 19].

**3- Sitokinleri aktive eden kaspazlar:** Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14' ü içermektedir. Hücre sinyal iletiminde önemli role sahip olan sitokinlerin aktivasyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Kaspaz 1, 4, 5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler [15, 39].



Şekil 1.11 Kaspazların sınıflandırılması

Kaspaz 14' ün dışında tüm inflamatuvar ve başlangıç kaspazları uzun bir subunitte sahiptir. Uzun subunit “Ölüm oluşturan bölge (DED)” veya “Kaspazı aktive eden bölge (CARD)” yi kapsar. Bu alanlar prokaspazlar arasında protein-protein aracılı etkileşime neden olur ve prokaspazların aktivasyonun da önemli rol oynar. Karşit olarak efektör kaspazların kısa subunitleri arasında benzer bir etkileşim beklenmez [40].

Aktif kaspazların 3 boyutlu yapısı tespit edilmiş olup 2 heterodimer, 2 geniş subunit tarafından çevrelenmiş 2 komşu küçük subunitle karşı yönde bir tetramer oluşturur. Her bir heterodimer substratın bağlanması ve katalizisi için gerekli küçük ve geniş subunitler içerir [50].

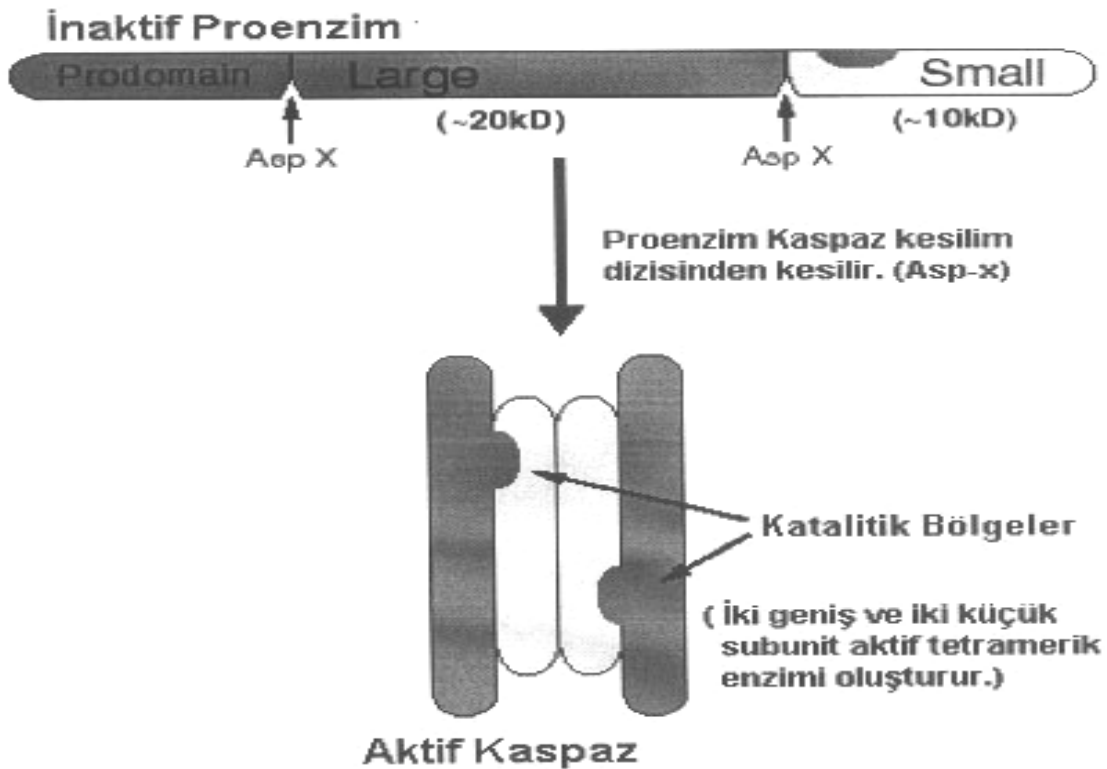
Kaspaz-1 ve -3' ün kristal yapısı incelendiğinde her ikisininde, iki heterodimer yapının birleşerek tetramer yapısını oluşturduğu görülmektedir.

### 1.3.2. Kaspazların aktivasyonu

Hücre ölümü özel bir mekanizma (kaspaz kaskadı) ile oluşmaktadır. Bu mekanizma hücre ölümü esnasında yüksek oranda korunmakta, zarar görmemekte ve sürekliliği sağlanmaktadır. Bu değişim tekrarlı ve sıralı olup 30-60 dk. içerisinde tamamlanmaktadır [56].

Kaspazların en az 3 yolla aktive edildiği belirlenmiştir. Bunlar; otoaktivasyon, transaktivasyon, non-kaspaz proteazları ile proteolizdir [38, 50].

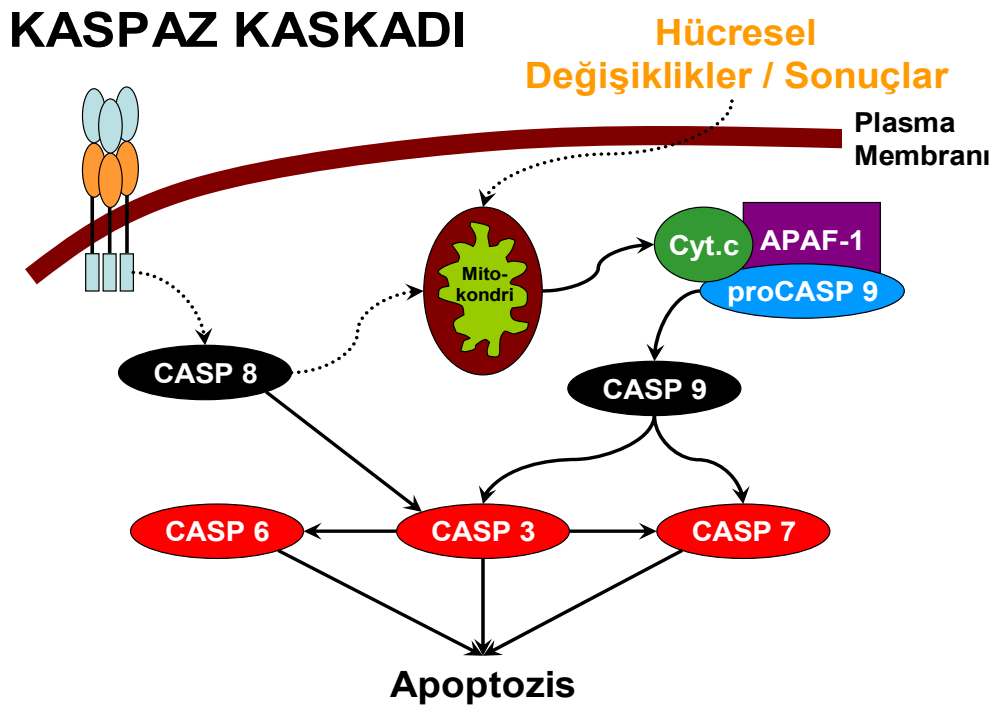
Prokaspazlar düşük fakat saptanabilir bir proteolitik aktiviteye ve belli koşullar altında otoaktivasyon potansiyeline sahiptirler. Prokaspazlar hücrede çok fazla sentezlenirler ve yapay olarak çapraz bağlarla aktive olabilirler. Prokaspazların aktivasyonu için özel bir şekilde kesilmeleri gerekmektedir. Aktif hale gelmeleri yine başka bir kaspazın ilgili prokaspazı aspartik asitin bulunduğu özel bölgeden kesmesi ile olur (Şekil 1.12) Aktive olmaları ile bu aktif kaspazlar başka prokaspazları keser ve onları da aktive ederler [57].



Şekil 1.12 Aktif kaspazın yapısı

Başlatıcı kaspazların aktivasyonu için spesifik kofaktörlerin bağlanması gerekir, bu durum proteazlarda sık görülen bir mekanizmadır. Bu bağlanma pro-apoptotik sinyali tetikler ve en azından farklı iki yapısal faktör rol alır. Bu kaspazın prodomain kısmı ve onun karşılığı olan kofaktörüdür. Prokaspaz-8' in aktivasyonu için onun onun kofaktörü FADD (Fas Associated protein with death domain)' den DED (death effector domain)' e kadar uzanır. Prokaspaz- 9 aktivasyonu için APAF-1 kofaktörü ile kompleks yapar [57]. APAF-1' in indüksiyonu ise sitokrom-c' nin mitokondriden salıverilmesi ile olur. Apaf-1' in oligomerizasyonu kaspaz-9 monomerlerinin biraraya getirilmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3' ü aktifleştirir (Şekil 1.13) [18, 56].

Başlangıç kaspazları bir kez aktive olduğunda diğer prokaspazları transaktive eder. Kaspaz aktivasyonu için diğer bir mekanizmada non-kaspaz proteazları ile direk proteolizdir [15, 50]. Örneğin, sitotoksik T hücre proteazı olan granzim-B, bir aspartat-spesifik serin proteazı olan prokaspaz -3 ve -7' nin etkin bir aktivatörüdür.



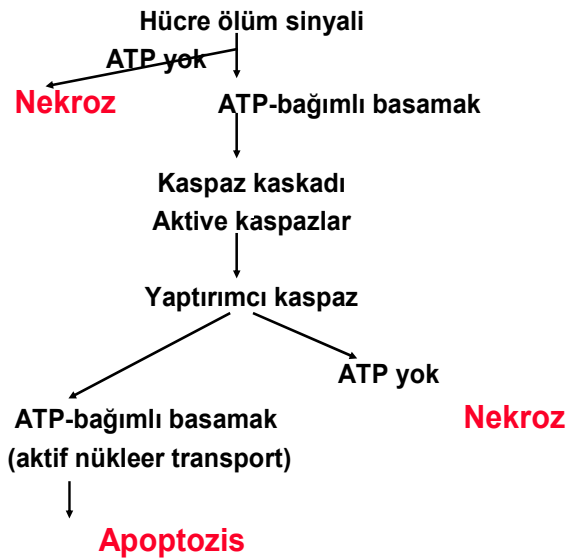
Şekil 1.13 Kaspaz kaskadı

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler (Şekil 1.14). Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA

tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar [38, 54]. Kaspazların bir rolüde yaşayan hücreleri apoptozdan koruyan proteinleri inaktive etmektir [40].

Kaspazlar önce hücrelerin etrafı ile olan ilişkilerini kesmekte, sonra hücre iskeletini yeniden organize etmektedirler. En son olarak da DNA replikasyonunu ve tamirini sonlandırmaktadırlar. Böylece DNA tahrip edilip çekirdek yapısı bozulur. Fagositoz için gerekli hücre sinyallerinin üretilip açığa çıkması sağlanır ve son olarak apoptotik cisimcikler hücrede bozulmaya yol açar [39, 50].

## HÜCRE ÖLÜMÜNÜN OLUŞUMU



Şekil 1.14 Hücre ölümünün oluşumu

Her dokunun eksprese ettiği kaspaz tipi farklı olabilir. Bu durumda farklı dokular için farklı kaspazların aktivasyonu ile apoptozis gerçekleşmektedir [50, 56]. Örneğin periferik T hücreleri ultraviyole ile indüklenmiş apoptozise gitmek için ne kaspaz-3' e ne de kaspaz-9' a gereksinim duyarlar. Oysa embriyonik kök hücreler bu durumda her iki kaspazda gereksinim duyarlar. Hatta hücrelerin değişik farklılaşma derecelerinde değişik kaspazların aktivasyonuna gereksinim duyarlar [40, 58].

### **1.3.3. Kaspaz inhibitörleri**

Kaspaz ailesinin ve kaspaz inhibitörlerinin keşfi, apoptotik hastalıkların tedavisinde yol gösterici olacaktır [59]. Zira farklı kaspazlara spesifik farklı sentetik inhibitörlerin yanısıra kaspaz aktivasyonunu yada kaspaz aktivitesini önleyen doğal kaspaz inhibitörleri de bulunmuştur [60].

Apoptozis protein inhibitörleri kaspazları, ölüm reseptörleri ve mitokondriyal yol aracılığıyla inhibe ederler [38]. Kaspaz inhibitörleri 2 gruba ayrılır.

1. Viral kaspaz inhibitörleri
2. Sentetik kaspaz inhibitörleri

### **I. Viral Kaspaz İnhibitörleri**

Apoptotik hücre ölümünün düzenlenmesinde kaspazlara önem verilmesinin sebebi, kaspaz aktivasyonu ya da kaspaz aktivitesinin apoptozun kontrolünde önemli kontrol noktaları sunmasındandır. Başlangıçta kaspaz aktivasyonu ya da kaspaz aktivitesini inhibe eden sayısız viral inhibitör bulunmuş, sonraki dönemlerde ise bunların insan homologları tanımlanmıştır [61].

Virüs ile enfekte olmuş hücreler apoptoza giderler ve konağın hücre sel immün sistemi ile temizlenirler [31, 62]. Viral inhibitörler kullanılarak hücre apoptoza gitmekten kurtulur.

### **- Kaspaz aktivasyon inhibitörleri**

Human herpes virüs 8 ve human molluscipox virüslerde kaspaz aktivasyonunu önleme çalışmaları esnasında bir grup anti-apoptotik protein bulunmuştur. FLIP adı verilen bu inhibitör protein FADD isimli adaptör protein ile etkileşerek CD95 (Fas/Apo-1) reseptörü tarafından uyarılan kaspaz-8' in aktivasyonunu önler [38].

Crm A, kaspaz aktivitesini doğrudan inhibe ettiği gösterilen ilk proteindir ve cowpox virüsünden izole edilmiştir. Crm A kaspaz-8' in ölüm reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder. Ayrıca sitokinleri aktive ederek kaspaz-1 (ICE)' in aktivitesini güçlü şekilde önler. P35 proteini de baculo virüsünden izole edilmiş olup Crm A' ya benzer mekanizmalarla geniş bir kaspaz ailesini (kaspaz -1, -2, -3, -4, -6, -7, -8, -10) doğrudan inhibe eder [8, 40, 50].



Kaspaz aktivitesini önleyen diğer bir inhibitör ise IAP (apoptozis inhibitör protein) proteindir. IAP proteinleride baculo virüsten izole edilmiştir. 5 tane IAP proteini tanımlanmış olup bunların 3 tanesi insanlarda bulunur. XIAP, cIAP-1 ve cIAP-2, kaspaz-9 başlatıcısı ile kaspaz-3 ve -7' nin distal uçlarını kendisine hedef seçerek etki gösterir. Özellikle kaspaz-3 ve -7' nin inhibisyonuna neden olurlar. Bu sayede IAP' lar efektör kaspazlara etkilidir denilebilir [39, 63]. ARC proteini ise son zamanlarda izole edilen inhibitör protein olup kaspaz-8' in aktivitesini inhibe eder.

## II. Sentetik Kaspaz İnhibitörleri

Son yıllarda hedef kaspazlara optimal bağlanma amacıyla sentetik spesifik kaspaz üretimi yapılmaktadır (Çizelge 1.3). Bu güçlü moleküller non-sitotoksik ve geri dönüşümsüz bağlanma özelliğine sahip olup, bağlanacakları endogen substratla uyumlu, peptid tanıma elemanı içerirler. Bu ürünlerin aktivitesi hem in-vivo hem de in-vitro çalışmalarla gösterilmiştir [14, 38].

**Çizelge 1.3** Sentetik kaspaz inhibitörleri

Z.VDVAD.fmk	kaspaz-2
Z.DEVD.fmk	kaspaz-3
QVD-OPH	genel kaspaz inhibitörü
Z.IETD.fmk	kaspaz-6
Ac-DEVD-CHO	kaspaz-7
Z.LEED.fmk	kaspaz-13 için spesifik inhibitörlerdir.

Kaspazların fonksiyonları ve farklı dokulardaki aktiviteleri hakkında henüz pek çok bilgi eksikimiz olsa da kaspaz inhibitörleri belkide gelecekte tedavi amaçlı kullanılacak araçlardan birisi olacaktır [60, 64].

### **QVD-OPH:**

Bir genel kaspaz inhibitörlerinin son üyesi olan QVD-OPH sıvı formda, DMSO ile çözüldüğünde hücre geçirgenliği yüksek olan geri dönüşümsüz geniş spektrumlu bir kaspaz inhibitörüdür. Etkisini major kaspaz ile ilişkili apoptozis yollarından kaspaz 9/3, kaspaz 8/10, kaspaz-12 üzerinden gösterir [4, 59].

QVD-OPH apoptozisi 3 temel yoldan önler:

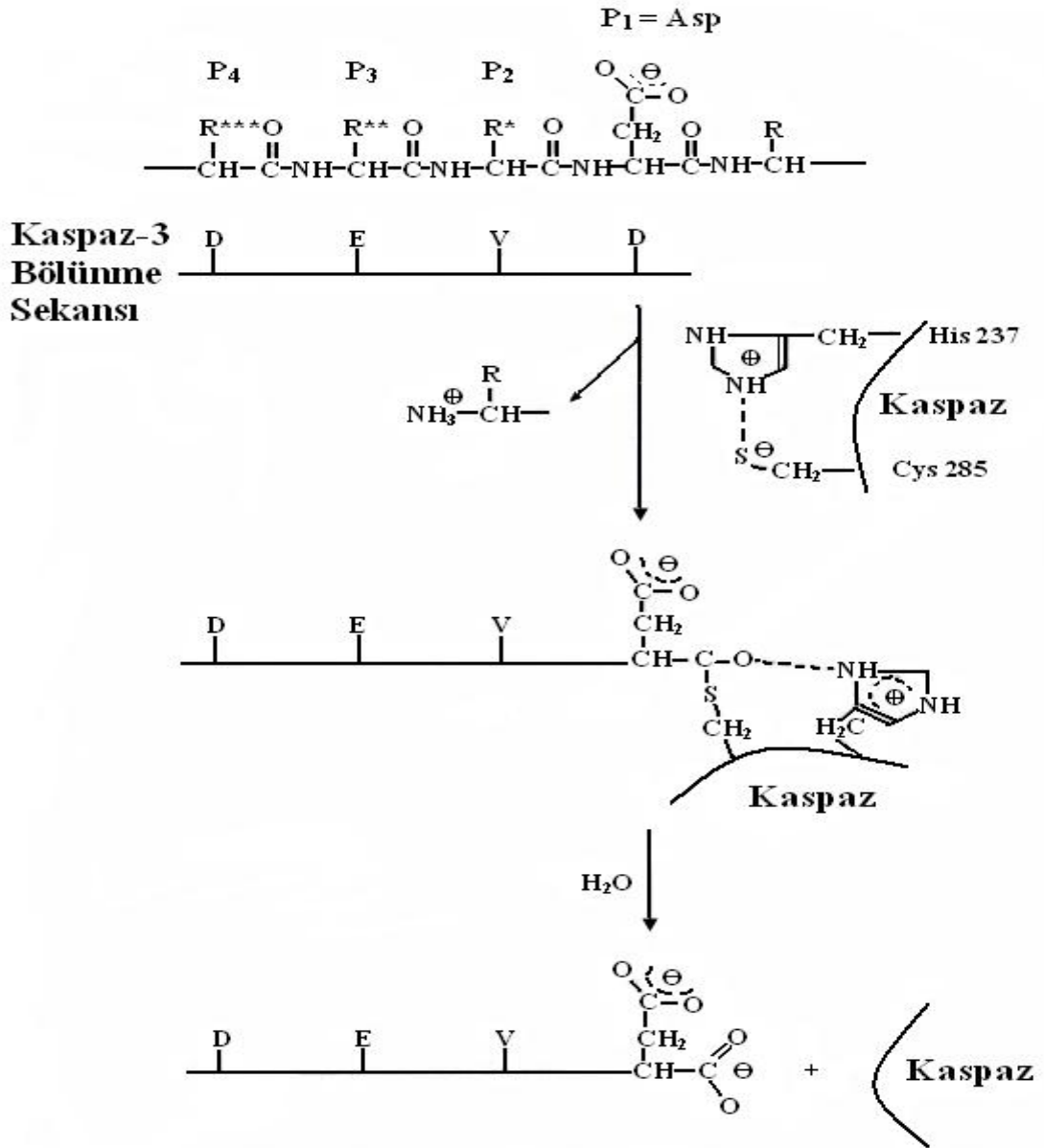
1. Mitokondrideki sitokrom-c' nin salınmasıyla aktive olan kaspaz-9 ve kaspaz-3' ün aktivasyonunu engelleyerek,
2. TNF alfa ve Fas/CD95' in ölüm reseptörlerine bağlanarak aktive olan kaspaz-8 ve kaspaz-10 aktivasyonunu engelleyerek,
3. Endoplazmik retikulum membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden kaspaz-12' nin aktivasyonunu engelleyerek.

Son yıllarda yapılan çalışmalar genel kaspaz inhibitörlerinin sitotoksik etkileri üzerine yapılmıştır [38]. QVD-OPH' nin kaspaz inhibisyonunda, yaygın olarak kullanılan ZVAD-fmk ve Doc-D-fmk' dan daha etkin olduğu gösterilmiştir [4].

#### **1.3.4. Kaspaz substratları**

Aktif hale geçen kaspazlar hücre içindeki spesifik substrat molekülleri üzerine proteolitik etkiye sahiptirler ve substratlarındaki C-ucundaki aspartik asit ve N-ucundaki en az 3 aminoasiti tanıyarak, katalitik reaksiyonu gerçekleştirmesini sağlarlar [40].

Katalitik reaksiyonun ilk basamağında, kaspazların aktif merkezlerinde yer alan sistein aminoasitinin nükleofilik tiol grubu, substratların aspartik asiti ile tiyoaçıl kovalent bir bağ oluşturur. İkinci basamakta ise, histidin amino asitindeki imidazol halkasının yardımıyla peptid bağının hidrolizi gerçekleşmektedir (Şekil 1.15).



Şekil 1.15 Kaspaz ve substrat reaksiyonu

Kaspazların substratları 2 grupta toplanmıştır [38].

**1- Sinyal üretiminde ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan proteinler**

(Kinazlar): PARP, DNA-PK, PRb, PKC, PITSLRE Kinaz, Mdm-2 [8, 18, 65]

PARP: Poli (ADP-Riboz) polimerazdır. DNA tamir mekanizmasında rol alan enzimdir.

DNA-PK: DNA bağımlı bir protein kinazdır.

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

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

**2- Yapısal proteinler (Hücre iskeleti proteinleri):** Aktin, Fodrin, Gas-2, Lamin, U1snRNP [40]

$\beta$ -Aktin ve Fodrin: Hücre iskeletinde yer alan yapısal proteinler.

Lamin: Nükleus mebranında yer alan yapısal protein.

Özellikle gelsolin ve Gas-2 yıkımı hücrede dramatik değişikliklere yol açar. Hücre-hücre ve hücre-matriks ilişkisini sağlayan bu iki protein kinazın yıkımı hücrenin etrafındaki dokudan ayrılması ile sonuçlanır.

Kaspazlar aynı zamanda hücrede reorganizasyona yol açabilirler, bunun için hücre iskelet yapısında yer alan gelsolin, FAK (fokal adhezyon kinaz), PAK-2 (p21-aktif kinaz 2)' yi keserler. Bu proteinlerin kesilmesi, onların sahip oldukları aktivitelerin yeniden düzenlenmesine neden olur. Örneğin, gelsolin aktif filamentlerini birbirinden ayırarak düzenler, gelsolinin kaspaz kesimi sonucu aktin düzenlenmesi bozulur [56].

### 1.3.5. Apoptozisde kaspaz-3' ün yeri ve önemi

Kaspazların apoptozise olan katkıları son derece belirgindir [64]. Kaspazlar, iskemi aracılığıyla gerçekleşen hücre ölümünde rol oynayan aspartata özel sistein proteaz ailesindedirler. Kaspazlar iskemi sonrasında ve genetik kontrolle aktive olurlar [66]. Nöronal apoptozisde önemli bir yer teşkil ederler. Geçici iskeminin in-vivo modellerinde kaspazları inhibe eden ajanlar yaralanmayı azaltmada oldukça etkilidir [67]. Kaspaz-1 ve kaspaz-3 iskemide başlayan hücre ölümü kaskadının en önemli düzenleyici enzimleridir. Merkezi sinir sistemi yaralanmalarında görülen apoptozisde en önemli rol kaspaz-3' e aittir [68]. Chen vd. kaspaz-3' ün gecikmiş nöronal ölüme aracılık ettiğini rapor etmişler ve kaspaz-3 inhibitörlerinin hücre ölümü üzerine etkilerinin kaspaz-1 inhibitörlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir [64].

Apoptozisin dış ve iç sinyallere bağlı olmak üzere iki yolu mevcuttur. Apoptozisin en önemli fazı kaspaz-3 aktivasyonudur. Spinal kord yaralanmasını takiben nöronlar ve glial hücreler apoptozise giderler [69].

Diğer kaspazlar gibi kaspaz-3' te prokaspaz olarak sentez edilir.

Nöronlarda apoptotik hücre ölümü kaskadında aktif forma dönerler. Kaspaz-3, -6, -8, -9 ve -10 birlikte aktive edilir. Kaspaz-3' te kaspaz-6 ve -7' yi aktive eder [70, 71].

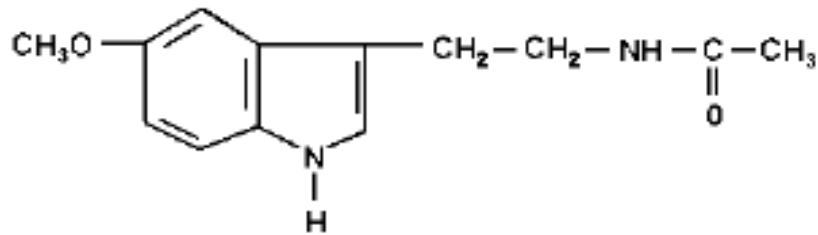
Apoptozisin efektör fazında önemli bir rol oynayan kaspaz-3' ün aktivitesinin engellenmesi nörolojik defektlere yol açar [72]. Deneysel iskemi ve travmatik beyin yaralanması sonucunda nöronal hücre ölümüne kaspaz-3 aktivitesi katkıda bulunur. Bu iki yaralanmada da kaspaz inhibitörleri (QVD-OPH) apoptozisi azaltmakla kalmayıp ayrıca hayvanlarda fonksiyonel iyileşme ile sonuçlanmıştır [59, 73].

Spinal kord yaralanmasında, kaspaz bağımlı apoptozis oldukça iyi açıklanmıştır. Son çalışmalarda kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3' ün spinal kord yaralanmalarında meydana gelen apoptozisdeki önemli rolleri vurgulanmış, kaspaz-3' ün efektör kaspaz olduğu gösterilmiştir [66, 74]. Apoptotik süreçte kaspaz-3' ün en önemli rolü üstlendiği ve kaspaz-9' unda kaspaz-3' e benzer özellikler gösterdiği de yine son çalışmalarla desteklenmektedir [31, 75].

DNA fragmantasyonunda, DNA<sub>az</sub> aktivasyonuna sebep olan kaspaz-3' ün direk rolü olduğu düşünülmektedir. Kaspaz-3 geninin kromozom 8 üzerinde lokalize olduğu bilinmektedir [71, 76]. Bu gen embriyonik dönemin 4. gününden itibaren gelişimden sorumludur. Kaspaz-3' deki eksiklik ciddi nörolojik gelişim problemlerine hatta 3 haftalık embriyoda ölüme neden olabilmektedir [40, 77].

#### 1.4. Melatonin ve Genel Özellikleri

Pineal bezin majör hormonu olan melatonin, epifiz bezinde triptofan aminoasitinden sentezlenir ve plazmada proteinlere (albumin vb.) bağlıdır [78]. Çoğu karaciğerde olmak üzere böbrekte de metabolize olur ve başlıca metaboliti 6-Hidroksimelatonin sülfat (6-HMS)' dir [79]. İnsanlarda ekzojen melatoninin kısa bir metabolik yarı ömrü (20-60 dk.), büyük bir hepatik geçiş etkisi vardır [80]. Melatoninin kimyasal yapısı Şekil 1.16' da gösterilmiştir.



Şekil 1.16 Melatoninin kimyasal yapısı

Melatonin en ilkelinden (tek hücreli algler örnek: *Gonyaulax polyedra*) en gelişmişine kadar bütün aeorbik organizmalarda bulunan, evrim boyunca korunmuş bir moleküldür. Buna karşın sanıldığı gibi hidrofobik değildir. Sudaki çözünürlüğü  $5 \times 10^{-3}M$  olarak tespit edilmiştir. Melatonin bu özelliği sayesinde kan-beyin bariyerini kolayca geçer ve tüm subselüler kompartmanlara hızla diffüze olur. Melatoninin serbest radikal tutucu özelliği nedeniyle yaşa bağımlı dejeneratif olayları engellemede yararlı olabileceği düşünülmektedir [79, 80].

Melatoninin salgılanma hızını belirleyen en önemli faktör, çevrenin aydınlık veya karanlık olmasıdır [81]. Genel olarak, ışık melatonin hızını azaltır, karanlık ise artırır. Melatonin sentezi pineal bezden başka retina, bağırsak gibi organlarda da sentezlendiği gösterilmesine rağmen bunun kan melatonin düzeyine etkisi yok denecek kadar azdır [65]. Melatonin üretildikten sonra lipofilikliğin çok yüksek olmasından dolayı, hızlı bir biçimde önce kana, beyin omurilik sıvısı dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvılara ve tüm dokulara dağılır [79]. Anneden fetüse ve süt yoluyla yeni doğana geçebilir.

Sağlam hücre tiplerinde fizyolojik şartlarda yaşlanma ile apoptozis artar ve pineal bezden melatonin salgılanması azalır [82]. Dışarıdan verilen melatonin sayesinde apoptozisin inhibe edildiği ve yaşlanmayla artan hasarlanmış, disfonksiyonel hücrelere karşı koruyucu rol aldığı gözlenmiştir.

Yapılan son çalışmalar endojen antioksidan maddelerden en güçlüsünün melatonin olduğunu göstermiştir [83]. Melatonin molekülü kolaylıkla oksitlenmez, otooksidasyona uğramaz, hidroksil radikali üreten reaksiyonlara katılmaz. Bilinen tüm antioksidanlardan (mannitol, glutatyon, vitamin E, C vb.) daha güçlü serbest radikal süpürücü özelliği vardır [84]. Melatonin hidroksil radikali nötralize etme özelliğinden dolayı glutatyondan 5 kat, mannitolden 15 kat, peroksit radikal tutucu özelliği ise E vitamininden 2 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir [44, 85]. Özellikle yaşlanmaya bağlı immün yetersizliklerinde de immün yanıtı artırıcı etkisi bilinmektedir [80].

Pineal bezin tümör büyümesini inhibe edici bir özelliğe sahip olmasında yaklaşık yirmi yıldan beri bilinmektedir. Melatonin, göğüs kanserinde rol alan hormonları etkileyerek bu hormonların azalmasını sağlamaktadır. Pineal bezin antikanser etkisi büyük oranda melatonine bağlanmıştır [86]. Pinealektomi yapılmış sıçanlarda yapılan bir çalışmada artan oksidatif hasar, dolaşımdaki azalmış melatonine bağlanmıştır.

Pineal bezi çıkartılmış deneklerin ortalama yaşam sürelerinin azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca genç deneklerin (4 aylık) pineal bezinin yaşlı deneklere (18 aylık) transplantasyonu, yaşlı deneklerin yaşam süresini anlamlı ölçüde uzatmakta, buna

karşılık yaşlı deneklerin pineal bezinin genç deneklere transplantasyonu yaşam süresini anlamlı olarak kısaltmaktadır [80].

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, melatonin tedavisinin yaşam süresinde %25' lik artışa neden olmakla beraber bu sıçanların daha genç, sağlıklı ve güçlü görüldüğü, seksüel aktivitelerinin de daha uzun süre devam ettiği bildirilmiştir [6].

Başka bir çalışmada dişi sıçanlara günlük 100 µg melatonin enjeksiyonu yapıldığında, bu sıçanların yaşam süresinin arttığı, özellikle de 08.00-10.00 saatleri arasında melatonin uygulanan grupta bu farkın daha belirgin olduğu görülmüştür [83].

Pineal bezden salınan bir hormon olan melatoninin (5- methoxy-N-acetyl-tryptamine) birçok biyolojik etkisinin yanısıra, hücre içi kalsiyum düzeyini düzenleyebilmesi, güçlü bir radikal süpürücü (hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali, peroksil radikali, singlet oksijen ve peroksinitrit anyonu) ve antioksidan (SOD, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz stimülasyonu ve nitrik oksit sentez inhibisyonu) özelliğinin olması, iskemi reperfüzyon hasarında etkili bir koruyucu olabileceğini düşündürmektedir [87, 88, 89, 90].

Melatoninin, hücrelerde mRNA miktarlarının artmasını sağlayarak hücresel antioksidan savunma sistemini uyarır ve prooksidatif enzim miktarlarının azalmasını sağlar [46].

Oksidatif stres ve DNA hasarı apoptozisi indükleyen en önemli iki faktördür. Oksidatif stres, merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında, nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer, Parkinson, epilepsi)' da önemli rol oynar. Melatonin antioksidatif enzimleri aktifleştirmesi sonucu oluşan hasarın önlediği gözlenmiştir [91]. Melatonin, spinal kord yaralanmaları sonucu artan lipid peroksidasyonunu azaltarak nöronal hasarı önlediği gözlenmiştir [75].

İmmün sistemin düzenlenmesi, zararlı ajanlara karşı korunması apoptotik mekanizmayla sağlanmaktadır. Timusta meydana gelen herhangi bir hasarda melatonin miktarının arttığı belirlenmiştir [46].

Pek çok yeteneği sayesinde melatoninin, beyin hücrelerinde ve diğer dokularda apoptozisi inhibe ettiği son çalışmalarla ortaya konmuştur [77]. Son yıllarda melatoninin mitokondriyel homeostazis' i sağladığı bulunmuştur [83, 87].

Melatoninin nöronal dokulardaki koruyucu etkisi hem in-vivo hemde in-vitro çalışmalarda gösterilmiştir [45].

## 1.5. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa, günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn, aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir [92]. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 1980' li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 1990' ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu.

Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 1990' ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı [93]. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodlar, 2000' li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelial hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18' in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti.

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir:

- I. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
- II. İmmünohistokimyasal yöntemler
- III. Biyokimyasal yöntemler
- IV. İmmünolojik yöntemler
- V. Moleküler biyoloji yöntemleri

### **Kaspaz-3 Yöntemi**

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 Western Blot yöntemiyle belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 ekspres ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3' ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir [94].

### **Western-Blot**

- Substrat kırılmaları
- Aktif kaspazın belirlenmesi
- Sitokrom-c salıverilmesi



Bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom-c' nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metodla sağlanabilir. Yanlız, sitokrom-c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom-c' nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır [67].

### **Kaspaz aktivasyonu (Hücre kültürü)**

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate" lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır [92].

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Biyoloji bilimleri literatüründe apoptozis terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wylie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır [15, 18]. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozis genetik olarak kontrol edilir ve organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız olarak ortadan kaldırılmasını sağlar. Apoptozis, doku dengesinde, farklılaşmada ve gelişmede önemli rol oynayan genetik olarak düzenlenen hücre ölüm şeklidir [8, 12].

Duke ve arkadaşları 1983 yılında, jel elektroforezi ile apoptozisde endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına yol açtıklarını göstermişlerdir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtları elde edilmiştir [18]. Bu tarihten sonra apoptozis konusunda çalışmalar hızla artmıştır. Nörodejeneratif durumlarda, inflamatuvar hastalıklarda ve iskeminin sebep olduğu sinir sistemi hasarlarında son zamanlarda apoptozis büyük ilgi görmüştür.

Kato ve arkadaşları 1997 yılında iskemik yaralanma sonrası spinal kord da apoptozisi gözlemlemişlerdir [55].

Yadav vd. 1999' da karaciğer iskemisinde Bcl-2 genlerinin aktive olarak, kaspazları aktive ettiğini belirlemişlerdir [30]. Kevin K. Wang 2000 yılında kalp ve kaspazlar arasındaki farkları belirterek kaspazların apoptozisde kalplere oranla daha fazla etkin olduklarını göstermiştir [72]. Kim vd. 2000 yılında insan immün sisteminde uygulanan DZA (Dezaadenosine) maddesinin HL-60 ve U-937 hücrelerinde apoptozise neden olduğunu ve kaspaz-3' ün etkin rol aldığını belirtmişlerdir [24]. Schuler vd. 2001' de DNA hasarı, büyüme faktörlerinin yetersizliği sonucu oluşan hücre stresinde p53 geninin aktifleşerek apoptozisi indüklediğini açıklamışlardır [35]. Grossman vd. 2001 yılında nöronlarda, Zurita vd. 2002 yılında glial hücrelerde apoptozisi göstermişlerdir [51, 55]. Davoli vd. 2002 yılında beyin iskemisinde kaspaz-3 aktivasyonunu TUNEL yöntemi ile belirlemişlerdir [42].

Chun vd. 2003' de kalpde yaptıkları iskemi-reperfüzyon sonucunda, kaspaz-3 aktivasyonu ile oligonükleozomal DNA parçalarının oluştuğunu ve hücrenin geri dönüşümsüz bir yola girerek apoptotik cisimciklerin oluştuğunu gözlemlemişlerdir [28]. Wingrave ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada sıçanlarda spinal kord

hasarına karşı kalpainin ve kaspaz inhibitörlerinin hücre ölümlerini engellediğini ve sinir hücrelerini koruyucu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir [76].

Dobsak vd. 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada; iskemi ve reperfüzyon oluşturulan sıçan kalplerinde, iskemi ve reperfüzyon hasarına karşı melatoninin antioksidan olarak koruyucu etkisinin olduğunu bulmuşlar ayrıca melatoninin radikal süpürücü olarak oksidatif strese bağlı oluşan apoptozis olayını engellediğini açıklamışlar [88].

Onur vd. 2004' de testiküler dokularda melatoninin antioksidan rolü sayesinde Bax ve Bcl-2 proteinlerini etkileyerek apoptozisi inhibe ettiğini göstermişlerdir [44]. Xiaoyang ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada anti-apoptotik bir protein olan XIAP'in, beyin iskemisi oluşturulan sıçanlarda iskemi ve reperfüzyon sonrası apoptozisi engellediğini, bu etkisini de bcl-2 ve bax genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek kaspaz aktivasyonunu önlediği ve apoptozisi engellediğini göstermişlerdir [63].

2005 yılında sıçanlarda oluşturulan deneysel spinal kord modelinde bir kalpain inhibitörü olan AK-295' in spinal kord hasarındaki koruyucu etkinliği araştırılmıştır [95]. Olakowska vd. 2005 yılında yapmış olduğu klinik bir çalışmada melatoninin nörodejeneratif hastalıklarda özellikle kanser tedavisinde koruyucu rol oynadığını gözlemlemişlerdir [86].

Baydaş vd. 2005 yılında beyin iskemisi uyguladıkları sıçanlarda homosistein (thiol içeren aminoasit)' nin verilerek nöronal hücre ölümünün gözlemlendiği, melatonin uygulaması ile mitokondriden sitokrom-c' nin salınımının azaldığını, kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitesinde düştüğünü belirtmişlerdir [45].

Berliocci vd. 2005' de apoptozisin oluşumunda hücre içi  $Ca^{++}$  iyonlarının arttığını ve bununda hücre ölümünde önemli bir belirteç olduğunu vurgulamışlardır [37].

Carloni vd. 2006' da yeni doğan sıçanlarda yapılan beyin iskemisinde reperfüzyonu takiben verilen *simvastatin*' in (ilaç) kaspaz-3 aktivasyonuna neden olduğunu ve apoptozisin gerçekleştiğini bildirmişlerdir [25]. Dilsiz vd. 2006 yılında sıçan retinasında iskemi oluşturarak apoptozisten birinci derece sorumlu olan kaspaz-3' ün varlığını belirlemişlerdir [67].

Cittelly vd. 2008 yılında spinal kord iskemisinde sıçanlara dışarıdan verdikleri anti-apoptotik bir protein olan Bcl-xL' nin iskemiden 24 saat sonra apoptozisi azalttığını bildirmişlerdir [43].

Çolak vd. 2008 yılında spinal kord travması oluşturdukları sıçanlarda bir kaspaz-3 inhibitörü olan Ac-DMQD-CHO uygulayarak, bu maddenin kaspaz-3 aktivitesini engelleyerek apoptozis oluşumunu ortadan kaldırdığı belirlenmiştir [31].

Seung-II vd. 2008 yılında melatoninin apoptozis oluşumunda etkili olan nitrik oksit düzeylerini etkileyerek apoptozis oluşumunu önlediğini gözlemlemişlerdir [81].

Literatüre göre spinal kord iskemisinde kaspaz-3 aktivasyonuna ilişkin fazla çalışma olmayıp, yapılan çalışmalar daha çok spinal kord hasarı sonucu ortaya çıkan nöronal hücrelerdeki enzim miktarlarının tayini ve histopatolojik incelemeleri içermektedir. Bizim çalışmamızda ise apoptozisde kilit rol oynayan kaspaz-3' ün Western-Blot yöntemiyle belirlenmesi, hücrenin apoptozise gittiğinin kesin olarak anlaşılması ve melatonin uygulaması ile de bu hasarın ortadan kalkması amaçlanmıştır. Spinal kord iskemisinde kaspaz-3' ün tayinine yönelik yaptığımız bu çalışma bilimsel araştırmalarda ilk olması sebebiyle önem taşımaktadır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Birimi laboratuvarında yapıldı. Deneyde ağırlıkları 250-350 gr arasında değişen 30 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı.

#### 3.1. Deney Grupları

**1. Grup (Kontrol Grubu, Sham operated)**= Bu grupta 7 sıçan kullanıldı. Genel anestezi altında sadece karın bölgesinden açma kapama yapıldı. 48 saat sonra spinal kord doku örnekleri alındı.

**2. Grup (Deneysel spinal kord iskemisi oluşturulan grup)**= Bu grupta 8 sıçan kullanıldı. Uygulanan iskemi modelinin sonuçlarını karşılaştırmak için oluşturuldu. Denekler tarif edilen yöntem ve sürelerde iskemi reperfüzyona maruz bırakıldı. 48 saat sonra medulla spinalis doku örnekleri alındı.

**3. Grup (Melatonin kontrol grubu )**= Bu grupta 7 sıçan kullanıldı. İskemi yapılmadan melatoninin etkisini gözlemlemek için oluşturuldu. Deneklere genel anestezi altında 50 mg/kg olacak şekilde melatonin intraperitoneal olarak uygulandı. 30 dk. bekledikten sonra orta hattan açma kapama yapılarak beklemeye alındı 48 saat sonra spinal kord örnekleri alındı.

**4. Grup (Melatonin iskemi grubu)**= Bu grupta 8 sıçan kullanıldı. Deneklere 50 mg/kg olacak şekilde melatonin intraperitoneal olarak uygulandıktan sonra genel anestezi altında 30 dk. beklendikten sonra orta hattan açma yapılarak abdominal aort kliplendi. 30 dk. beklendikten sonra klip alınarak reperfüzyon sağlandı. Denekler 48 saat yaşatıldıktan sonra doku örnekleri alındı.

#### 3.2. Anestezi

Çalışmada kullanılan tüm hayvanlarda 50 mg/kg ketamine (Ketalar, Parke-Davis. Eczacıbaşı, İstanbul) ve 8 mg/kg Xylazine (Rompun, Bayer. İstanbul) ile anestezi sağlandı. İhtiyaç halinde başlangıç dozunun %20' si aralıklı olarak tekrarlandı.

### 3.3. Spinal Kord İskemisinin Oluşturulması

Zivin ve DeGirolami' nin tarif ettiği spinal kord iskemi modeli uygulandı [96]. Bu çalışmada steril koşullar altında abdominal bölgenin lokal cilt temizliği yapıldı. Daha sonra orta hattan laparotomi yapılarak abdominal aortanın ve sol renal arterin görülmesi sağlandı. Abdominal aorta, sol renal arterin 1 cm üzerinden 30 dk. süreyle *geciçi anevrizma klip'* i (Sugita-Mizuha marka 9 mm hafif kavisli, Yaşargil tipi, katalog no 07-940-55 kapanma basıncı 65-85 gr (0,64-0,83 N)) takılarak kapatıldı. 30 dk. sonunda klip alınarak reperfüzyon sağlandı. Aorta ve periferik damarlarda kan akımı olduğu tespit edildi. Bu işlem öncesi deney gruplarına melatonin (50 mg/kg) verildi. İskemi sonrası gruptaki deneklere ait periton 2 /0 stur ipek iplik ile kapatıldı ve bekleme dönemine alındı. Bütün denekler 48 saat yaşatıldıktan sonra sakrifiye edilerek doku örnekleri alındı.

### 3.4. Melatonin Uygulanması

Melatonin (etanol içinde, %5) 50 mg/kg olacak şekilde hazırlandı. Melatonin kontrol ve melatonin+iskemi grubuna (iskemiden önce) 30 dk. intraperitoneal yolla verildi.

### 3.5. Proteinlerin Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) ile İncelenmesi

İlk olarak Shapiro ve ark. tarafından 1967 yılında kullanılmaya başlanan ve günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan SDS-PAGE, bir ortamdaki protein moleküllerinin bantlarına ayrılması ve görüntülenmesi için kullanılmaktadır [97]. SDS, 12 karbondan oluşan hidrofobik karakterli bir kuyruk ve sülfonik asitten oluşan hidrofilik karakterli baş kısımlarından oluşan iyonik bir deterjandır. Jelin yapısını oluşturan poliakrilamid ise, akrilamid monomerleri ve kısmen de bis-akrilamid dimer moleküllerinin polimerleşmesi sonucu oluşur. Bu polimerleşme olayı serbest radikal katalizörlüğüne iyi bir örnek teşkil etmektedir.

Bir örneğe ait protein bantlarının elektrofrez jel üzerindeki keskin görüntüsü, örnek içerisindeki bant sayısı, hedef proteinin yoğunluğu, kullanılan jel gözeneklerinin sıklığı gibi durumlara bağlıdır. SDS-PAGE jeli tutucu (stacking) ve ayırıcı (separating) olmak üzere iki ayrı kısımdan oluşur. Tarağın yerleştiği ve yaklaşık 2 cm yüksekliğinde olan tutucu jelin konsantrasyonu genelde %4 olarak hazırlanır. Bu kısma yerleştirilen

tarak yardımı ile oluşan yuvalara aktarılan örneklerin etrafa dağılmaksızın bir bant halinde alttaki ayırma jeline geçişi sağlanır. Jel yuvalarına yüklenen negatif yüklü SDS-protein kompleksi (0.4g SDS/1 g protein) pozitif yüklü uca doğru akımın şiddetine, protein molekülünün yapısına, büyüklüğüne ve elektriksel yüküne bağlı olarak ilerler. Örnek içerisindeki küçük molekülü proteinler, jel gözeneklerinden hızla geçiş yapacaklarından büyük molekülü proteinlere göre daha hızlı ilerlerler. Böylece akım süresine bağlı olarak aralarındaki mesafe açılır. Boya bandı jelin alt kısmına ulaştığında güç kaynağından gelen akım durdurulur. Daha sonra jel coomassie mavili boya ortamında asetik asit ile fiksasyon işlemine tabi tutularak bantların görünür hale gelmesi sağlanır.

Kontrol grubu (K1, K2)      İskemi grubu (İ1, İ2)      Melatonin grubu (M1, M2)

Melatonin+ İskemi grubu (Mİ1, Mİ2)

	<u>Doku ağırlığı</u>	<u>D.H.T (mL)</u>
K1	0,1603 x 9 =	1,4427
K2	0,2012 x 9 =	1,8108
İ1	0,2927 x 9 =	2,6343
İ2	0,1255 x 9 =	1,1295
M1	0,2265 x 9 =	2,0385
M2	0,2750 x 9 =	1,9881
Mi1	0,2209 x 9 =	1,9881
Mi2	0,1763 x 9 =	1,5867

1. Her gruptan 2' şer örnek alınarak ağırlıkları tartıldı. Tüplere konulan dokulara ağırlıklarının 9 katı oranında **Doku Homojenizasyon Tamponu (DHT)** eklenerek bıçaklı homojenizatör ile homojenize edildi.

#### **Doku Homojenizasyon Tamponu (mL)**

NaCl	80 mM
Tris-HCl pH:7.3-7.5	20 mM
EDTA	1 mM
PMSF	0.2 mM
SDS	%1
<b>Toplam</b>	<b>100 mL</b>

2. Homojenatlar 10000 rpm' de 15 dakika kadar santrifüj edildi. Parçalanmamış hücre ve hücre artıkları tüpün dip kısmında pelet olarak çökelirken, çözünmüş olan proteinler ise süpernatant olarak peletin üstündeki sıvıda yer alır. Dolayısıyla süpernatantlar alınarak ayrı tüplere konuldu.

3. Peletlere doku ağırlıklarınının 10 katı oranında **RIPA Lizis Tamponu** eklendi.

#### **RIPA Lizis Tamponu (mL)**

NaCl	150 mM
Tris pH:8.0	50 mM
Triton X-100	%1
Sodium deoksilat	%1
SDS %0.1	50 mg
DDT (0.5 mL of 1mM DTT)	1 mM
PMSF (1.75 mg)	0.2 mM
<b>Toplam</b>	<b>50 mL</b>

4. Peletlerden 20 µL alındı ve üzerine 10 µL **Örnek Çözme Tamponu** ilave edilerek toplam 30 µL jellere yüklendi.

#### **Örnek Çözme Tamponu (mL)**

H <sub>2</sub> O	3.55 mL
0.5 M Tris-HCl, pH: 6.8	1.25 mL
Glycerol	2.5 mL
10 % SDS	2.0 mL
0.5 % (w/v) bromophenol blue	0.2 mL
<b>Toplam</b>	<b>9.5 mL</b>

#### **SDS-PAGE jelini hazırlama (mini jel: 7x10 cm)**

<b>Jel içeriği</b>	<b>Ayırıcı jel (10 mL)</b>	<b>Tutucu jel (5mL)</b>
	<b>14%</b>	<b>4%</b>
H <sub>2</sub> O	2.7 mL	2.8 mL
1.5 M Tris-HCl, pH: 8.8	2.5 mL	
0.5 M Tris-HCl, pH: 6.8		1.5 mL
10 % SDS	100 µL	50 µL
30 % Acrylamide/Bis çözelti (29:1) (14.6 g acrylamide + 0.4 g bis-methylene- acrylamide in 50 mL nH <sub>2</sub> O)	4.7 mL	0.65 mL
10 % Ammonium persulfat (APS)	75 µL	50 µL
TEMED	7.5 µL	7.5 µL



5. 120V’ da yaklaşık 2 saat süren yürütme işleminden sonra jel sistemden (Mini Protean III cell (Bio-Rad)) çıkarılarak bantların boyanması için **Coomassie brilliant blue** solüsyonuna (çalkalamalı sistem üzerinde) bırakıldı.

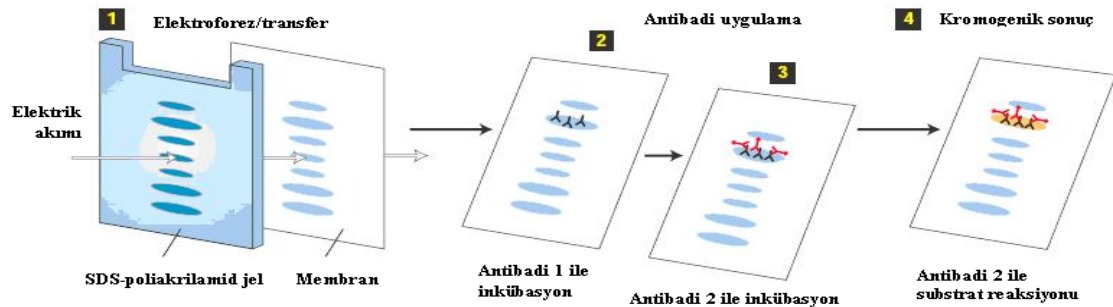
Coomassie Blue ile boyama		Boyanın uzaklaştırılması
Coomassie Blue R-250	1.25 g	-
Methanol	250 mL	400 mL
Glasiyal asetik asit	50 mL	75 mL
nH <sub>2</sub> O	200 mL	525 mL
<b>Toplam</b>	<b>500 mL</b>	<b>1000 mL</b>

6. Jeldeki fazla boyanın ayrılması ve daha net görülmesi için **Destaining** (boyanın uzaklaştırılması) solüsyonunda yıkandı.

8. Boya ortamından alınan jel daha sonra jel görüntüleme sisteminde UV-translimünatör yardımı ile görünür hale getirdi ve kamera sistemi ile bilgisayara aktardı.

### 3.6. Western Blot Yöntemi ile Kaspaz Aktivasyonunun Belirlenmesi

Western blot için nitroselüloz veya PVDF (polyvinylidene difluoride) membranlarından biri kullanılmaktadır. PVDF fiziksel olarak ve protein bağlama potansiyeli bakımından nitroselülozla göre daha avantajlıdır. Ancak PVDF’ nin kuru kalmaması gerekir ve bunu sağlamak içinde gerektiğinde metanole daldırmak gerekir. Kullanılacak membranın gözenek büyüklüğü genel olarak 0.45 mikrondur ancak 12 kDa’ dan daha küçük proteinler için 0.2 mikron büyüklüğündeki gözeneklere sahip membranların kullanılması gerekmektedir. Membran bloklamasında yağsız süt tozu, balık jelatini, sığır serum albümini (BSA), normal serum ve kazein kullanılmaktadır. Bunlar arasında marketlerde bulunabilen ve maliyeti bakımından diğerlerine göre oldukça ucuz olanı süt tozudur. Şekil 3.1’ de jelin PVDF membrana aktarılması gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Jelin PVDF membrana aktarılması

1. Önce filtre kağıtları **Transfer Tamponunda** ıslatıldı.

#### **Semi-Dry-Blot için Transfer Tamponu (mL)**

Tris base	5.8 gr
Glycine	2.9 gr
SDS	0.37 gr
Methanol	200 mL
<b>Toplam</b>	<b>1000 mL</b>

2. Sonra PVDF membran metanolde birkaç dk. (2-3) bekledikten sonra transfer tamponuna alındı.

3. PVDF membran bir kaç dk. transfer tamponunda bekledikten sonra Semi-Dry Western-Blotting cihazındaki transfer tamponunda ıslatılmış filtre kağıdının üzerine kondu.

4	Filtre kağıdı
3	Jel
2	PVDF membran
1	Filtre kağıdı

En altta ve en üstte filtre kağıdı olacak şekilde yukarıda da görüldüğü gibi membran, jel sırasıyla bir sandwich gibi sisteme yerleştirildi.

4. Sonra SDS-PAGE uygulaması yaptığımız jel birkaç dk. transfer tamponunda bekletildi ve membranın üzerine uygun şekilde yerleştirildi.

5. En üstede yine transfer tamponunda ıslatılmış filtre kağıdı konuldu. İyice transfer tamponunda ıslatılmış sandwich 30V` da 50 dk. akıma bırakıldı.

6. Süreyi takiben sistemden çıkarılan PVDF membran **fiksasyon solüsyonunda** 10 dk. bekletildi.

#### **Fiksasyon Solüsyonu (mL)**

Asedik asit (%10)	100 mL
nH <sub>2</sub> O	600 mL
Methanol (%30)	300 mL
<b>Toplam</b>	<b>1000 mL</b>

7. Saf suda çalkalandı. Sonra **Roth Black** solüsyonunda (hazır) gece boyunca bekletildi.

8. 1 gece Roth black solüsyonunda bırakılan PVDF membran ertesi gün küçük poşetin içine konup içerisine **birinci antibadi** solüsyonundan ekleyerek poşetin ağzı kapatıldı ve 2 saat çalkalamalı düzenekte bekletildi.

### **Birinci Antibadi Solüsyonu**

---

TBS pH: 8.0	6 mL
Aktif kaspaz-3 (birinci antibadi)	10 µL

---

9. 2,5 saat sonra birinci antibadi solüsyonundan alınan membran **TBST** (TBS, % 0.05 Tween 20) solüsyonunda 5' er dk. olacak şekilde 3 kez yıkandı.

10. Sonra alkalın fosfataz bağılı **ikinci antibadi** solüsyonu eklendi. Çalkalamalı sistemde 2 saat bekletildi. TBST solüsyonunda 3 kez yıkanıp 5' er dk. çalkalamalı sistemde bekletildi. 1 kez de TBS de yıkandı.

### **İkinci Antibadi Solüsyonu**

---

TBST	30 mL
Gt x Rb IgG Alk. Phos.	5 µL

---

(İkinci antibadi)

11. Boya reaksiyonu için 1 adet NBT-BCIP tableti (Sigma fast tablet B5655) 20 mL nH<sub>2</sub>O da çözüldü. Bu solüsyonda PVDF membran yaklaşık 5 dk. karanlık ortamda bekletildi.

12. PVDF membranda oluşan bantlara bakılarak Kaspaz-3 (17 kDa)' ün görüntüsü elde edildi.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

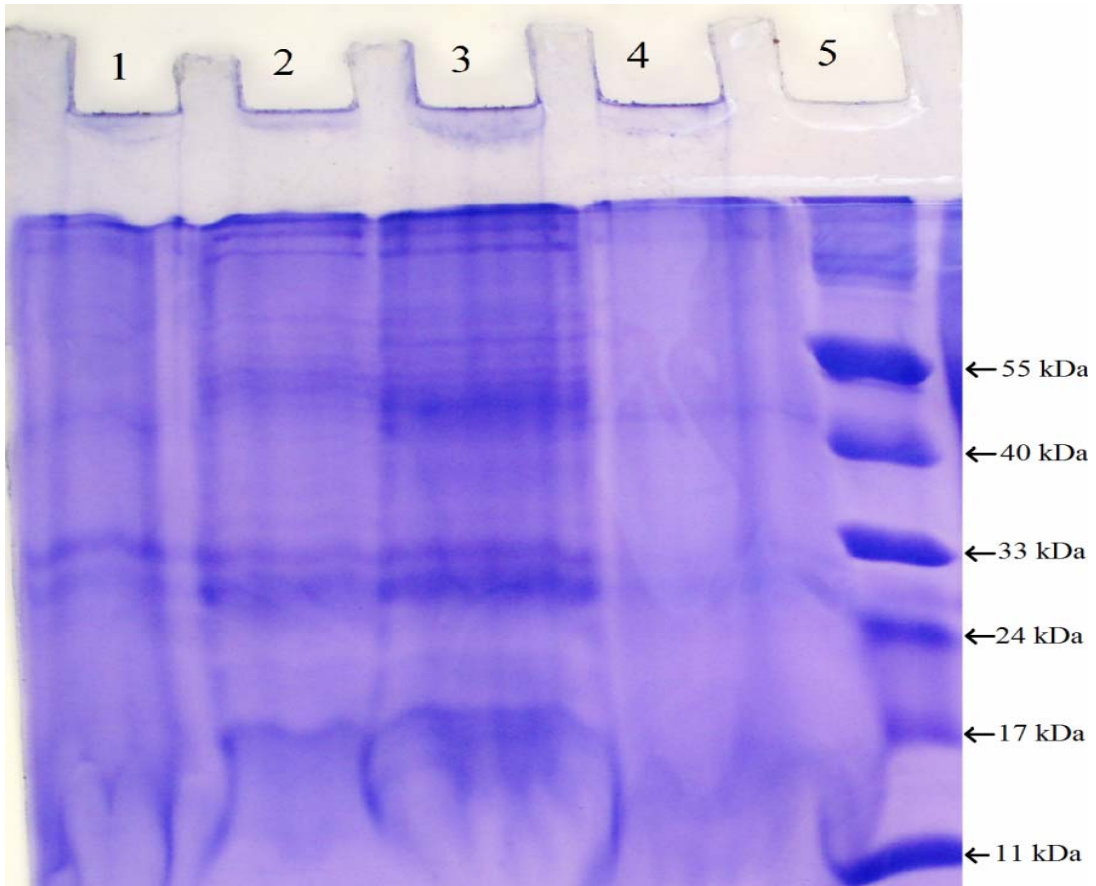
Çalışmamızda iskemi-reperfüzyon sonucunda oluşan apoptozisten birinci derecede sorumlu olan kaspaz-3 enzimi (17 kDa) SDS-PAGE ve Western-Blot teknikleri ile incelenmiştir.

##### 4.1. SDS- PAGE Jel Elektroforezi Sonuçları

Dokulara SDS-PAGE uygulaması yaparak, ortamdaki protein moleküllerinin bantlara ayrılması ve görüntülenmesi sağlandı.

Jeldeki sıralama:

1                      2                      3                      4                      5  
Kontrol grubu    Melatonin grubu    İskemi grubu    Melatonin + İskemi grubu    Standart  
St: ( Page ruler prestained protein ladder #SM0671)



Şekil 4.1 SDS-PAGE elektroforezi

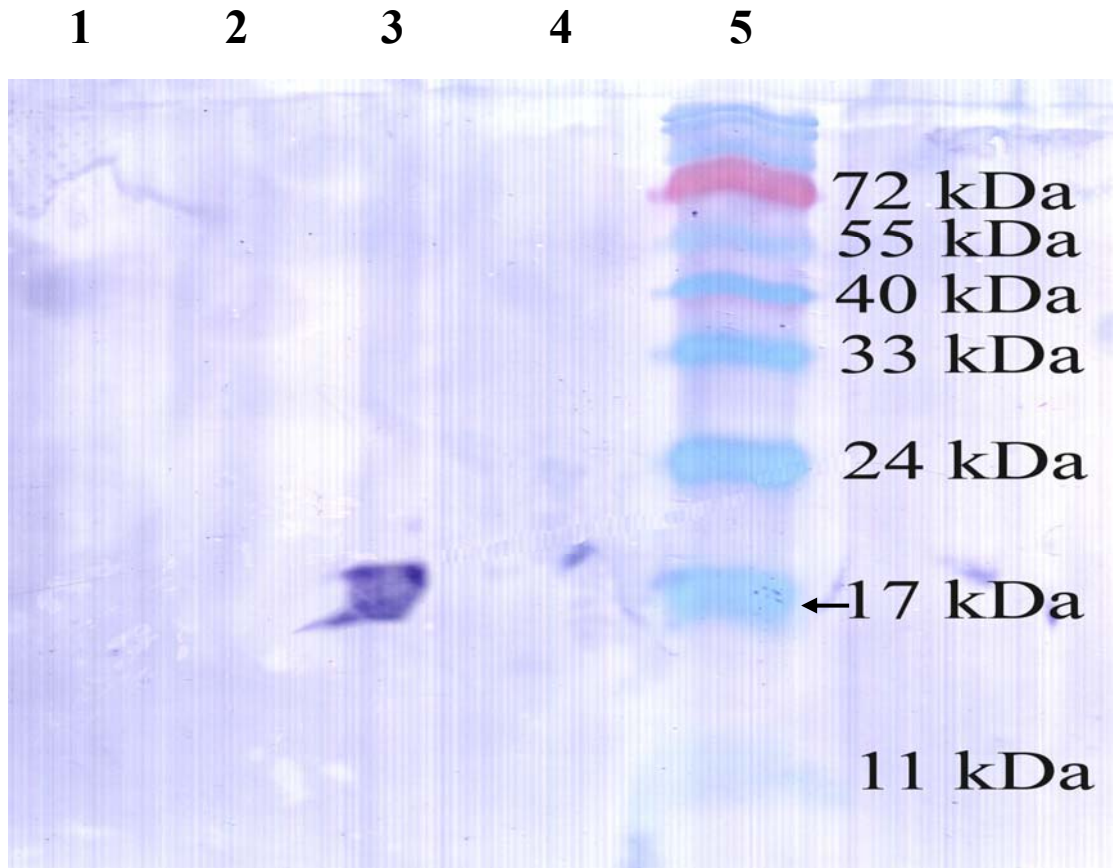
Şekil 4.1' de görüldüğü gibi kontrol (1) ve melatonin grubunda (2) protein bantları tam belirgin gözlenmemiş olup, iskemi grubunda (3) ise apoptozis göstergesi olarak kaspaz-3 için belirleyici olan Standart' da (5) 17 kDa' na karşılık gelen bölgede daha belirgin bir protein bantı gözlenmiştir. Melatonin + İskemi grubunda (4) ise 17 kDa' na karşılık gelen kısımda tam bir protein bantı gözlenmemiştir.

#### 4.2. Western Blot Sonuçları

Western-Blot uygulaması ile kaspaz-3' e özgü antikorlar kullanılarak, SDS-PAGE yapılan jelde kaspaz-3 enziminin varlığı, oluşan bantlara bakılarak tespit edildi.

Jeldeki sıralama:

1                      2                      3                      4                      5  
Kontrol grubu    Melatonin grubu    İskemi grubu    Melatonin + İskemi grubu    Standart



Şekil 4.2 Western-Blot tekniğiyle elde edilen kaspaz-3' ün görüntüsü

Şekil 4.2' de görüldüğü gibi kontrol (1) ve melatonin grubunda (2) herhangi bir hasar olmadığından dolayı, kaspaz-3 enzimi için belirleyici olan Standart' da (5) 17 kDa' na karşılık gelen bölgede herhangi bir bant gözlenmemiştir. Spinal kord iskemisi yapılan grupta (3) ise Standart' da 17 kDa' na karşılık gelen bölgede belirgin bir bant görülmüştür. Bu bant kaspaz-3 (17 kDa) enziminin varlığını ve dolayısıyla apoptozisin gerçekleştiğini gösterir. Melatonin+iskemi grubunda (4) ise melatoninin koruyucu etkisinin yanı sıra anti-apoptotik etkisinden dolayı oluşan iskemik hasarı önlemiş olduğundan bir bant görülmemiştir.

SDS-PAGE ve Western-Blot analizlerinden elde edilen sonuçlara göre iskemi-reperfüzyon oluşturulan sıçanlarda apoptozisin göstergesi olan kaspaz-3 enziminin miktarında artma olduğu ve dolayısıyla bu hayvanlarda hücre intiharının teşvik edilmiş olduğu gerçeği ortaya çıkmıştır. Antioksidan uygulanan hayvanlarda ise genel olarak aktif kaspaz-3 miktarının hasta gruba oranla az olduğu görülmüştür.

Uygulanan deneysel iskemi modeli ile spinal kordda, melatonin ve kontrol gruplarında hasar olmadığından dolayı apoptozisin artmadığı, iskemi grubunda belirgin olarak apoptotik ölümün tetiklendiği ve arttığı, melatonin+iskemi grubunda ise melatonin uygulaması ile hücre ölümünün azaldığı dolayısıyla doku hasarının azaldığı ve nörolojik iyileşmeyi hızlandırdığı sonucuna varıldı.

## 5. TARTIŞMA

Spinal kord iskekiye en duyarlı organ olup, buradaki hasar kısmi felç veya tam felç ile sonuçlanabilir. Bu hasarı önlemeye yönelik pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen etkili herhangi bir tedavi şekli bulunabilmiş değildir ve arayışlar halen sürmektedir.

Spinal kord iskemisi halen deneysel aşamada farklı tavşan ve sıçan modelleri üzerinde yapılmış olmasına rağmen, insan için etkili ve yüz güldürücü bir gelişme sağlanamamıştır.

İnsan spinal kord yaralanmalarında ve deneysel modellerde spinal kord hasarının en önemli sebebi iskeminin oluşmasıdır [78, 85]. İskemi omuriliğin kendisini ve çevresindeki dokuları etkiler. Bu nedenle spinal kordun arteriyel dolaşımının ve beslenme özelliklerinin çok iyi bilinmesi gerekir. Medulla spinalisin metabolik ihtiyaçları ve bunun için gerekli olan kan akımı arasında hassas bir denge vardır. Otoregülasyon mekanizması ile enerji üretimi için gerekli olan oksijen ve diğer substratların temini, atık maddelerin uzaklaştırılması belirgin bir dengede tutulur. Araştırmacılar spinal kord yaralanması sonrası spinal korda kan akımı otoregülasyonunun bozulduğunu bildirmişlerdir [9]. Otoregülasyonun bozulması spinal kord iskemisini artırır.

Nöral doku iskekiye çok duyarlı olup oksijen depo edemediği ve rejenere olamadığı için, oksijen desteği kritik değerlerin altına düştüğü zaman canlılığını sürdüremeyecektir. Hasarın şiddeti, hipoksinin süresi ve derinliğine bağlıdır. Hipoksi durumunda hücre canlılığın devamı için gerekli olan enerji (ATP), glikojen depolarından glikoliz yoluyla yani anaerobik yolla üretilmeye başlar. Bu esnada aerobik glikoliz nerdeyse durma noktasına gelir [38, 53].

Spinal kord yaralanmasının ardından hücre içi ve dışı kompartmanları arasında ciddi elektrolit değişiklikleri olmaktadır. Kalsiyumun hücre içi artışı özellikle iskekiye ve travma da daha fazla olmak üzere tüm nöral yaralanmalarda başrol oynamaktadır. Kalsiyum iyon konsantrasyonu ekstraselüler aralıkta hücre içine göre 1000 kat daha fazladır. Spinal kord yaralanmalarında bu büyük gradient farkı ile hücre içine  $Ca^{++}$  iyon girişi olur [37, 71].

İskeminin neden olduğu hasarın önemli bir kısmının reperfüzyon sırasında post-iskemik dönemde olduğu düşünülmektedir. Livesay vd. kros-klemp zamanının 30 dk. aşması halinde felç riskinin %3' ten %11' e yükseldiğini göstermişlerdir [1]. 30 dk.' yı

aşan durumlarda çeşitli koruyucu yöntemlere başvurulmaktadır. 1993' de Johson vd. tavşanda spinal kordda uygulanan 25 dk.' lık klemplemenin sonucunda verilen flunarizin ve prosasiklinin nörolojik hasarı azalttığını ortaya koymuşlardır [9].

Çalışmamızda, anatomisinin kedi ve köpek gibi diğer büyük hayvanlarınkine göre daha basit, uygulama yapılmasının kolay ve başarı oranının yüksek olması nedeniyle sıçan modeli çalışılmaya değer bulunmuştur.

Deneyimizde damar klip' i kullanılarak yapılan iskemi ve reperfüzyonun amacımıza uygun, zaman ve iş gücünden kazanç sağlayabilir olması ile literatürdeki geçmiş çalışmalara emsal teşkil etmekte faydası nedeni ile Zivin ve arkadaşları tarafından geliştirilen spinal kord iskemi modelini kullandık [96]. Pek çok çalışmada spinal kord hasarı oluşturmak için aynı yöntem kullanılmıştır.

Reperfüzyona, doku pH' sının azalmasına neden olan laktat benzeri asit metabolitlerinin neden olduğu öne sürülmüştür [2]. İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında gerçekleşen, dokunun tekrar oksijenle beslenmesi bir yandan nöronal canlılığın devamını sağlarken diğer yandan da reaktif oksidanların oluşumuna yol açan sayısız enzimatik reaksiyon için substrat olarak gerekli oksijeni ortama getirmektedir.

Sonuçta nöronal dokuda iskeminin derinliği, süresi ve reperfüzyonda oluşan reaktif oksidan miktarı ile ilişkili olarak hücrenin temel makromoleküler yapılarında meydana gelen değişiklikler nedeniyle farklı derecelerde fonksiyonel ve morfolojik doku hasarı ortaya çıkmaktadır [79].

Spinal kord iskemisi sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri nöronal stabiliteyi bozarak direkt doku hasarının oluşturulması nedeni ile merkezi sinir sistemine ait pek çok patolojik durumda rol oynarlar. Bu serbest radikaller, kalsiyum hücre içi dengesini değiştirmek, metabolik fonksiyon bozukluğu oluşturmak ve eksitoksisite gibi çok sayıda mekanizmalarla doku hasarı oluşturarak, hücrede apoptozisi gerçekleştirirler [67].

Spinal kord hasarı sonrası meydana gelen hücre ölümü son zamanlara kadar doku hasarına eşlik eden iskemik ve inflamatuvar reaksiyonların bir sonucu olarak gelişen nekroz ile açıklanmıştır. Bununla birlikte bugün, daha önce sadece merkezi sinir sisteminin gelişim sürecinde var olduğu düşünülen apoptozisin spinal kord hasarında ve nöronal hasarda önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir [73].

Apoptozisde amaç, dış ortama salındıklarında, immünogenetik ve inflamatuvar istenmeyen etkiler oluşturabilecek sitoplazmik yapıların zararsızca uzaklaştırılması sağlanmaktadır. Böylece hücre, çevredeki hiçbir hücreye zarar vermeden ortadan



kaldırılmış olur. Apoptozis aktif bir süreç olup en azından bu sürecin başında iç ve dış uyaranlara karşı özgül genlerin aktivasyonuna gereksinim vardır. Bu aktif süreç pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin aktivasyonu ile düzenlenmektedir [40, 48].

Taşkın vd. farelerde oluşturdukları solid tümör modelinde pro-apoptotik bir madde olan *curcumin* uygulaması yaparak apoptozisi indüklediğini göstermişlerdir [98]. 2003 yılında Chiou vd. anti-apoptotik bir protein olan *survivin*' in apoptozisi inhibe ettiğini ve hücrel sirkülasyonu düzenlediğini belirtmişlerdir [99]. Yoo vd. mide kanserinde yüksek oranda hem başlatıcı hemde sonlandırıcı kaspazların rol aldığı belirlenmiştir [100]. Alzheimer ve lösemi hastalığında, kaspaz-3 enziminin apoptozisde aktif rol üstlendiği tespit edilmiştir [101, 102].

Roseborough vd. spinal kordda apoptozisi göstermişler [29]. Çelik vd. eritropoetin uygulamasının spinal kord iskemisinde motor nöronlarda apoptozisi ve nörolojik kayıpları önlediğini belirtmişlerdir [53]. Ashwell vd. tarafından 2000 yılında yaptıkları çalışmalarında travmatik spinal kord hasarı sonrasında ilk 5 dakika içinde nöronal ve apoptotik hücre görülmemesine rağmen, 4 saat sonra nöronlarda apoptozis görülmüş ve 24. saatte en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir. Aynı yazarlar apoptozisi hücrenin bir intihar şekli olarak tanımlamış ve nükleer büzülme, DNA fragmentasyonu ile karakterize olduğunu bildirmiş ve nöronlarda, astrositlerde, oligodentrositlerde ve mikroglialarda apoptotik hücre ölümüne dikkat çekmişlerdir [9]. Chen vd. beyin iskemisinde reperfüzyondan bir saat sonra kaspaz aktivasyonunun meydana geldiğini gözlemişlerdir [103]. Takagi vd. 2002 yılında EGME (etilen glikol monoetil eter) adı verilen evlerde temizlik amaçlı kullanılan kimyasal maddenin özellikle kemiklerde toksik etki oluşturarak kaspaz-3' ü aktive ederek hücre ölümüne neden olduğunu göstermişlerdir [104]. Daşdağ vd. sıçanları, günde iki saat olmak koşuluyla bir hafta boyunca cep telefonundan yayılan mikrodalga ışınlarına maruz bırakarak apoptozisin tetiklenmesinde radyasyonun etkisini göstermişlerdir [105].

Deneysel spinal kord yaralanmalarında nöroprotektif etkili çok sayıda madde denenmiştir. Bracken vd. 1991 de yaptıkları bir çalışmada yaralanmadan sonra 8 saat içinde başlayıp 24 saat süren tedavide verilen yüksek doz *MPSS* (metil prednisolon), nörolojik fonksiyonu iyileştirdiğini göstermişlerdir [9]. Svensson vd. maymun modelinde *papaverin*, lipofilik kalsiyum kanal blokleri olan *flunarizin* spinal kord hasarına karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir [1]. Jian Luo ve Riyi Shi spinal kord hasarında *PEG* (polyethylene glycol) vererek kaspazların aktivasyonunun engellediğini dolayısıyla apoptozisin gerçekleşmediğini gözlemişlerdir. Böylece oluşan hasar

PEG uygulaması ile ortadan kalkmıştır [106]. Kızıltepe vd. bir kırmızı şarap polifenolü olan *resveratrol*' ün spinal kord hasarı üzerindeki koruyucu etkisini göstermişlerdir [3]. Fan vd. anti-apoptotik ve nöroprotektif etkisi bilinen *tetramethylprazine*' nin spinal kord iskemisinde oluşan hasarı önlediği belirlemiştir [107].

Melatoninin ilk dikkat çeken özelliği nöroendokrin-reproduktif eksen üzerine olan etkisidir. Daha sonra immün sistem üzerine olan etkileri fark edilmiştir. 1980' li yılların sonunda ise onkostatik ve yaşlanmayı geciktirici özelliği ortaya konan melatoninin son zamanlarda serbest radikal yakalama özelliği üzerinde durulmaktadır. Aslında melatoninin tüm bu özellikleri, serbest radikal yakalayıcı özelliğinin bir sonucudur. Melatonin özellikle organizmada yapılan ve son derece tahrip edici olduğu düşünülen hidroksil radikalının (-OH) dokulardaki olumsuz etkilerini engellemektedir. Melatoninin nöronları koruyucu aktivitesi sebebiyle, kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçmektedir. Böylece pek çok hastalığın tedavisinde kullanılmaya uygundur [86].

Genellikle eksojen kimyasal içerikli maddeler kullanılmış iken, melatonin gibi endojen kaynaklı maddelere gösterilen ilgi azdır. Mayo vd. melatoninin nöronal apoptozisi engellediğini göstermişlerdir [46]. Sainz vd. 2003 yılında yaptıkları çalışmada melatoninin, mitokondriden serbest radikal oluşumunu engelleyerek apoptozis oluşumunu önlediğini gözlemlemiştir [83]. Kavaklı vd. beyin iskemisi oluşturulan sıçanlarda dışarıdan verilen melatoninin en az fizyolojik melatonin kadar koruyucu olduğunu göstermişlerdir [108]. Kim vd. sıçan karaciğer iskemisinde uyguladıkları melatoninin nekroz ve apoptozisi azaltarak doku hasarını engellemiştir [79]. Kunduzova vd. sıçanlarda renal iskemi-reperfüzyon hasarında verilen melatoninin kaspaz-3 aktivasyonunu engelleyerek apoptozun oluşumunu önlemiş ve oluşan hasar engellenebilmiştir [84].

Melatoninin oksidatif stres halinde membran lipid peroksidasyonunu ve nükleer DNA oksidasyonunun azaltarak, serbest radikallerin tetiklendiği hücre ölümünde anti-apoptotik ajan olarak rol alması ile açıklamışlardır. Koçak vd. 2003 yılında tavşanlarda spinal kord iskemisinde tedavi amaçlı verilen melatoninin hasar sırasında artan enzim seviyelerinin (MDA) düşmesini, azalan enzim (GSH) seviyelerinin artmasını sağlayarak koruyucu rol oynadığını göstermişlerdir [109]. Kalkan vd. spinal kord iskemisi oluşturulan tavşanlarda antioksidan olan çinko ve melatonin uygulamasında, melatoninin çinkoya oranla daha koruyucu olduğu görülmüştür [110]. Gül vd. sıçanlarda oluşturulan spinal kord hasarında melatoninin farklı dozlarını uygulayarak, hasarı önlemede 50mg/kg yeterli olduğunu gözlemlemiştir [85]. Bizde

çalışmamızda 50 mg/kg melatonin olacak şekilde deneklere uygulama yaptık.

Yaptığımız çalışmada, spinal kord iskemisi sonrası 48. saatte sakrifiye edilen deneklerden alınan dokuların, Western-Blot tekniğiyle incelenmesi sonucunda, spinal iskemi grubunda kaspaz-3 enzimi (17 kDa) ne ait bant, kontrol ve melatonin grubuna göre belirgin bir şekilde ortaya çıktığı gözlenmiştir. Buda apoptotik hücre ölümünün anlamlı düzeyde artışını göstermektedir. Melatonin-iskemi grubunda ise melatoninin koruyucu etkisinden dolayı, kaspaz-3 enzimi için belirleyici bir bant gözlenmemiştir. Buda melatoninin anti-apoptotik özelliğinin göstergesi olarak apoptozise giden hücrelerin azalmış hatta tamamen ortadan kalkmış olduğunu gözlemledik.

Apoptozis yaşamın sürdürülmesinde temel mekanizma olarak görülmektedir. Bu yüzden etkenini tam olarak açıklayamadığımız pek çok hastalığın aydınlatılmasında ve beklide tedavisinde ileride anahtar rol oynayabilecektir. Apoptozisin rol oynama potansiyeli olan konular;

1. Malignite patogenezi ve etkeninin tanımlanması,
2. Kanser tedavisi,
  - a) Gen tedavisi, apoptozisi aktive eden kemoterapi, hormon tedavisi
  - b) Tümörün tedaviye vereceği yanıtın saptanması (apoptoziste etkin genlerin saptanması)
3. Hücre yaşlanması ve dolayısıyla yaşlanmanın önlenmesi,
4. Dejeneratif, otoimmün hastalıklar ve astım tedavisinde yeni yöntemlerin geliştirilmesi,
5. AIDS' de apoptozisin önlenmesiyle immün baskılama sağlanması.

Bizim bu çalışmamızda, deneysel spinal kord iskemisi sonrası gelişecek apoptozis ve doku hasarını, dışarıdan verilecek olan melatonin ile engellenebileceğini ve hasarlanmayı azaltabileceğini gözlemledik. Melatoninin antioksidan enzimler üzerine koruyucu etkisi sebebiyle serbest radikaller ve oksidatif stresin yaratacağı apoptozis üzerinde olumlu etkileri olduğu saptanmıştır.

Melatoninin hem antioksidan özelliği hemde bu anti-apoptotik özelliği sayesinde, gelecekte yapılacak olan daha fazla in-vitro ve in-vivo çalışmalarla birlikte iskemik spinal kord hasarında apoptozis mekanizmasının tamamen aydınlanmasıyla beraber tek başına veya diğer anti-apoptotik ajanlarla birlikte kombine edilerek spinal kord iskemisi tedavisinde kullanılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Ö.Tetik, A. Gürbüz, *Spinal Cord Protection*, **TGKDÇD**, 8:2 (2000) 587-592.
- [2] M. Birincioglu, İskemi-reperfüzyon tekniklerine genel giriş, Gaziantep, Mayıs. 21, (2004)
- [3] U. Kızıltepe, N.N. Turan, Ü. Han, T. Ulus, F. Akar, *Spinal Cord Protection With Resveratrol: Neurological and Histopathological Findings*, **Turkish J. Vasc. Surg**, 12:2 (2003) 17-23.
- [4] V.Antar, “*Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan QVD-OPH'nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi*” PhD Thesis, İstanbul University Turkey, 2005.
- [5] H.Parlakpınar, M.Koç, A.Acet, *The Effects of Apoptosis and Melatonin Levels on Aging*, **T. Klin. J. Med. Sci.**, 24:1 (2004) 62-67.
- [6] A. Çam, M.F. Erdoğan, *Melatonin*, **Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası**, 56:2 (2003) 103-112.
- [7] H. Öniz, *Apoptosis: The Death Decision*, **SSK Tepecik Hast. Derg.**, 14:1 (2004) 1-20.
- [8] A. Hotti, “*Caspases in c-Myc-induced apoptosis*” PhD Thesis, University of Helsinki Finland, 2000.
- [9] A.Güler, “*Deneysel akut spinal kort kontüzyon yaralanmalarında amifostine'nin nöroprotektif etkisi*” PhD Thesis, Ankara Numune Eğitim ve Araşt. Hast., Türkiye, 1999.
- [10] H.Ma, K. Shieh, G.Chen, *Apoptosis*, **Nature and Science**, 3:2 (2005) 1-4.
- [11] S. Öktem, M.H.Özhan, D.Özol, *Apoptozisin Önemi*, **Toraks Dergisi**, 2:1 (2001) 91-95.
- [12] B. Erdoğan, E. Uzaslan, *Apoptosis Mechanism: Fas-FasL-Mediated Apoptosis in Tumour Development*, **Akciğer Arşivi**, 4:1 (2003) 165-174.
- [13] B. Turgut, T. Demir, Ü. Celiker, *Oftalmolojide Apoptoz*, **Fırat Tıp Dergisi**, 11:1 (2006) 6-11.
- [14] R.C. Bleackley, J.A. Heibein, *Enzymatic control of apoptosis*, **Nat. Prod. Rep.**, 18:1 (2001) 431-440.
- [15] A. Lawen, *Apoptosis-an introduction*, **BioEssays**, 25:9 (2003) 888-896.
- [16] F. Öztürk, *Apoptoz*, **İnönü Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi**, 9:2 (2002) 143-148.
- [17] C. Volbracht, M. Leist, S.A. Kolb and P. Nicotera, *Apoptosis in Caspase-inhibited Neurons*, **Molecular Medicine**, 7:1 (2001) 36-48.
- [18] <http://www.sgul.ac.uk/deps/immunology/~dash/apoptosis/apoptosis.pdf>
- [19] E. Ulukaya, “*Apoptozis Ders Notları*” Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Türkiye, 2003
- [20] F. Cheah, M.B. Hampton, B.A. Darlow, C.C. Winterbourn, M.C.M.Visser, *Detection of apoptosis by caspase-3 activation in tracheal aspirate neutrophils from premature infants: relationship with NF-κB activation*, **Journal of Leukocyte Biology**, 77:3 (2005) 432-437.
- [21] E. Kalkan, O. Eser, M. Coşar, H. Fidan, S. Kalkan, *Apoptosis and cerebral ischemic shock: experimental study*, **Turkish Journal of Trauma&Emergency Surgery**, 12:4 (2006) 263-267.
- [22] P. Nicotera, *Molecular Switches Deciding the Death of Injured Neurons*, **Oxford Journals, Toxicological Sciences**, 74:1 (2003) 4-9.
- [23] J.J. Cohen, *Apoptosis Immunology Today*, 14:3 (1993) 126-130.

- [24] H. Kim, S. Jeong, J. Lee, B. Kim, J. Kim, S. Jeong, I. Kim, *Induction of apoptosis in human leukemia cells by 3-deazaadenosine is mediated by caspase-3-like activity*, **Experimental and Molecular Medicine**, 32:4 (2000) 197-203.
- [25] S. Carloni, E. Mazzoni, M. Cimino, M.G. Simoni, C. Perego, C. Scopa, W. Balduini, *Simvastatin reduces caspase-3 activation and inflammatory markers induced by hypoxia-ischemia in the newborn rat*, **Neurobiology of Disease**, 21:1 (2006) 119-126.
- [26] M. Ozansoy, A.N. Başak, *Programmed Cell Death in Parkinson's Disease*, **Parkinson Hast. Hareket Boz. Der.**, 9:1 (2006) 54-61.
- [27] R.M. Friedlander, *Apoptosis and Caspases in Neurodegenerative Diseases*, **N. Engl. J. Med.**, 348:14 (2003) 1365-1375.
- [28] G. Kim, Y. Chun, J. Park, M. Kim, *Role of apoptosis-inducing factor in myocardial cell death by ischemia-reperfusion*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 309:3 (2003) 619-624.
- [29] G. Roseborough, R. Lin, D. Gao, A. McHale, L. Chen, G.M. Williams, C. Wei, *DNA damage and repair in human spinal cord following ischemia-reperfusion injury*, **Journal of Cardiothoracic-Renal Research**, 1:2 (2006) 141-145.
- [30] S.S. Yadav, D. Sindram, D.K. Perry, P.A. Clavien, *Ischemic Preconditioning Protects the Mouse Liver by Inhibition of Apoptosis Through a Caspase-Dependent Pathway*, **Hepatology**, 30:5 (1999) 1223-1235.
- [31] O. Akdemir, İ. Berksoy, A. Karaoğlan, Ş. Barut, K. Bilguvar, B. Çirakoğlu, E. Şahan, A. Çolak, *Therapeutic efficacy of Ac-DMQD-CHO, a caspase3 inhibitor, for rat spinal cord injury*, **J. Clin. Neurosci.**, 15:6 (2008) 672-678.
- [32] A.V. Gordeeva, Y.A. Labas, R.A. Zvyagilskaya, *Apoptosis in Unicellular Organisms: Mechanisms and Evolution*, **Bach Institute Biochemistry**, 69:10 (2004) 1055-1066.
- [33] <http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/signaltrans/apoptosis.htm>
- [34] K. Matsushita, Y. Wu, J. Qiu, L. Lang-Lazdunski, L. Hirt, C. Waeber, B. T. Hyman, J. Yuan, and M. A. Moskowitz *Fas Receptor and Neuronal Cell Death after Spinal Cord Ischemia*, **The Journal of Neuroscience**, 20:18 (2000) 6879-6887.
- [35] M. Schuler and D.R. Gren, *Mechanisms of p53-dependent apoptosis*, **Biochem. Soc. Trans.**, 29 (2001) 684-688.
- [36] S. Aydemir "Ovaryum tümörlerinde p53 cDNA mutasyonları" PhD Thesis İnönü University Turkey, 1999.
- [37] L. Berliocchi, D. Bano and P. Nicotera, *Ca<sup>2+</sup> signals and death programmes in neurons*, **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.**, 360:1 (2005) 2255-2258.
- [38] R. Ventimiglia, L. Lau, R.A. Kinloch, A. Hopkins, E.H. Karran, L.P. Petalidis, R.V. Ward. *Role of caspases in neuronal apoptosis*, **Drug Development Research**, 52:4 (2001) 515-533.
- [39] I. Budihardjo, H. Oliver, M. Lutter, X. Luo and X. Wang, *Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis*, **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, 15 (1999) 269-290.
- [40] G.M. Cohen, *Caspases: the executioners of apoptosis*, **Rew. Article Biochem J.**, 326 (1997) 1-16.

- [41] L. Eckhart, A. Uthman, W. Sipos, and E. Tschachler, *Genome Sequence Comparison Reveals Independent Inactivation of the Caspase-15 Gene in Different Evolutionary Lineages of Mammals*, **Mol.Biol.Evol.**, 23:11 (2006) 2081-2089.
- [42] M.A. Davoli, J. Fourtounis, J. Tam, S. Xanthoudakis, D. Nicholson, G.S. Robertson, G.Y. Ng and D. Xu, *Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat*. **Neuroscience**. 115:1 (2002) 125-136.
- [43] D.M. Cittelly, O. Nestic, K. Johnson, C. Hulsebosch, J.R. Perez-Polo, *Detrimental effects of antiapoptotic treatments in spinal cord injury*, **Experimental Neurology**, 210 (2008) 295-307.
- [44] R. Onur, A. Semerciöz, I. Orhan and H. Yekeler, *The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele*, **Urological Research**, 32:3 (2004) 204-208.
- [45] G. Baydas, R.J. Reiter, M. Akbulut, M. Tuzcu, S.G. Tamer, *Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome C translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels*, **Neuroscience** 135:3 (2005) 879-886.
- [46] R.M. Sainz, J.C. Mayo, C. Rodriguez, D.X. Tan, S. Burillo, R.J. Reither, *Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells*, *Cellular and molecular life sciences* , **Cellular and Molecular Life Sciences**, 60:7 (2003) 1407-1426.
- [47] E. Sakallı Çetin, N. Özçelik, *Apoptotic Mechanism of Mistletoe (Viscum Album) Extract Used in the Treatment of Cancer*, **Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.**, 27:1 (2007) 533-539.
- [48] S.Orrenius, *Mitochondrial regulation of apoptotic cell death*, **Toxicology Letters**, 149:1-3 (2004) 19-23.
- [49] R. Ofir, R. Seidman, T. Rabinski, M. Krup, V. Yavel'sky, Y. Weinstein and M. Wolfson, *Taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian and MCF7 breast carcinoma cells is caspase-3 and caspase-9 independent*, **Cell Death and Differentiation**, 9:6 (2002) 636-642.
- [50] N.A. Thornberry, *The caspase family of cysteine proteases*, **British Medical Bulletin**, 53:3 (1996) 478-490.
- [51] J. Marsala, D. Kluchova, M. Marsala, *Spinal cord gray matter layers rich in NADPH diaphorase-positive neurons are refractory to ischemia-reperfusion-Induced injury : A histochemical and silver impregnation study in rabbit* **Experimental Neurology**, 145:11 (1997) 165-179.
- [52] D. Cizkova, J.B. Carmel, K. Yamamoto, O. Kakinohana, D. Sun and R.P Hart, M. Marsala, *Characterization of spinal HSP72 induction and development of ischemic tolerance after spinal ischemia in rats*, **Experimental Neurology**, 185:1 (2004) 97-108.
- [53] M. Çelik, H. Gökmen, S. Erbayraktar, M. Akhisaroğlu, S. Konakçı, Ç. Ulukuş, Ş. Genç, K. Genç, E. Sağıroğlu, A. Cerami and M. Brines, *Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurological disability in experimental spinal cord ischemic injury*, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99:4 (2002) 2258-2263.

- [54] D.C. Harrison, A.D. Medhurst, B.C. Bond, C.A. Campbell, R.P. Davis and K.L. Philpott, *The use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia--caspase-3 as a case study*, **Molecular Brain Research**, 75:1 (2000) 143-149(7)
- [55] B.A. Citron, P.M. Arnold, C. Sebastian, F. Qin, S. Malladi, S. Ameenuddin, M.E. Landis, B.W. Festoff, *Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury : mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death*, **Experimental Neurology**, 166:2 (2000) 213-226.
- [56] N. Yilmaz, S. Pençe, *Kaspazlar*, **İbni Sina Tıp Dergisi**, 7 (2002) 127-145.
- [57] M.A. Moskowitz, D.A. Le, M.J. Whalen, *Caspases and upstream mechanisms in central nervous system ischemic injury*, **International Congress Series**, 1252 (2003)155-161.
- [58] M. Miura, X. Chen, M.R. Allen, Y. Bi, S. Gronthos, B. Seo, S. Lakhani, R.A. Flavell, X. Feng, P.G. Robey, M. Young, S. Shi, *A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells.*, **J. Clin. Invest.**, 114:12 (2004) 1704-1713.
- [59] S. Namura, J. Zhu, K. Fink, M. Endres, A. Srinivasan, K.J. Tomaselli, J. Yuan, and M.A. Moskowitz, *Activation and Cleavage of Caspase-3 in Apoptosis Induced by Experimental Cerebral Ischemia* , **The Journal of Neuroscience**, 18:10 (1998) 3659-3668.
- [60] P.A. Lapchak, D.M. Araujo, C.J. Weir, J. Wei, J.A. Zivin, *Effects of intrathecal administration of a cell permeant caspase inhibitor, boc-d-fluoromethylketone (BDFMK), on behavioral deficits following spinal cord ischemia: a dose-response analysis*, **Brain Research** 959 (2003) 183-190.
- [61] R. Cursio, J. Gugenheim, J.E. Ricci, D. Crenesse, P. Rostagno, L. Maulon, M.C. Saint-Paul, B. Ferrua, J. Mouiel, P. Auberger, *Caspase inhibition protects from liver injury following ischemia and reperfusion in rats*, **Transplant International**, 13:1 (2000) 568-572.
- [62] B. Zech, R. Köhl, A. von Knethen, B. Brüne, *Nitric oxide donors inhibit formation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome and activation of caspases.*, **Biochem J.**, 371:3 (2003) 1055–1064.
- [63] X. Wang, C. Zhu, X. Wang, H. Hagberg, L. Korhonen, M. Sandberg, D. Lindholm and K. Blomgren, *X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein protects against caspase activation and tissue loss after neonatal hypoxia–ischemia*, **Neurobiology of Disease**, 16:1 (2004) 179-189.
- [64] J. Chen, T. Nagayama, K. Jin, R.A. Stetler, R.L. Zhu, S.H. Graham, and R.P. Simon, *Induction of Caspase-3-Like Protease May Mediate Delayed Neuronal Death in the Hippocampus after Transient Cerebral Ischemia*, **The Journal of Neuroscience**, 18:13 (1998) 4914-4928
- [65] Abdel-Raheim M.A. Meki, Emade El-Dein F. Esmail, Ahmed A. Hussein and Hamdy M. Hassanein, *Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin*, **Toxicol**, 43:1 (2004) 93-100.
- [66] J.E. Springer, R.D. Azbill, S.A. Nottingham, and S.E. Kennedy, *Calcineurin-Mediated BAD Dephosphorylation Activates the Caspase-3 Apoptotic Cascade in Traumatic Spinal Cord Injury*, **The Journal of Neuroscience**, 20:19 (2000) 7246-7251.
- [67] N. Dilsiz, A. Sahaboglu, M.Z. Yıldız, A. Reichenbach, *Protective effects of various antioxidants during ischemia-reperfusion in the rat retina*, **Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, 244:5 (2006) 627-633.

- [68] T. Hayashi, M. Sakurai, K. Abe, M. Sadahiro, K. Tabayashi, Y. Itoyama, *Apoptosis of Motor Neurons With Induction of Caspases in the Spinal Cord After Ischemia*, **American Heart Association, Inc.**, 29:5 (1998) 1007-1013.
- [69] K. Lu, C. Liang, H. Chen, S. Chen, H. Hsu, P. Liliang, T. Lin and C. Cho, *Injury severity and cell death mechanisms: effects of concomitant hypovolemic hypotension on spinal cord ischemia–reperfusion in rats*, **Experimental Neurology**, 185:1 (2004) 120-132.
- [70] A. Rami, S. Jansen, I. Giesser and J. Winckler, *Post-ischemic activation of caspase-3 in the rat hippocampus: evidence of an axonal and dendritic localisation*, **Neurochemistry International**, 43:3 (2003) 211-223.
- [71] Q. Gao, Y. Gao, *Hyperglycemic condition disturbs the proliferation and cell death of neural progenitors in mouse embryonic spinal cord*, **International Journal of Developmental Neuroscience**, 25:6 (2007) 349-357.
- [72] K.K. Wang, *Calpain and Caspase: can you tell the difference?*, **Trends Neurosci.**, 23:1 (2000) 20-26.
- [73] S.K. Ray, D.C. Matzelle, G.G. Wilford, E.L. Hogan and N.L. Banik, *E-64-d prevents both calpain upregulation and apoptosis in the lesion and penumbra following spinal cord injury in rats*, **Brain Research**, 867:1-2 (2000) 80-89.
- [74] T. James, D. Matzelle, R. Bartus, E.L. Hogan, N.L. Banik, T. James, D. Matzelle, R. Bartus, E.L. Hogan, N.L. Banik, *New inhibitors of calpain prevent degradation of cytoskeletal and myelin proteins in spinal cord in vitro*, **Journal of Neuroscience Research**, 51:2 (1998) 218-222.
- [75] S. Samantaray, E. A. Sribnick, A. Das, V. H. Knaryan, D. D. Matzelle, A.V. Yallapragada, R.J. Reiter, S.K. Ray and N.L. Banik, *Melatonin attenuates calpain upregulation, axonal damage and neuronal death in spinal cord injury in rats*, **Journal of Pineal Research**, 44:4 (2008) 348-357.
- [76] J.M. Wingrave, K.E. Schaecher, E.A. Sribnick, G.G. Wilford, S.K. Ray, D.J. Hazen-Martin, E.L. Hogan, N.L. Banik, *Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats*, **J. of Neuroscience Res.**, 73:1 (2003) 95–104.
- [77] B.R. Pike, J. Flint, J.R Dave, X.-C M. Lu, K.K.K Wang, F.C Tortella and R.L. Hayes, *Accumulation of Calpain and Caspase-3 Proteolytic Fragments of Brain-Derived  $\alpha$ II-Spectrin in Cerebral Spinal Fluid After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats*, **J. of Cereb. Blood Flow & Metab.**, 24:1 (2004) 98–106.
- [78] T. Genovese, E.Mazzon, C.Crisafulli, E.Esposito, R. Di Paola, C. Muia, P. Di Bella, P. Bramanti, S. Cuzzocrea, *Effects of combination of melatonin and dexamethasone on secondary injury in an experimental mice model of spinal cord trauma*, **J. Pineal Res.**, 43:1(2007) 140-153.
- [79] S-H. Kim and S-M. Lee, *Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver*, **Journal of Pineal Research**, 44:2 (2008) 165-171.
- [80] O.S. Palaoglu, E. Beskonaklı, *Pineal Gland and Aging*, **Turkish Journal of Geriatrics**, 1:1 (1998) 13-18.
- [81] S-II. Choi, S-S. Joo and Y-M. Yoo, *Melatonin prevents nitric oxide-induced apoptosis by increasing the interaction between 14-3-3 $\beta$  and p-Bad in SK-N-MC cells*, **J. of Pineal Research**, 44:1 (2008) 95-100.



- [82] C. Rodriguez, J.C. Mayo, R.M. Sainz, I. Antolín, F. Herrera, V. Martín and R.J. Reiter, *Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin*, **Journal of Pineal Research**, 36:1 (2004) 1-9.
- [83] J. Leon, D. Acuña-Castroviejo, R.M. Sainz, J.C. Mayo, D. Tan, R.J. Reiter, *Melatonin and mitochondrial function*, **Life Sciences**, 75:1 (2004) 765-790.
- [84] O.R. Kunduzova, G. Escourrou, M.H. Seguelas, P. Delagrange, F. De La Farge, C. Cambon, A. Parini, *Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion*. **FASEB J.**, 17:8 (2003) 872-874.
- [85] Ş. Gül, S. Çelik, M. Kalaycı, M. Taşyürekli, N. Çokar, T. Bilge, *Dose-dependent neuroprotective effects of melatonin on experimental spinal cord injury in rats*, **Surgical Neurology**, 64:4 (2005) 355-361.
- [86] E. Olakowska, W. Marcol, K. Kotulska, J. Lewin-Kowalik, *The role of melatonin in the neurodegenerative diseases*, **Bratisl. Lek. Listy.**, 106:4-5 (2005) 171-174.
- [87] Q. Duan, Z. Wang, T. Lu, J. Chen and X. Wang, *Comparison of 6-hydroxymelatonin or melatonin in protecting neurons against ischemia/reperfusion-mediated injury*, **J. of Pineal Res.**, 41:4 (2006) 351-357.
- [88] P. Dobsak, J. Siegelova, J.C. Eicher, J. Jancik, H. Svacinova, J. Vasku, S. Kuchtickova, M. Horky, J.E. Wolf, *Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart*, **Pathophysiology**, 9:3 (2003) 179-187.
- [89] T. Genovese, E. Mazzon, C. Muià, P. Bramanti, A. De Sarro and S. Cuzzocrea, *Attenuation in the evolution of experimental spinal cord trauma by treatment with melatonin*, **J. of Pineal Res.**, 38:3 (2005) 198-208.
- [90] J. Liu, T. Tang, H. Yang, D. Xiao, *Antioxidation of melatonin against spinal cord injury in rats*, **Chinese Medical Journal**, 117:4 (2004) 571-575.
- [91] Y.X. Han, S.H. Zhang, X.M. Wang, J. Wu, *Inhibition of mitochondria responsible for the anti-apoptotic effects of melatonin during ischemia-reperfusion*, **J. of Zhejiang Univ. Science B**, 7:2 (2006) 142-147.
- [92] Ü. Özgen, Apoptozide Laboratuvar İnceleme Yöntemleri, **ders notu**
- [93] H. Kültürsay, M. Kayıkçıoğlu, *Apoptozis ve Kardiyovasküler Hastalıklar-Derleme*, **Anadolu Kardiyoloji Dergisi**, 2:4 (2002) 1-11.
- [94] M.İ. Harma, M. Harma, N. Dilsiz, *Western Blot Determination of Caspase-3 Apoptotic Activity in Complete Hydatidiform Mole and Persistent Trophoblastic Disease*, **J. Turkish German Gynecol Assoc.**, 6:3 (2005) 226-228.
- [95] M. Kaya, “Bir kalpain inhibitörü olan AK 295 in nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi” PhD Thesis İstanbul University Turkey, 2005.
- [96] J.A. Zivin, U. De Girolami, *Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model*, **Stroke**, 11 (1980) 200-202.
- [97] A. Shapiro, E. Vinuela, and J.V. Maizel, Jr. *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 28 (1967) 815-820.
- [98] E. Taşkın, B. Kuşçu, T. Altuğ, M. Öztürk, H. Doğruman, F.D. Önar, Fırat., M. Gürtekin, Ehrlich Ascites Tümörü ile BALB-C farelerde oluşturulmuş solid tümör modelinde Curcumin ‘nin apoptoz üzerine etkisi, 8. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi. Adana, Türkiye, Ekim 14-17, (2003), pp.69

- [99] S.K. Chiou, M.K. Jones, A.S. Tarnawski, *Survivin - an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond*. **Med. Sci. Monit.**, 9:4 (2003) 43-47.
- [100] N.J. Yoo, H.S. Kim, S.Y. Kim, W.S. Park, S.H. Kim, J.Y. Lee, S.H. Lee, *Stomach cancer highly expresses both initiator and effector caspases; an immunohistochemical study*, **APMIS**, 110:11 (2002) 825-832.
- [101] C. Stadelmann, T.L. Deckwerth, A. Srinivasan, C. Bancher, W. Brück, K. Jellinger and H. Lassmann, *Activation of Caspase-3 in Single Neurons and Autophagic Granules of Granulovacuolar Degeneration in Alzheimer's Disease*, **American Journal of Pathology**, 155:5 (1999) 1459-1466.
- [102] P. Staib, J. Tiehen, T. Strunk, and T. Schinköthe, *Determination of caspase-3 activation fails to predict chemosensitivity in primary acute myeloid leukemia blasts*, **BMC Cancer**, 5:60 (2005) 1-8.
- [103] Z. Chen, D. Kontonotas, D. Friedmann, A. Pitts-Kiefer, J.R. Frederick, R. Siman and R.W. Neumar, *Developmental status of neurons selectively vulnerable to rapidly triggered post-ischemic caspase activation*, **Neuroscience Letters**, 376:3 (2005) 166-170.
- [104] A. Takagi, T. Yamada, K. Hayashi, Y. Nakade, T. Kojima, J. Takamatsu, E. Shibata, G. Ichihara, Y. Takeuchi and T. Murate, *Involvement of Caspase 3 Mediated Apoptosis in Hematopoietic Cytotoxicity of Metabolites of Ethylene Glycol Monomethyl Ether*, **Industrial Health**, 40:4 (2002) 371-374.
- [105] S. Dasdag, M.Z Akdag, E. Ulukaya, A.K. Uzunlar, and D. Yegin, *Mobile Phone Exposure Does Not Induce Apoptosis on Spermatogenesis in Rats*, **Archives of Medical Research**, 39:1 (2008) 40-44.
- [106] J. Luo and R. Shi, *Polyethylene glycol inhibits apoptotic cell death following traumatic spinal cord injury*, **Brain Research**, 1155:1 (2007) 10-16.
- [107] L. Fan, K.Wang, B. Cheng, C. Wang, and X. Dang, *Anti-apoptotic and neuroprotective effects of Tetramethylpyrazine following spinal cord ischemia in rabbits*, **BMC Neurosci.**, 7:48 (2006) 1-9.
- [108] A. Kavaklı, A. Acet, H. Parlakpınar, N. Akpolat, E. Şahna, *Ratlarda Beyin İskemi-Reperfüzyonu Sonucu Oluşan Morfolojik Değişikliklere Melatonin ve Pinealektomi'nin Etkisi*, **F.Ü. Sağ. Bil. Derg.**, 21:2 (2007) 63-66.
- [109] S.F. Erten, A. Kocak, I. Ozdemir, S. Aydemir, A. Colak, B.S. Reeder, *Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia*, **Spinal Cord**, 41:10 (2003) 533-538.
- [110] E. Kalkan, O. Çiçek, A. Ünlü, S. Abuşoğlu, S.S. Kalkan, M.C. Avunduk and A. Baysefer, *The effects of prophylactic zinc and melatonin application on experimental spinal cord ischemia-reperfusion injury in rabbits: experimental study*, 45:1 (2007) 722-730.

## ÖZGEÇMİŞ:

### KİŞİSEL BİLGİLER

**İsim ve Soyadı** :Demet DOĞAN  
**Doğum Tarihi** :16.02.1983  
**Doğum Yeri** :Yeşilyurt/MALATYA  
**Mesleki Durumu** :Biyolog  
**Medeni Hali** :Evli

### EĞİTİM

**İlkokul** :Atatürk İlkokulu Malatya/Yeşilyurt 1989-1994  
**Ortaokul** :Malatya Yeşilyurt Lisesi 1994-1997  
**Lise** :Malatya Yeşilyurt Lisesini 1. olarak bitirdi. 1997-2000  
**Lisans** :İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü 3. olarak bitirdi. 2001-2005.  
**Yüksek Lisans** :İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı 2005-2008.

### BİLİMSEL FAALİYETLER

- 1- Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, 15-16 Haziran 2006, MALATYA
- 2- XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 26-30 Haziran 2006, Kuşadası/AYDIN. Dinleyici olarak.
- 3- Biyoloji Eğitimde Evrim Sempozyumu, 3-4 Mayıs 2007, MALATYA. Dinleyici
- 4- Biyokimya Anabilim Dalı Bahar Toplantısı, 18-19 Mayıs 2007, MALATYA. Dinleyici
- 5- VII. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, 10-13 Eylül 2007, MALATYA. Dinleyici
- 6- XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, 23-27 Haziran 2008, TRABZON. Bildiri

### Verilen Seminer:

**Seminer Konusu** :APOPTOZİSTE KASPAZLARIN ROLÜ  
**Seminer Tarihi** :25 Ocak 2007  
**Seminer Yeri** :Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Seminer Salonu