

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**BAKTERİYEL TOKSİNLERİN
KARDİYAK MİYOSİTLER ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Vet.Hek.Sultan YOLBAKAN

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Turgut İMİR

ANKARA
Nisan 2010

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

**BAKTERİYEL TOKSİNLERİN
KARDİYAK MİYOSİTLER ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİSİ**

DOKTORA TEZİ

Vet.Hek.Sultan YOLBAKAN

Tez Danışmanı
Prof.Dr.Turgut İMİR

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 01/2009-42 proje numarası ile desteklenmiştir.

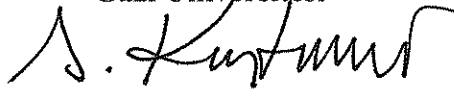
ANKARA
Nisan 2010

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

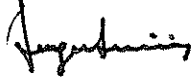
Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 08/04/2010

Jüri Başkanı
Prof.Dr. Semra KUŞTİMUR
Gazi Üniversitesi



Prof.Dr.Turgut İMİR
Gazi Üniversitesi

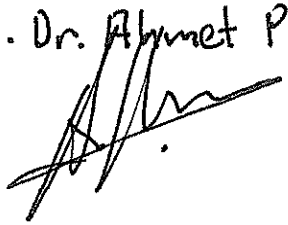


Prof.Dr.Nedim SULTAN
Gazi Üniversitesi

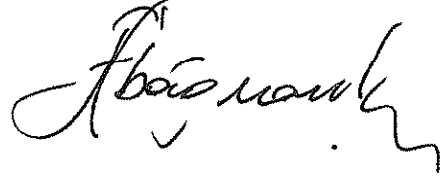


Prof.Dr. Sibel ERGÜVEN y.
Hacettepe Üniversitesi

Doç. Dr. Ahmet Pınar



Doç.Dr. E.Ümit BAĞRIAÇIK
Gazi Üniversitesi



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kabul ve Onay	I
İçindekiler	II
Grafikler Dizini	V
Resimler Dizini	VII
Şekiller Dizini	VIII
Semboller ve Kısaltmalar	IX
ÖNSÖZ	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Hücre Ölümü	2
2.1.1 Apoptozis	3
2.2 Oksidatif Stres ve Apoptozis	24
2.3 Apoptozis Belirleme Yöntemleri	27
2.4 Bakteriyel Toksinlerin Apoptotik Etkisi	32
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1 Kimyasal Bileşikler, Besiyerleri, Kitler	39
3.2 Aletler	41
3.3 Bakteriyel Toksinler	42
3.4 Hücre Kültürü Çalışması	43

3.5 Sitotoksitenin Belirlenmesi	43
MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl- 2H-tetrazoliumbromide) Yöntemi	
3.6 Apoptozis Değeri (%)	44
Flow Sitometri Yöntemi	
3.7 Apoptotik Etki Oluşum Yolu	45
3.7.1 ROT (Reaktif Oksijen Türleri) Salınımının Belirlenmesi	45
3.7.2 Gen Aktivasyonunun Belirlenmesi	45
3.8 Nükleer Morfoloji	46
3.8.1 DNA Fragmentasyonunun Belirlenmesi	46
3.9 İstatistiksel Analiz	47
4. BULGULAR	48
4.1 Hücre Canlılığı (%)	48
4.1.1 Kolera Toksininin H9c2 Hücre Canlılığı (%) Üzerine Etkisi	48
4.1.2 Difteri Toksininin H9c2 Hücre Canlılığı (%) Üzerine Etkisi	49
4.1.3 Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB) 'nin H9c2 Hücre Canlılığı (%) Üzerine Etkisi	50
4.1.4 LPS (<i>E.coli</i> O55:B5)'in H9c2 Hücre Canlılığı (%) Üzerine Etkisi	51
4.2 Apoptozis Değeri (%)	52
4.3 ROT (Reaktif Oksijen Türleri)'nin Salınımının Belirlenmesi	53

4.4 Apoptozis Gen Aktivasyonunun Belirlenmesi	54
4.4.1 RNA İzolasyonu	54
4.4.2 Kaspaz Aktivitesinin Belirlenmesi	55
4.4.3 Apoptozis’de Önemi Olan Diğer Gen Aktivasyonlarının Belirlenmesi	59
4.5 DNA Fragmentasyonu	64
4.6 Nükleer Morfoloji	65
5.TARTIŞMA	69
6.SONUÇ	72
7.ÖZET	74
8.SUMMARY	76
9.KAYNAKLAR	78
10.TEŞEKKÜR	84
11.ÖZGEÇMİŞ	85

GRAFİKLER DİZİNİ**Sayfa No**

Grafik1: Kolera toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri	48
Grafik2: Difteri toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri	49
Grafik3: Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB)'nin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri	50
Grafik4: <i>E.coli</i> O55:B5 LPS'inin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri	51
Grafik5: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin apoptotik hücre artışı (%)	52
Grafik6: Difteri toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin ROT (Reaktif Oksijen Türleri) salınımı	53
Grafik7: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 2 mRNA seviyesinin gösterilmesi	55
Grafik8: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 8 mRNA seviyesinin gösterilmesi	56
Grafik9: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 9 mRNA seviyesinin gösterilmesi	56
Grafik10: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 3 mRNA seviyesinin gösterilmesi	57
Grafik11: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 6 mRNA seviyesinin gösterilmesi	58

Grafik12: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 7 mRNA seviyesinin gösterilmesi	58
Grafik13: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Fas mRNA seviyesinin gösterilmesi	59
Grafik14: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Tnfrsf11b mRNA seviyesinin gösterilmesi	60
Grafik15: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Apaf1 mRNA seviyesinin gösterilmesi	61
Grafik16: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin TRAF1 mRNA seviyesinin gösterilmesi	62
Grafik17: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Bax mRNA seviyesinin gösterilmesi	63
Grafik18: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin DNA fragmantasyonu / apoptozis artışı (%)'nin gösterilmesi	64

RESİMLER DİZİNİ**Sayfa No**

Resim1: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin RNA izolasyonu	54
Resim2: Difteri toksini ile inkübe edilmemiş H9c2 hücrelerinin (Kontrol Grubu) nükleer morfolojisinin gösterilmesi	65
Resim3: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin nükleer morfolojisinin gösterilmesi	66
Resim4: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin nükleer morfolojisinin gösterilmesi	67
Resim5: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin nükleer morfolojisinin gösterilmesi	68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil1: Apoptozis'in dış (ekstrinsek) yol ile gerçekleşmesi

11

Şekil2: Apoptozis'in iç (intrinsek) yol ile gerçekleşmesi

14

Şekil3: Kaspaz 8 Aktivasyonu

19

SEMBOLLER ve KISALTMALAR

AIF : Apoptosis Inducing Factor : Apoptozis'i Uyaran Faktör

ANT : Adenin Nucleotide Translocater : Adenin Nükleotid Geçirgeni

APAF : Apoptotic Protease Activating Factor : Apoptotik Proteazı Etkinleştiren Faktör

ASK : Apoptosis Signal-Stimulating Kinase : Apoptozis Sinyali Uyaran Kinaz

BH : Bcl-2 Homology : Bcl-2'ye Benzer

BIR : Baculoviral IAP Repeats : Baküloviral IAP Tekrarları

CAD : Caspase Activating Deoxyribonuclease : Kaspazın Etkinleştirdiği Deoksiribonükleaz

CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain : Kaspazı Aktive Eden Bölge

Ced : *Caenorhabditis elegans* Cell Death Gene : *Caenorhabditis elegans* Hücre Ölüm Geni

CIDE : Cell death –Inducing DFF45-like Effector : Hücre Ölümünü Başlatan DFF45 Benzeri Etken

CK : Creatine Kinase : Kreatin Kinaz

CREB : cAMP Responsing Element Binding Protein : cAMP Cevap Elemanı Bağlayan Protein

CRD : Sistein 'den Zengin Bölge

crmA : Cytokine Response Modifier A

CypD : Siklofilin D

Cyt c : Sitokrom c

Daxx : Death-domain-Associated Proteinxx : Ölüm Ucuyla İlişkili xx Proteinini

DD : Death Domain : Ölüm Ucu

DCF : 2',7'Dichloroflourescein Diacetate

DED : Death Effector Domain : Ölüm Oluşturan Bölge

DFF : DNA Fragmentation Factor : DNA'yı Parçalara ayıran Faktör

$\Delta\psi_m$: Mitochondrial Transmembrane Potential : Mitokondri Zarı Geçiş Potansiyeli

DIABLO : Direct IAP-Binding Protein With Low pl : Doğrudan IAP'a Bağlanan Düşük pl'lı Protein

DIAP : Drosophila Inhibitor of Apoptosis Protein : Drosophila Apoptosis Baskılayan Protein

DISC : Death Inducing Signalling Complex : Ölümü Başlatan Sinyalleme Yapısı

DR : Death Receptor : Ölüm Reseptörü

FADD : Fas Associated Death Domain : Fas'a Bağlı Ölüm Bölgesi

FAK : Focal Adhesion Kinase : Fokal Adezyon Kinaz

FLASH : FLICE Associated Huge Protein : FLICE ile İlişkili Büyük Protein

FLICE : Fas Associated ICE-Like Protease : Fas ile İlişkili ICE Benzeri Protein

FLIP : FLICE Inhibitory Protein : FLICE'yi Baskılayan Protein

IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein : Apoptosis'i Baskılayan Protein

ICAD : Inhibitor of CAD : CAD Baskılayıcı

ICE : Interleukin 1 β Converting Enzyme : İnterlökin 1 β Dönüştürücü Enzim

IKK : I κ B Kinase : I κ B Kinaz

JNK : c-Jun N-terminal Kinase : c-Jun N-ucu Kinazı

MAP : Mitogen Activating Protein Kinase : Mitojen'in Etkinleştirdiği Protein Kinaz

MMP : Mitochondrial Membrane Permeabilisation : Mitokondri Zarı Geçirgenliği

MORT : Mediator of Receptor – induced Toxicity : Reseptör Yoluyla Uyarılan Toksisite

MPT : Mitochondrial Permeability Transition : Mitokondriyal Geçiş Porları

MTT : 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide

µg : Mikrogram

NF-κB : Nuclear Factor Kappa B : Çekirdek Kappa B Faktörü

OH : Hidroksil Radikali

PAK-2 : p21 Activated Kinase -2 : p21 ile Etkinleşen Kinaz

PARP : Poly-(ADP-Ribose) Polymerase : Poli-ADP-Riboz Polimeraz

PI3-K : Phosphatidylinositol 3 Kinase : Fosfatidilinositol 3 kinaz

PKB : PI3-Kinaz Tarafından Aktive Edilen Akt

PKC : Protein Kinase C : Protein Kinaz C

PT : Permeability Transition : Geçirgenlik Değişmesi

PTPC : Permeability Transition Pore Complex : Geçiş Sağlayan Por Kompleksi

RAIDD : RIP Associated ICH-1 / CED-3 Homologous Protein With a Death

Domain : RIP ile ilişkili ICE-1/ CED-3 Benzeri Ölüm Ucu Olan Protein

RIP : Receptor Interacting Protein : Reseptörle Etkileşen Protein

ROS : Reactive Oxygen Species : Reaktif Oksijen Türleri

ROI : Reactive Oxygen Intermediates

Smac : Second mitochondria –derived activator of caspases : İkinci Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivatörü

SODD : Silencer of Death Domain : Ölüm Bölgesi Susturucusu

tBid : Truncated Bid : Kesik Bid

TNF : Tumour Necrosis Factor : Tümör Nekroz Faktör

TNFR : Tumour Necrosis Factor Receptor : Tümör Nekroz Faktör Reseptörü

TRADD : TNFR Associated Death Domain : TNFR'e bağlı Ölüm Bölgesi

TRAF : TNF Receptor-Associated Factor : TNF Reseptörü ile İlişkili Faktör

TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand : TNF ile İlişkili Apoptozis'i

Uyaran Bağ

VDAC : Voltage Dependent Anion Channel : Voltaja Bağımlı Anyon Kanalı

XIAP : X Linked Inhibitor of Apoptosis Protein : X'e bağlı Apoptozis'i Baskılayan Protein

ÖNSÖZ

Bakteriyel toksinlerden bazılarının, kardiyomiyositler üzerine olan apoptotik etkisi çalışılmıştır.

Rat embriyonik kalp kası hücreleri kullanılarak yapılan invitro çalışmada, ele alınan bakteriyel toksinlerin, normal fizyolojik koşullarda meydana gelen bu hücre ölüm modeli üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu etki normal koşullarda meydana gelen bu olayı indüklemeye ya da inhibe etmeye ya da hiçbir şekilde değişiklik oluşturmama şeklinde ele alınmıştır.

Bakteriyel toksinlerin sitotoksik etkisi dikkate alınarak hücre canlılığı (%) değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı (%) üzerine etkili olan toksin ve bu toksinin en etkin konsantrasyonunun kardiyak miyositler üzerine apoptotik etkisi araştırılmıştır.

Apoptozis'e özgü herhangi bir hücresel olayın belirlenmesi esas alınarak - apoptotik etki oluşum yolu dikkate alınarak - hangi yol üzerinden, hangi gen aktivasyonu ile oluştuğu üzerinde durulmuştur.

Apoptotik etki, DNA fragmentasyonu esas alınarak saptanmaya çalışılmıştır.

Apoptotik hücrenin nükleer morfolojisi ve apoptotik cisimcikler gösterilmiştir.

1.GİRİŞ

Apoptozis, programlanmış hücre ölümüdür. Aktif bir süreçtir ve ATP gerektiren olaylar zinciridir ¹ .

Bakteriyel toksinlerden bazıları apoptozis oluşumunu sağlıyorken, bazıları apoptozis oluşumunu bloke etmektedir.

Bu anlamda yapılan bilimsel çalışmalarda, bazı bakteriyel toksinlerin apoptozis oluşumunu sağladığı gösterilmiştir : Shiga like toksin^{2,3} , Stafilokokkal enterotoksin tip B (SEB)^{4,5}, Ekzotoksin A⁶ ve Kolera toksin. Bu toksinlerin tipik hücrel reaksiyonlarının kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu olduğu belirtilmiştir. Difteri toksininin nükleus aktivitesi ile apoptozisi tetiklediği bildirilmiştir^{7,8}. *Staphylococcus aureus* alfa toksini'nin DNA degradasyonu (DNA'daki bozulma) yolu ile apoptozis sağladığı bildirilmiştir⁹ .

Rho GTPase'ların inhibitörleri belirli hücre tiplerinde apoptozisin başlangıcını uyarmaktadır¹⁰. Bu nedenle Ekzoenzim C3, *Cl.difficile* toksin A ve toksin B'sinin bu mekanizma ile apoptozisi sağladığı düşünülmektedir. Buna karşıt olarak Rho aktivatörleri *Pasteurella multocida* toksin'i bu yolla hücreleri apoptozise karşı korumaktadır¹¹ .

Shiga like toksini'nin ayrıca apoptozis oluşumunu engellediği de bildirilmiştir ¹² .

LPS (Lipopolysaccharide) internükleozomal DNA fragmentasyonu ve kaspaz aktivitesini içine alan değişikliklerle apoptozis oluşumunu sağlamaktadır ^{13,14} .

Bu çalışmada bakteriyel toksinlerden kolera toksin, difteri toksini, Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB) ve LPS (*E.coli* O55:B5)'in rat embriyonik kalp kası hücreleri üzerine apoptotik etkisi araştırılmıştır.

Amacımız, üzerinde çalışılan bakteriyel toksinlerin esas hedef bölgesi olmayan hücrelerde, kalp kası hücresinde, apoptotik etkisinin Apoptozis'e özgü herhangi bir hücrel olayın belirlenmesi esas alınarak, hangi gen aktivasyonu ile hangi yol üzerinden oluştuğunun belirlenmesidir.

Böylece rat embriyonik kalp kası hücresi üzerinde apoptotik etkisi olduğu belirlenen toksin ya da toksinlerin bu apoptotik etkisinin, apoptozisi indüklemeye ya

da inhibe etme, belirlenen gen aktivasyonu ve belirlenen yol üzerinden kontrol altına alınması mümkün olabilecektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Hücre Ölümü

Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin, barsak hücreleri 3-5 günlük bir yaşam süresinden sonra ölürlerken, deri hücreleri 20-25 günlük bir süreden sonra ölmektedir. Fakat, miyokard hücreleri veya nöronlar ömür boyunca yaşamaktadır ^{15,16} .

Tüm canlıların en küçük işlevsel birimi olan hücrede ölüm, patolojik ya da fizyolojik süreçler sonunda gerçekleşmektedir.

Başlıca iki ölüm şekli vardır: Nekrozis ve Apoptozis

Nekrozis, hücre şişmesi ve hücre parçalanması ile karakterize, ani ağır iskemik, mekanik travma gibi büyük çevresel değişikliklerin neden olduğu patolojik ve pasif bir süreçtir. Bu tür hücre ölümünde hücre içi denetim mekanizmalarının etkisi yoktur ¹⁵ .

Diğer bir hücre ölüm şekli olan fizyolojik ölüm yolu ise yaşlı, hasarlı ya da anormal hücreleri ortadan kaldırarak hücrelerarası dengeyi ve hücrelerin canlılıklarını sürdürmelerini sağlamaktadır ¹⁶ .

Fizyolojik hücre ölümü 1920'lerden beri bilinmektedir. Nekrozdan farklı olarak hücre büzüşmesi görülmesi nedeni ile "büzüşme nekrozu" olarak adlandırılmıştır. Genetik olarak belirlenen aktif bir süreçtir. Günümüzde en az iki şekli olduğu belirtilmektedir ¹⁷:

1. Apoptotik olmayan programlanmış hücre ölümü
2. Apoptotik programlanmış hücre ölümü

1. Apoptotik olmayan programlanmış hücre ölümü :

Apoptozis'de gözlenen şekilsel özellikler izlenmeden programlanmış bir olay sonucu hücre ölümünün gerçekleşmesidir. Canlı organizmanın oluşum (embriyogenezis) ve başkalaşma (metamorfoz) sürecinde bir çok organın ortadan kalkması apoptotik olmayan programlanmış hücre ölümü için örnek olarak verilebilmektedir ¹⁷ .

Apoptotik programlanmış hücre ölümü : Apoptozis

Apoptotik programlanmış hücre ölüm şeklinde kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, apoptotik cisimlerin oluşması ve bu apoptotik cisimciklerin komşu parankimal hücreler ya da makrofajlarca fagosite edilmeleri ve hücrenin çevre hücrelerden ayrılması ile karakterize şekilsel özellikler gözlenmektedir. Yenidoğanda Timus'un gerilemesi apoptotik programlanmış hücre ölümü için örnek olarak verilebilmektedir ¹⁷ .

2.1.1 Apoptozis

Apoptozis, eski yunanca apo (ayrı) ve ptozis (düşmek) kelimelerinin birleşmesi ile oluşan ve Homeros tarafından sonbaharda yaprak dökümünü tanımlamak için kullanılan bir sözcüktür ¹ .

Apoptozis ya da programlı hücre ölümü, normal ve malign süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu tip hücre ölümü DNA'nın bir ya da daha fazla nükleozom parçalarına ayrılması, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması gibi özel şekilsel değişikliklerle karakterizedir.

İlk defa, İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından fizyolojik hücre ölümünün, büyük oranda önceden kestirilebilir (programlanmış), kesin şekilsel (morfolojik) nitelikleri olan bir olay olduğu 1970'lerde ileri sürülmüştür ¹ .

Normal şartlar altında apoptozis, vücudun her bir parçasının içerik ve büyüklüğünün fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde kalmasını sağlamaktadır.

Hücre çoğalması ve ölümü arasında bir denge bulunması gerekmektedir. Bu denge kaybolduğunda çoğalandan çok hücre öldüğünde ya da farklılaştığında dejeneratif hastalıklar, ölen ya da farklılaşandan daha fazla hücre çoğalması olduğunda ise kanser ve otoimmün hastalıklar görülmektedir.

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadır. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halinde süregelmektedir.

Hücrelerde Meydana Gelen Şekilsel Değişiklikler

Apoptozis, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak yangısal değişiklikler yoktur.

Kromatin çekirdek zarının altında yoğunlaşır, değişik boyutta yarımay ya da oval şekillerde iyi sınırlı yoğun kitleler haline gelir. Çekirdekçi kromatini dağılır ve çekirdek merkezinde osmiofilik granül kümeleri oluşturur, kromatinin iç yüzeyinde fibriler protein yoğun granüler kitle oluşturur ¹⁸.

Hücre çekirdeğinde meydana gelen bu değişikliklerle aynı anda apoptotik hücre komşu hücrelerden ayrılır ya da bağlantı noktaları ortadan kalkar. Mikrovilluslar gibi özel yüzey yapıları kaybolur ve düzgün sınırlı hale gelir.

Hücre hacmi azalır, hücre yoğunluğu artar. Sitoplazmik organeller yoğunlaşır, düz endoplazmik retikulum genişler. Yoğunlaşmış sitoplazmada vakuoller oluşur. Genişleyen sisternalar hücre zarı ile birleşerek hücre yüzeyine doğru tomurcuklanmalar oluşturur. Sitoplazmik flamanlar yan yana ve hücre yüzeyine paralel tabakalar şeklinde toplanırlar ^{1,18}.

Bu dönemle iç içe geçen ya da hemen ardından gelen dönemde hücre yüzeyinde tomurcuklanma ve çekirdek sınırında düzensizlik vardır. Bunların ayrılması ile çekirdek ve stoplazma değişik boyutlarda "apoptotik cisimcikler" oluşturur. Bu cisimcikler epitelyal yüzeyden dökülebilir ya da çoğunlukla komşu normal parenkimal hücreler ya da makrofajlarca fagosit edilirler ^{1,18}.

Apoptozisde izlenen şekilsel değişikliklerde son aşama "in vitro otoliz" dönemi olmaktadır. Bu dönemde kalıntı çekirdek ve sitoplazmik yapılar bu yapıları fagosit eden hücrenin fagozomu içinde lizozomal enzimlerle parçalanır.

Hücre parçalanması sırasında hücre içi elemanlar hücrelerarası aralığa dağılmadığı için ve proteolitik enzimler ya da toksik oksijen salınımı olmadığı için yangısal yanıt oluşmaz ve böylece komşu hücrelerin hasarlanması önlenir ^{1,18}.

Hücrelerde Meydana Gelen Biyokimyasal Değişiklikler

Apoptozise yönelen hücrede şekilsel değişiklikler gelişmeden ve DNA parçalanması görülmeden önce β -tubulin haberci RNA, daha sonra β -tubulin miktarı artar ¹⁹.

Hücre çekirdeğinde, kromatin değişikliklerinin izlenmesinden kısa süre önce hücresel aktivitelerde ve sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca^{2+} 'un sitoplazma içi miktarında hafif artma görülür ^{17,20,21}. Ca^{2+} miktarındaki bu artış kalsiyuma bağlı endonükleaz ve transglutaminaz gibi enzimleri aktive ederek bazı yapısal değişikliklere yol açar.

Çoğu apoptotik hücre daha önce kendilerinde bulunmayan transglutaminaz aktivitesi gösterir. Transglutaminaz, apoptotik hücrelerin sitoplazmik proteinleri arasında ϵ -(γ -glutamil) lizin bağları oluşumuna yol açar. Bu çapraz bağlı glutamin proteinler sitoplazma zarı altında keratinize hücredekine benzer SDS dirençli kabuk oluştururlar.

Apoptozisde hücre çekirdeğindeki değişikliklere endojen Ca^{2+} - Mg^{2+} bağımlı nükleazların aktivasyonu neden olur ^{20,22}. Bu nükleazlar bazı hücrelerde sürekli bulunurken bazı hücrelerde apoptozisden önce görülürler. Ca^{2+} - Mg^{2+} bağımlı nükleazlar nükleozomlar arasında kromatini bölerler ve apoptotik hücre DNA'sı hepsinin uzunluğu 180-200 baz çifti ve katları olan parçalara ayrılır. Bu parçalar Agaroz Jel Elektroforez'de apoptozise özgü merdiven görünümünü verir ¹⁷.

Kalpain gibi bazı Ca^{2+} 'a bağlı proteazlar da hücre yapısının bozulmasında etkili olabilmektedir ^{19,21,22}.

Apoptotik hücre yüzeyinde beliren yeni moleküler yapıların fagositik hücreler tarafından tanınması sonucu fagositoz görülmektedir. N-asetil-glukozamin ve dimeri N,N'-diasetilşitabroz'un bu tanınmada rolü olduğu belirtilmektedir. N-asetil-glukozamin ve dimeri N,N'-diasetilşitabroz normalde hücre zarında korunmuş olarak bulunan şeker molekülleridir. Apoptozisde görülen zar değişiklikleri ile açığa çıkmaktadırlar ve makrofajların yüzeyindeki reseptörlerce tanınırlar.

Apoptozis sırasında hücre zarındaki fosfolipid dağılımı da değişir. Hücre zarı iç yüzeyinde bulunan negatif yüklü fosfatidilserin hücre zarı dış yüzeyine çıkar.

Hücre zarındaki fosfolipid dağılımının değişmesi sonucu kollektin (en önemlisi C1q) adı verilen çeşitli çözünür proteinler apoptotik hücre zarına bağlanır. Mitokondri yerleşimli kardiyolipin'in de apoptozis sırasında hücre zarında bulunduğu tesbit edilmiştir.

Makrofajların vitronektin reseptörleri trombospondin köprüleri yoluyla apoptotik hücrelere bağlanmadan sorumludur. Vitronektin reseptörüne dayanan fagositoz, fagositozu yapan makrofajdan inflamatuvar maddelerin salınmamasını sağlamaktadır.

Makrofaj Fc ve C3 reseptörleri yoluyla olan fagositoz ise nötrofil kemotaktik faktörlerin salınımına ve bölgeye nötrofil toplanmasına sebep olur^{19,23,24}.

Apoptozis'in Meydana Gelmesi

Apoptozis'in genetik düzenlenmesi hakkındaki bilgiler *Caenorhabditis elegans* ile yapılan incelemelere dayanmaktadır²⁵. 1986 'da Robert Horwitz *C.elegans'ta* normal embriyogenez ve hücre ölümü için en az 3 genin gerekli olduğunu göstermiştir: Ced-3, Ced-4 ve Ced-9 (Ced: *C.elegans* cell death gene).

Dr.Horwitz *C.elegans'ta* bu genler olmadan apoptozis görülmediğini ve gelişme olmadığını gözlemlemiştir. Bu gözlemi ile 2002'de Nobel Ödülü kazanmıştır.

Apoptozis biyolojisinde 2 evre görülmektedir :

1. Programlı ölüm kararının verilmesi (uyarı, uyarının hücre tarafından tanınması, ölüm kararının verilmesi ve ölüm)
2. Programlı olarak ölen hücrenin ortadan kaldırılması

Apoptozis 'in aktivasyonu; 1.uyarma-indüksiyon

2.serbestleşme-release

3.iletme-transdüksiyon olarak tanımlanmıştır²⁶.

1. Uyarma : Uyarı alındıktan sonra sessiz genlerin çalışması görülmektedir. Protein ürünleri, hücre için toksik olan daha önce sessiz duran genlerin transkripsiyonuna bağlı olarak apoptozis görülmektedir. Sonuçta hücre içi DNA

parçalanması görülmektedir. Glikokortikoidlerle karşılaşan timositlerde apoptozis aktivasyon modeli uyarma tipindedir.

2. Serbestleşme : Gen yapımının baskılanması ile apoptozis görülmektedir. Hücrede bazı erken yollar ve son ana yolu içeren bir ölüm programı aktif durumdadır fakat baskılayıcılar tarafından kontrol altında tutulmaktadır. Eğer baskılayıcı ölüm programının elemanlarından daha kısa ömürlü ise makromoleküler sentezin durması baskılayıcının hızla azalmasına ölüm programının serbestleşmesine ve apoptozise yol açmaktadır.

3. İletme : Uyarı sonrasında gen ekspresyonunun görülmemesi ile karakterizedir. Sitotoksik T hücrelerle karşılaşan tümör hücrelerinin ölümünde görülmektedir. Katil hücrenin zarındaki sinyalleme sonucunda olduğu düşünülmektedir.

Her çeşit hücrede apoptozise yol açacak uyarıcı sinyal yoktur. Hücrede apoptozis olup olmaması apoptozis baskılayıcı moleküllerin var olup olmamasına da bağlıdır.

Sitokinler, hormonlar, toksinler, fiziksel ajanlar ve büyüme faktörlerinin azalması gibi pek çok etken, Fas ve TNFR (Tümör Nekroz Faktör Reseptörleri) 'nin uyarılması apoptozisi başlatabilmektedir. Çeşitli yollarla aktive olabilen apoptozis süreci daha sonra tek bir ana yol ile devam etmektedir.

Fizik olaylar (γ -ya da uv radyasyon), DNA alkilasyonu (Mitomisin C ile karşılaşma), topoizomeraaz II aktivitesinin değişmesi (etoposid tedavisi), reaktif oksijen türleri ya da mitoz defektleri ile oluşan DNA hasarı apoptozisi başlatan en önemli mekanizmalardır ²⁷ .

Apoptozis iki yol ile gerçekleşmektedir :

1. Dış (ekstrinsek) yol
2. İç (intrinsek) yol

1. Dış (ekstrinsek) yol : TNF ailesi hücre yüzey reseptörlerinin ligantlar yolu ile aktive edilmesi ile apoptozisin dış (ekstrinsek) yolu uyarılır. Sitokine bağlı dış apoptozis yolu hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların en iyi anlaşılmış örneğidir.

TNF ailesi reseptörleri : TNF-R1 (CD 120a)

Fas (CD95 / APO 1)

TNF-R2

DR3 (WSL-1, TRAMP)

DR4 (TRAIL-R1-TNF-related apoptosis inducing
ligand receptor, APO-2)

DR5 (TRICK, Killer, TRAIL-R2)

DR6

EDA-R (Ektodermal displazi reseptör)

CAR-1

NGF-R

TNF ailesi reseptörleri belli bir aminoasit dizilimi ve homolojiyi paylaşmaktadırlar. Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Bu gruptaki proteinlerin sisteinden zengin ekstrasellüler (CRD), transmembranöz ve intrasellüler olmak üzere üç kısmı vardır. Ölüm domaini (DD) içeren intrasellüler kısım apoptozis sinyalini vermekte önemlidir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunmaktadır.

Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, akciğerlerde, hatta kalp kasında bulunmaktadır. İlgili ligandı FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. Sitotoksik T lenfositlerinde ve "natural killer" hücrelerde bulunmaktadır.

TNF α , TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand: TNF ile ilişkili apoptozisi uyaran bağ) ve Fas ligantları bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü TNF ailesi reseptörleri ile birleşerek ölüme neden olmaktadır (dış yol).

TNF ailesi reseptörlerinde kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesi (DD : Death Domain-ölüm ucu) bulunmaktadır. Bu bölgeler apoptozisin başlaması için gerekli olan sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlandığı yerlerdir.

Apoptozis'i uyaran ligantların TNF ailesi hücre yüzey reseptörleri ile bağlanması sonucu 3 TNFR ya da Fas molekülü kompleks oluşturmak üzere bir araya gelmektedir. TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TRADD (TNFR Associated Death Domain :TNFR 'ye bağlı ölüm bölgesi) ve FADD / Mort-1 (Fas Associated Death Domain : Fas 'a bağlı ölüm bölgesi) adlı adaptör proteinlere bağlanmaktadır.

FADD direk olarak CD95 ve TRAIL reseptör DR4 ve DR5 'e indirek olarak da TRADD aracılığıyla TRAIL reseptör DR3 ve TNF-R1 'e bağlanmaktadır.

Bu adaptör proteinlerin, hem TNF ailesi reseptörlerinde bulunan ölüm bölgesine (DD : Death Domain : ölüm bölgesi) hem de proteazların ölüm oluşturan bölgesine (DED : Death Effector Domain - ölüm oluşturan bölge) bağlanan protein etkileşme bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar 'ölümü başlatan sinyalleme kompleksi' (DISC : Death Inducing Signalling Complex - ölümü başlatan sinyalleme yapısı) oluşturmaktadır. Proteazların aktivasyonu apoptotik sinyali üretmektedir.

TNFR ya da Fas mutasyonlarında sitoplazmik ölüm bölümü (DD) proteinlerinin bağlanmasının bozulması, proteazların apoptozisi başlatma yeteneklerini hasarlamaktadır. Bu durum bu moleküllerin TNFR ve Fas ilişkili apoptozisde önemli rol oynadıklarının göstergesidir ^{28,29} .

Protein ile uyarılmamış reseptörlerin DD uçları maskelenmektedir ve reseptörün kendiliğinden sinyal oluşturması önlenmektedir. Bu maskeleye 'ölüm bölgesi susturucusu (SODD : Silencer of Death Domain)' denilmektedir. Reseptörün uyarılması ile SODD ölüm ucundan ayrılmaktadır. DD , DED içeren adaptör ölüm bölgesine bağlanmaktadır ^{30,31} .

TNFR sinyalleme kompleksi en az 3 farklı etkinlik göstermektedir:

1. JNK (c-Jun N-terminal Kinase) aktivasyonu
2. NF κ B (Nuclear Factor Kappa B : Çekirdek Kappa B Faktörü) aktivasyonu
3. Apoptozisin uyarılması

TNF α , TNF-R1 ve TNF-R2 üzerinden etkisini göstermektedir. TNF-R1 'in uyarılması ile stoplazmik kısma bağlanan TRADD (TNFR Associated Death Domain : TNFR 'ye bağlı ölüm bölgesi) RIP (Receptor Interacting Protein : Reseptörle Etkileşen Protein), FADD (Fas Associated Death Domain : Fas 'a bağlı ölüm bölgesi), TRAF-2 (TNF Receptor - Associated Factor :TNF Reseptörü İle İlişkili Faktör) proteinlerin bağlanmasına aracılık etmektedir. TNF-R2 önce TRAF-2 'ye bağlanmaktadır ve TRAF-2 TRAF-1 'e bağlanmaktadır ³² .

TNFR ilişkili apoptozisin başlatılması için TRADD ve TRAF-2 gerekmektedir.

TNF 'in TNFR1 reseptörleri ile birleşmesi sonucu reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TNFR adaptör proteini ile etkileşmektedir (TRADD). TRADD daha sonra FADD ile birleşerek prokaspaz 8 'i aktiveleştirerek apoptozise neden olmaktadır.

TRADD 'ın FADD yerine RIP (receptor interacting protein) gibi başka adaptör proteinlere bağlanmasının bir transkripsiyon faktörü olan NF κ B 'yi harekete geçirdiği ve hücrenin canlı kalmasını sağladığı düşünülmektedir ³³ .

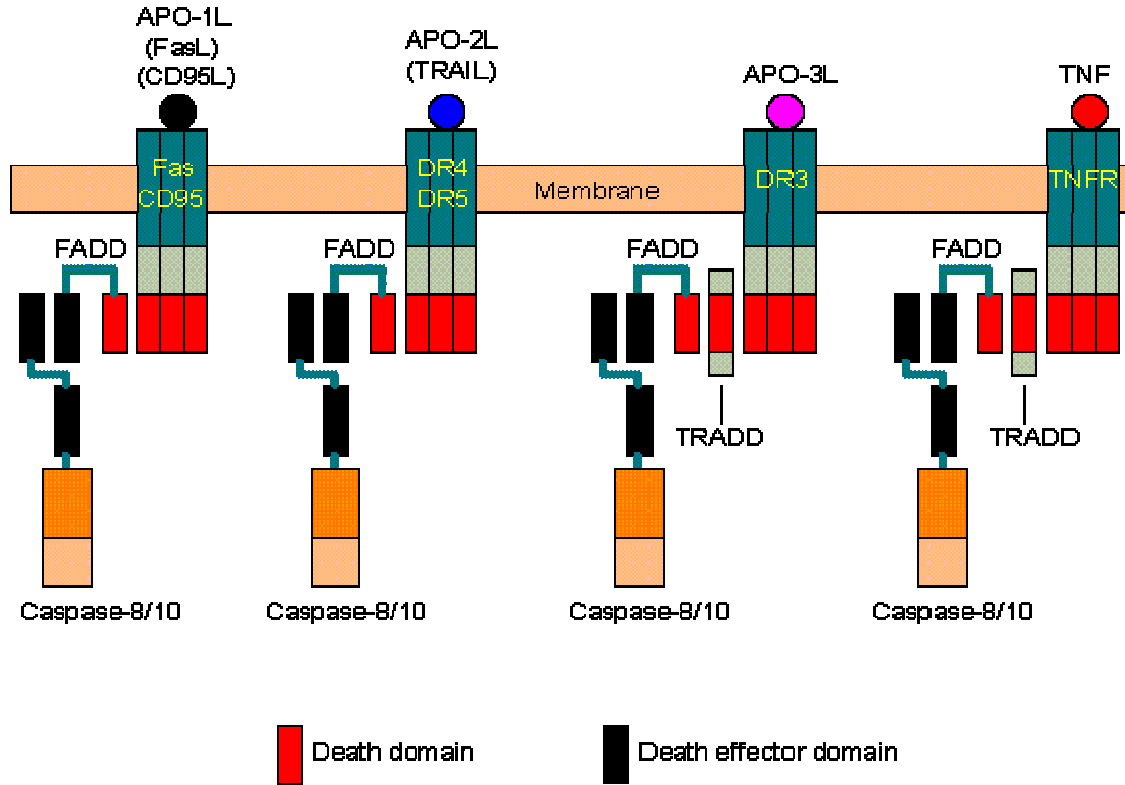
JNK ve NF κ B aktivasyonu için TRADD, TRAF-2, RIP gerekmektedir. JNK, NF κ B aktivasyonu apoptozis uyarımında yer almamaktadır. Apoptoziste koruyucu yanıt oluşturabilmektedir. NF κ B çok sayıda antiapoptotik geni aktive etmektedir, bu genlerin ürünleri apoptozisi baskılamaktadır (IAP, cFLIP, A1 (B1f1), TRAF-1, TRAF-2 antiapoptotik genlerdir).

Fas hücre yüzey resptörü de JNK yolunu kuvvetle aktive etmektedir. FADD hücre ölümünü uyarmaktadır. JNK aktivasyonu oluşturmamaktadır (Fas JNK yolunu başka sinyal molekülleri üzerinden aktive etmektedir).

Daxx (Death Domain Associated Protein xx:Ölüm ucuyla ilişkili xx proteini) denilen doğal sinyal proteini spesifik olarak Fas 'ın DD bölgesine bağlanmaktadır. Daxx 'ın büyük bir miktar yapılması Fas ile uyarılan apoptozisi arttırmaktadır ve

JNK yolunu aktive etmektedir. Daxx apoptotik proteini Bcl-2 'ye duyarlıdır. FADD yolu Bcl-2 'ye duyarlı değildir^{33,34} .

Hücre zarının ana maddesi olan sfingomyelin, sfingomyelinaz ile hidrolize olarak ceramid (keramid) oluşmaktadır. γ -ışınlama, TNF ya da Fas bağlanması ile başlatılan apoptotik sinyaller sfingomyelin yolunu keramid yapımını başlatmak üzere aktive etmektedir. Asidik sfingomyelinaz'ın apoptotik sinyallerin taşınmasında özellikle önemli olabileceği söylenmektedir³⁴ .



Şekil1:Apoptozis'in dış (ekstresek) yol ile gerçekleşmesi

2. İç (İntrensek) yol : Apoptozisin daha yaygın olan yoludur. Hücrenin kendi içinden gelen sorunlu duruma yanıt olarak oluşmaktadır. Sitotoksik ajanlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlayan sorunlu duruma yanıt olarak iç (intrensek) yol ile apoptozis oluşmaktadır.

İç yoldaki apoptotik iletimde, mitokondrinin temel rolü bulunmaktadır. Ayrıca Fas kaynaklı sinyalin hücre tipine bağlı olarak mitokondri yoluyla da kaspazı aktive etmesi mümkündür ³⁵.

Mitokondri hücresel enerji ve hücrenin yaşaması için gereklidir. Mitokondri apoptozis sırasında sitoplazmaya geçerek ölüm programının akışını aktive eden Sitokrom c, Apoptozisi Uyarıcı Faktör (AIF) gibi birkaç önemli faktör taşımaktadır. Bcl-2 bu faktörlerin sitoplazmaya salınımını önlemektedir ³⁶.

Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteinidir. Sitokrom c, mitokondriden salınıncı sitozolde apoptotik proteazı aktive edici faktör 1 (APAF-1) 'e bağlanmaktadır. Onu aktive etmektedir. Ardından ATP 'nin de katılımıyla Apoptozom adı verilen kompleks oluşmaktadır. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9 'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlamaktadır. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3 'ü aktive etmektedir. Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü ("ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease") inaktifleştirir, böylece ICAD 'ünün bağladığı kaspazla - aktifleşen deoksiribonükleaz ("CAD, caspase activated deoxyribonuclease") serbestleşmektedir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin yoğunlaşması ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olmaktadır. Mitokondri'den salınan Smac / DIABLO (second mitochondria derived activator of caspases) ve HtrA2 apoptozis inhibitör proteinin (inhibitor of apoptosis protein = IAP) kaspaz 9 üzerine olan etkisini bozmaktadır ve apoptozise neden olmaktadır.

AIF - Apoptozisi Uyarıcı Faktör ; canlı hücrede mitokondri zarları arasında yerleşmiş, bakteriyel ferredoksin ya da NADH oksidoredüktazlarına benzerlik gösteren ve çekirdek tarafından kodlanan proteaz özelliğinde olan 57 kDa'lık bir flavoproteindir. AIF, sitoplazmik faktörler olmadığında apoptotik çekirdek değişikliklerini başlatmaktadır ve kaspazı aktive etmektedir.

Sitokrom c ; mitokondrial elektron aktarım sisteminin önemli bir parçasıdır. Normalde mitokondrinin iç ve dış zarı arasındaki bölgede yerleşmiştir. Salınımı Bcl-2 proteini tarafından düzenlenmektedir. Kaspaz aktivasyonunda gerekli bir kofaktördür. Sitokrom c 'nin ATP ve sitoplazmik faktör APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor : Apoptotik proteazı etkinleştiren faktör ; Ced-4 geninin memelideki eş değeri) ile birlikte sitoplazmaya salınımı Kaspaz 9 'un kendini ve sonra Kaspaz 3 'ü aktive etmektedir.

APAF-1 'in Kaspaz 9 ve Kaspaz 3 'ün bağlanma bölgesine benzerlik gösteren N-ucu vardır. CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain: kaspazı aktive eden bölge) adını alan bu uç, kaspaz-9 'un bağlanma bölgesi ile etkileşmekte ve kaspazı aktive etmektedir. APAF-1 proteini kaspaz ile etkileşmek için bir aktivasyon basamağı gerektirmektedir. Aktivasyon için bilinen tek mekanizma Sitokrom c 'dir.

AIF ve Sitokrom c salınımı membran potansiyel kaybı ($\Delta\phi_m$) ve membran geçirgenlik değişmesi (PT) gibi işlev bozukluklarına bağlı olmaktadır.

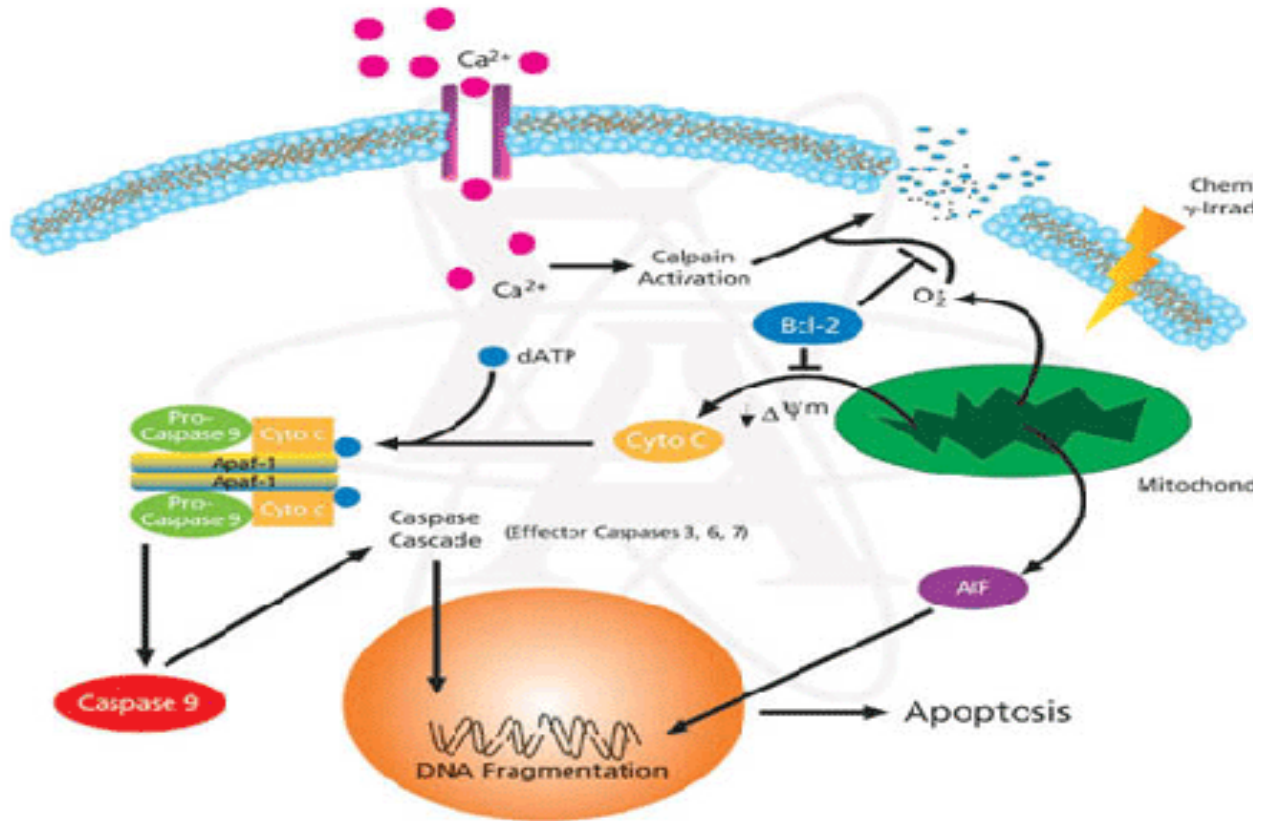
Sitokrom c 'nin salınmasında ileri sürülen 2 teori vardır :

1. Apoptozis sırasında sıvı ve eriyikler matrikse girerek mitokondrinin şişmesine neden olmaktadır. İç zar kristaller nedeni ile daha büyük bir yüzeye sahip olduğu için matriksin şişmesi ile iç zarın genişlemesi dış zarı parçalamaktadır. Zarlar arası bölgedeki içerik sitoplazmaya geri dönüşümsüz olarak geçmektedir. İç zar sağlam olduğundan matriks içeriği sitoplazmada kalmaktadır. Buna rağmen apoptozis sırasında mitokondride fiziki hasar nadiren tanımlanmıştır. Bu durumun, sitokrom c 'nin salınımının nedeni olmasından çok sonucu olması daha mümkündür ^{37,38}.

2. Bcl-2 ailesinin Bax ve Bad gibi apoptotik üyeleri çözünmüş proteinlerin geçeceği büyüklükte kanallar oluşturabilmektedir. Ayrıca Bax ve tBid 'in fosfolipid tabakaların stabilitesini azaltması, mitokondri zarının doğrusal geriliminin azalmasına, zar arası proteinlerin sitoplazmaya geçmesine yetecek büyüklükte protein lipid kompleksleri oluşturmaya neden olabilmektedir.

Mitokondri apoptozisi kaspazlardan bağımsız olarak apoptozisi indükleyen faktör (AIF) ve endonükleaz aracılığıyla da uyarabilmektedir. Ölüm sinyali gelince AIF ve endonükleaz mitokondriden salınmaktadır. Direk nükleusa geçerek DNA 'ya bağlanmaktadır. DNA hasarı ve hücre ölümüne neden olmaktadır.

Mitokondrial yol ile kaspaz 9 aktivasyonu ve ölüm reseptörleri aracılığıyla kaspaz 8 ve 10 'un aktivasyonundan sonra ortak yol olan efektör kaspazların aktivasyonu ile (Kaspaz 3,6,7), bir DNA tamir enzimi olan poli ADP riboz polimeraz (PARP) inaktif olur ve DNA 'yı parçalayan endonükleazların aktive olmasıyla apoptozis gerçekleşmektedir.



Şekil2:Apoptozis'in iç (intrinsek) yol ile gerçekleşmesi

Apoptozis'in İndüklenmesi :

Apoptozis'in indüklenmesi şu yollardan birisiyle gerçekleşmektedir:

1. Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü -1 (TNFR-1) 'in ilgili ligantları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenmektedir.

2. Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle yaratılan ağır DNA hasarına yanıt olarak p53 'ün indüksiyonuyla da başlatılabilmektedir. İndüklenen p53 , bir pro-apoptotik bcl-2 ailesi üyesi olan Bax 'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatmaktadır.

p53 Bax 'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilmektedir.

3. Apoptozis ayrıca reaktif oksijen radikallerinin (oksidatif stres) hem mitokondri hem plazma membranı hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilmektedir.

4. Apoptozis büyüme faktörlerinin ortamdan eksilmesiyle de başlatılabilmektedir. Hücre kültür ortamında büyütülen hücreler eğer serum açlığı ("serum starvation") 'a maruz bırakılırlarsa apoptozis ile ölmektedirler.

5. Apoptozis 'i başlatan bir başka neden ise, sitotoksik T lenfositlerinden salıverilen granzim B 'lerin hedef hücrede (Örn.virüsle enfekte hücre veya kanser hücresi) kaspaz sistemini aktifleştirmesidir ³⁹.

Apoptotik Ölüm Sinyali'nin Tanınması

Apoptotik sinyallerin en büyük alıcı grubu hücre döngüsünde önemli rolleri olan moleküllerdir. Apoptozisi kontrol ettiği en iyi anlaşılmış genler c-myc, p53, Bcl-2 'dir.

c-myc proteinin yapımı diğer yaşam faktörlerinin varlığına bağlı olarak hücreyi hem çoğalmaya hem de apoptozise götürmektedir. TNF 'ün uyardığı apoptozise hücreyi daha duyarlı kılmaktadır.

p53, DNA hasarlanması olan normal hücrelerde p53 protein düzeyinde belirgin bir artış ile hücre döngüsü G1 fazında bloke olmaktadır. Büyümenin durmasından sonra DNA onarımı, hücre DNA'sının çoğaldığı S fazına geçmeden tamamlanmaktadır. Genom hasarı büyük boyutlarda ise hücre programlı hücre ölümüne gitmektedir. p53 proteini, genomu dönüştürücü etkisi olan mutasyonlardan temizlenene kadar hücrenin S fazına geçişini engellediği için 'genom gardiyanı' olarak tanımlanmaktadır. p53 proteinin etkinliği gendeki değişikliklerle, kopyalama sonrası fosforilasyon değişikliği ile, hücresel ya da viral diğer proteinlerle etkileşmesi ile etkilenebilmektedir.

Bir hücre tipinde, hücre ölümünü başlatmak için p53 sinyali gerektiren uyarılar, bir diğer hücre tipinde p53 gerektirmeyebilmektedir. Örn. iyonize radyasyon timositleri öldürmek için işlevsel p53 gerektirirken akciğer mikrodamarlarındaki endotel hücrelerinde p53 'den bağımsız olarak lipid sinyal iletim molekülü keramid ile apoptozise neden olmaktadır ⁽³⁰⁾. Hücrenin bir stres sonucu p53 'e bağlı hücre döngüsünün durması ya da p53 'e bağlı apoptozis ile mi yanıt vereceğinin ana belirleyicisi hücre tipidir.

P21 / WAF1 proteini, DNA hasarı sonucu p53 etkisiyle, hücre döngüsünü G1 / S durağında engellemektedir. Bu duraksama DNA hasar tamirinin gerçekleşmesi için zaman kazandırmaktadır.

p53 'ün ayrıca bir transkripsiyon faktörü olan Mdm2 (murine double minute 2) tarafından da ya transkripsiyonu "down" regüle edilerek ya da kendisine bağlanılarak hem aktivitesi inhibe edilmektedir hem de yıkımı hızlandırılmaktadır. Fakat, DNA 'nın hasarlanması halinde p53 'ün fosforilasyonu artmaktadır ve

buna bağılı olarak da Mdm2 'den ayrılmaktadır. Böylece yarılanma ömrü uzadığı için de aktivitesi artmaktadır.

Lenfositler DNA hasarından sonra hızla hücre ölümüne gitme eğilimindeyken epitelyal hücreler daha fazla yaşama eğiliminde olup hücre döngüsünü durdurmaktadır. Aynı hücre tipinde bile hücreesel çevre yaşam ya da ölümü dikte edebilmektedir.

IL-3 'e bağımlı lenfositlerde DNA hasarı, IL-3 varlığında hücre döngüsü durmasına neden olurken, IL-3 yokluğunda programlı hücre ölümüne neden olmaktadır.

Sitotoksik hücrelerdeki granüllerin iki önemli komponenti olan perforin ve serin proteaz - granzim B, patojenlerin reseptöre bağılı endositozisine benzer mekanizma ile hedef hücreye aktarıldığında aspartaz olan granzim B prokaspazları aktive ederek ölüm programını başlatmaktadır. Perforin'e bağılı olarak çekirdeğe de geçerek kaspaz substratı olan poli - (ADP riboz) polimeraz, DNA 'ya bağılı proteinkinaz ve nükleer mitotik aparat proteini gibi proteinleri doğrudan ve etkin şekilde parçalamaktadır.

Apoptozisde Fas sinyalinin hücre döngüsünce, olasılıkla sikline bağılı kinazlar yoluyla etkilenmesi mümkündür. p34cdc2 ilişkili bir kinaz olan PITSLRE 'nin apoptozisden önce hem Fas sinyali hem de glukokortikoidler tarafından oluşturulduğu ve bu kinazın ektopik yapımının apoptozisi başlattığı bulunmuştur.

Monositler hücre içi patojenleri ve hücre dışı kendinden olmayan hedefleri H_2O_2 ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üreterek parçalamaktadır. Sikline bağılı kinaz inhibitörü P21cip1 / waf1 'nin güçlü koruyucu etkisi ile MAPK yolunun baskılanması sonucu diğer hedefleri öldürmeye yetecek H_2O_2 ve Reaktif Oksijen düzeylerinde de monositin yaşaması sağlanmaktadır ³⁹.

Son Aşama

Farklı organizmalarda çeşitli dokulara ait hücreler önemli oranda benzer şekilsel özelliklerle apoptozise gitmektedirler. Bir türde apoptozisi düzenleyen genler diğer türlerde de benzer işlevlere sahip olmaktadır.

C.elegans nematodu 'nda tüm programlı hücre ölümlerinde gereken Ced-3 geni memelilerde 'İnterlökün 1 β dönüştürücü (converting) enzim – ICE / Kaspaz-1 ' ile benzerlik göstermektedir.

Proteazlar apoptozis süreci için önemli olmaktadır. Bu proteazları bloke eden peptidler apoptozisi durdurabilmektedir ⁴⁰. Özel hücre bölümlerinde oluşan ölüm sinyallerinin iletimi ve bazılarının aktivasyonu, bazılarının inaktivasyonu ile sonuçlanan çok sayıda hücresel proteinin parçalanması proteazların hücre ölümündeki rolleri olarak bilinmektedir.

Serin proteaz ailesi başlatma sürecinde rol alırken Sistein proteaz ailesi cellat (executioner) işlevinde bulunmaktadır ⁴¹. Anayol proteaz dizisini (KASKAD) 'Kaspazlar (Caspases)' denilen tek bir sistein proteaz ailesi oluşturmaktadır ⁴². Bu yol Bcl-2 ailesi ve IAP ailesi gibi hücre ölüm karşıtı proteinler tarafından ters yönde etkilenmektedir.

İnsan ve farede 14 kaspaz belirlenmiştir. Bunların 11 'i insanda bulunmaktadır. Kaspazlar prekürsör (inaktif) zimojen olarak üretilmektedir.

Kaspazlar yapı ve işlevlerine göre 3 grupta toplanmaktadırlar:

1. Lenfokin yapımında rol alan Kaspazlar :

- Kaspaz-1 (ICE)
- Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICER₁₁)
- Kaspaz-5 (ICER₁₁₁, TY)
- Kaspaz-11 (ICH-3)
- Kaspaz-12
- Kaspaz-13 (ERICE)
- Kaspaz-14 (MICE)

Kaspaz -1 / ICE ve Kaspaz-4 apoptozisde rol oynamaktadır.

2. Çeşitli hücrel proteinleri parçalayan ve küçük bir bağlanma bölgesi olan cellat kaspazlar : Kaspaz-3 (CPP32,Yama, Apopain)

Kaspaz-6 (Mch2)

Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)

Sınıf II ya da sonuçlandırıcı (effector) kaspazlardır.

3. Sinyal iletiminde rol alan ve cellat kaspazları aktive eden aktivasyon kaspazları : Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)

Kaspaz-8 (FLICE,MACH)

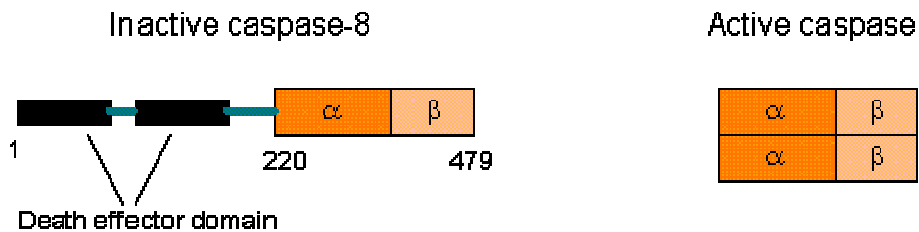
Kaspaz-9 (Mch-6, ICE-LAP-6)

Kaspaz-10 (Mch-4)

Sınıf I ya da başlatıcı (initiator) kaspazlar; bu kaspazların uzun bağlanma bölgeleri vardır. Bu bölgeler CARD (Caspase Activation and Recruitment Domain ; kaspazı aktive eden bölge) ve DED (Death Effector Domain ; ölüm oluşturan bölge) olarak adlandırılmaktadır. Bu uçlara bağlanacak özel moleküller yoluyla aktive olmaktadır.

Kaspaz-2 Kaspaz-9 'da CARD bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Kaspaz-8, Kaspaz-10 'da DED bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Kaspaz-2 'deki CARD aktivasyon için homodimerizasyon gerektirirken Kaspaz-9 'daki CARD Apaf-1 ile etkileşmektedir ⁽⁴²⁾ . Sitokrom c ve dADP ile oligomerize olan Apaf-1 'in inaktif Kaspaz-9 ile etkileşimi Kaspaz-9 'da otoaktivasyon etkisi yapmaktadır.

Kaspaz -8 'deki DED (Death Effector Domain) bölgesi, adaptör proteinlerin DED bölgeleri ile etkileşerek aktive olmaktadır ve kaspaz aktivasyon dizisini başlatmaktadır.



Şekil3:Kaspaz -8 aktivasyonu

Kinazları (MEKK-1, PKC, fokal adezyon kinaz, PAK 2) ve hücre iskeleti ile ilgili olan proteinleri (lamin, aktin, gelsolin, gas-2) içeren çok sayıda hücre proteininin apoptozis sırasında kaspazlar tarafından parçalandığı gösterilmiştir. Çekirdek laminlerinin parçalanmasının çekirdek büzülmesi ve tomurcuklanmaya, hücre iskelet proteinlerinin (fodrin ve gelsolin) parçalanmasının tüm hücre şeklinin kaybına neden olduğu, PAK2 'nin kaspaz tarafından parçalanmasının apoptotik hücrede kabarcık oluşturduğu gösterilmiştir ⁴³ .

DFF (DNA 'yı parçalara ayıran faktör), DFF40 ve DFF45 olmak üzere iki alt üniteden oluşan heterodimerik bir proteindir. Apoptozisin aktive olmasıyla DFF Kaspaz-3, Kaspaz-7 ya da Granzim –B tarafından parçalanmaktadır ve DFF45 DFF40 'tan ayrılmaktadır. DFF40 CAD (Caspase Activated Deoxyribonuclease : kaspazın etkinleştirdiği deoksiribonükleaz) olarak da adlandırılır. DFF40 'ın apoptozisteki oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olduğu saptanmıştır.

Kromatin ile ilişkili proteinler (histon H1, yüksek hareketli proteinler ve topoizomeraz II) endonükleaz aktivitesini önemli oranda uyararak DNA 'nın parçalara ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Normalde kendine özgü baskılayıcı olan DFF45 'e (ICAD ; inhibitor of CAD, CAD baskılayıcı) bağlanarak inaktif halde durmaktadır. CAD ve ICAD birer CIDE (cell death –inducing DFF45 – like effector, hücre ölümünü başlatan DFF45 benzeri etken) bölgesi içermektedir. CIDE-CIDE etkileşimi CAD / ICAD aktivitesinin düzenlenmesinde önemlidir. ICAD 'ın aşırı yapımı DNA parçalanmasını önlese de hücre ölümü ve apoptotik şekilsel değişiklikleri önlememektedir.

Mitokondrial apoptotik endonükleaz G (EndoG) mitokondri zarları arası bölgeden sitokrom c salınımına benzer şekilde salınmaktadır. Doğrudan çekirdeğe geçerek nükleozomal DNA parçalanmasını sağlamaktadır. CAD 'ın çift zincir DNA kırıkları oluşturan endonükleaz aktivitesinden farklı olarak EndoG, tek zincirli DNA'yı çift zincirli DNA 'dan daha hızlı parçalamaktadır. Çok sayıda apoptotik endonükleaz, çeşitli hücrelerde değişik durumlar altında genomun parçalanmasının zamanında ve tam olmasını sağlamaktadır. Siklofilinler ve

asidik endonükleazlar çekirdek DNA 'sını sindirebilmektedir. Uyarılabilen Ca^{2+} / Mg^{2+} bağımlı endonükleaz T hücre apoptozisinde görev yapmaktadır.

Çekirdekte DNA parçalanmasına neden olan 2 protein vardır : AIF ve Acinus

AIF mitokondriden gelerek kromatin yoğunlaşması ve büyük DNA fragmantasyonu oluşturmaktadır.

Acinus nükleaz aktivitesi göstermeyen, çekirdekte yerleşmiş olan, DNA koruyucu faktördür. Apoptozis sırasında kaspaz ve serin proteazların parçalanması ile aktive olmaktadır ⁴⁴ .

Apoptozis Önleyicileri

Apoptotik olayı dengede tutan çok sayıda apoptozis baskılayıcıları belirlenmiştir. Baskılayıcıların bir kısmı normalde genomda bulunan genler tarafından kodlanır.

1. Büyüme faktörleri apoptozisi önleyici işlev görmektedir.

IGF (insulin kaynaklı büyüme faktörü) antiapoptotik etki göstermektedir.

NGF (sinir büyüme faktörü)

PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü)

2. IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein, apoptozisi baskılayan protein) : IAP protein ailesi vücudun endojen hücre ölüm proteaz baskılayıcıları olarak hizmet etmektedir. İnsanda 5 IAP protein ailesi bilinmektedir (NAIP, cIAP-1, cIAP-2, xIAP ve SURVININ).

65 IAP ailesi proteinlerin en az 70a.a içeren ve BIR (Baculoviral IAP Repeat : Baculoviral IAP Tekrarları) bölgesi olarak adlandırılan bir kopya bölümü vardır. Çoğu IAP ailesi proteinde 2 ya da 3 BIR bölgesi bulunmaktadır.

Bazı IAP proteinlerin (cIAP-1, cIAP-2, xIAP) Kaspaz -3, Kaspaz-7, Kaspaz-9 gibi kaspazların aktif formlarına doğrudan bağlandıkları ve enzimatik aktivitelerini baskıladıkları görülmüştür.

3. Bcl-2 : Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli lenfomada tanımlanmıştır. Bcl-2, dağılımı hücre tipine bağlı olarak değişen bir hücre içi zar proteinidir. En fazla

yerleřtiđi yerler mitokondri, dűz endoplazmik retikulum (ER) ve çekirdek çevresindeki zarlardır. İyon transportunun dűzenlenmesinde gűrev almaktadır.

Mitokondri dıř zarı, ER ve çekirdek zarı reaktif oksijen tűrlerinin yapıldıđı yerlerdir. Bcl-2, hűcreleri H_2O_2 ve O_2 űreten t-butil hidroperoksid ve menadion 'a karřı koruyabilmektedir. Dűřűk konsantrasyonlarda bu oksidan stres, apoptotik sűrete hűcreleri űldűrmektedir.

CREB (cAMP Responing Element Binding Protein : cAMP Cevap elemanı bađlayan protein) kopyalama faktűrű olan Bcl-2, deđiřik uyarılarla apoptozisi baskılayabilmektedir.

Bcl-2 ile ilgili proteinler yapısal ve işlevsel durumlarına gűre 3 grup altında sınıflanmaktadırlar:

1. Bcl-2 alt grubu : Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1

BH1, BH2, BH3, BH4 olmak űzere dűrt bűlgeleri benzerlik gűstermektedir. Mitokondri dıř zarına yerleřirler. Hepsinin antiapoptotik iřlevi vardır.

2. Bax alt grubu : Bax , Bak , Bad , Bcl-X_S

Proapoptotiktirler.

Yapılarında BH1, BH2, BH3 bűlgelerini içermektedirler.

Bax sitozolde bulunmaktadır ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bađlanmaktadır. Burada kűűk delikikler "pore" oluřumunu indűklemektedir. Bűylece selektif iyon permeabilitesi kaybolmaktadır. Sonuçta sitokrom c ve Apoptozis İndűkleyici Faktűr (AIF) 'űn mitokondriden sitozole çıkmasını sađlamaktadır.

Yapı olarak bazı bakteriyel toksinlerin, por oluřturan proteinlerine benzerlik gűstermeleri en azından kısmen hűcre içi zarlarda (mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarı) kanallar oluřturma potansiyelleri olabileceđini dűřűndűrmektedir.

Bax, difteri toksininin yapısal olarak tam benzeridir. Bu toksin endozomal / lizozomal zarlarda mRNA çevirimini (translasyon) baskılayan adenozin 5'difosfat ribozile edici polipeptid A alt űnitesinin sitoplazmaya geçmesini sađlayacak bűyűklűkte kanallar oluřturarak hűcreyi űldűrmektedir.

3. Bik alt grubu : Bad, Bid ve Bim

Proapoptotik

Yalnız BH3 bölgeleri Bcl-2 'ye benzerlik gösterdiği için BH3 proteinler olarak da adlandırılmaktadırlar.

Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri normalde hücrelerde sessiz "latent" halde bulunmaktadır. Bu pro-apoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom c 'nin stoplazmaya saliverilmesini sağlamaktadırlar.

Bid 'in kırılmasına dolayısıyla aktifleşmesine yol açan etken, kaspaz-8 'in aktivasyonudur. Bid ayrıca TNF ve TRAIL aracılığıyla da aktifleşmektedir. Bid 'i "knock out" yapılmış fare hepatositlerinde TNF veya anti-Fas ile apoptozis indüklenmeye çalışılırsa, bu farelerde apoptozis oluşmamaktadır. Bu deney, Bid 'in hücre yüzey ölüm reseptörlerinden gelen apoptotik sinyalin mitokondriye iletilmesinde rol aldığını, böylece ölüm reseptörleri ile mitokondrinin bağlantısını sağladığını göstermektedir ⁴⁵.

Bax, Bid, PUMA, NOXA genlerinin kodladığı proteinler, apoptozis baskılayıcı Bcl-2 ve Bcl-xL proteinlerinin mitokondri dış zarının bütünlüğünü koruma etkilerini ortadan kaldırmaktadır.

Bax hücrede aşırı yapıldığında apoptotik ölüm artarken Bcl-2 aşırı yapıldığında Bax ile heterodimerize olmaktadır ve apoptotik ölüm baskılanmaktadır.

Hücrenin sağ kalımı ("survival") Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlı olmaktadır.

p53 aktive olduğunda Bax yapımını uyarmaktadır. Bax proteini de mitokondride yerleşmiştir. Bu durumda antiapoptotik Bcl-2 proteinlerinin apoptotik Bcl-2 proteinlerine oranı azalmaktadır. Mitokondride Bax miktarının artması ile Bax-Bax homodimerleri oluşmaktadır. Bu durum, mitokondride por oluşturarak sitokrom c 'nin sitoplazmaya salınımı ile Apaf-1 aktivasyonuna neden olmaktadır

⁴⁶

2.2 Oksidatif Stres ve Apoptozis

Günümüzde aerobik organizmalarda normal metabolizmanın bir yan ürünü olan reaktif oksijen / nitrojen türevlerinin (ROT / RNT) hücrenin sinyal ileti mekanizmalarında rol alan ikinci haberciler oldukları kabul edilmektedir. Hücre içi ROT 'lar hücre dışı / hücre içi etkenlerle oluşabilmektedir ^{47,48} .

Hücre dışı en önemli etkenler arasında fagositoz, patojenler, mitojen / sitokin indüksiyonu, Fe iyonu, uv / radyasyon etkileri ve çeşitli ilaçlar sayılabilmektedir.

Hücre içi ROT oluşturan etkenler ise başta mitokondri organeli olmak üzere, monoaminoksidaz (MAO) enzimi, myeloperoksidaz, NADPH oksidaz enzimleri, sitokrom P450 (Cyt P450) sistemi ve endoplazmik retikulum organeli sayılabilmektedir. Bu etkenler ile hücre içinde oluşan ROT 'ların hücrenin DNA, protein ve lipid yapılarında meydana getirdiği değişiklikler ile ilişkili oldukları genlerin aktivasyonuna veya inaktivasyonuna neden olmaktadır .

Gen düzeyinde gerçekleşen bu etkilerin sonucu dört farklı yönde gelişebilmektedir:

1. Onkogen indüksiyonu sonucu kanser gelişimi,
2. Adaptasyon süreci ile hücre savunma mekanizmalarının gelişimi,
3. Homeostatik mekanizma ile hücrenin normal yaşamına devam etmesi,
4. Hücrenin tamir / savunma mekanizmalarının kapasitesinin hasarlanması ile hücre ölüm yolu / apoptozis mekanizmasının uyarılmasıdır.

Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ve düzenleyicileri apoptozisi başlatan önemli bir etkidir. Reaktif oksijen yapımı sonucu görülen lipid peroksidasyonu farklı etkenlerin başlattığı apoptozis ile ilişkilidir. Ancak çok düşük oksijen düzeylerinde de apoptozisin görülmesi apoptozisde reaktif oksijen türlerine mutlaka gereksinim duyulmadığını, reaktif oksijen türlerinin apoptozis sürecinin başlatılmasını kolaylaştıran fakat doğrudan apoptozise yol açmayan hücre içi sinyallerden biri olarak işlev gördüğünü düşündürmektedir.

Süperoksid dismutaz düzeylerinin etkisi TNF'nın apoptozisi başlatma yeteneğinde görülürken Fas 'ın başlattığı hücre ölümünde görülmemektedir.

Hücre organelleri ve hücre ölüm mekanizmaları ile yapılan çalışmaların büyük bir bölümü apoptozis regülasyonunda önemli rolü olan mitokondri organelinde yoğunlaşmaktadır.

ROT 'ların oluşumu, mitokondri membranlar arası bölgede bulunan pro-apoptotik proteinlerin salınımını ve apoptozisi tetiklemektedir. Tüm aerobik organizmalarda mitokondrial solunum zinciri ROT ürünlerinin ana kaynağını oluşturmaktadır. Normal fizyolojik solunum sırasında yaklaşık olarak tüketilen moleküler oksijenin %1-2 'si ROT 'ların öncülü olan süperoksid anyonuna (O_2^-) dönüşmektedir. Süperoksid anyonlarının dismutasyonu ile H_2O_2 üretilmektedir. Oluşan H_2O_2 'in ve süperoksidin Haber-Weis reaksiyonunda Fe ve Cu iyonları ile etkileşime girmesi ile oldukça reaktif olan hidroksil radikali (OH) oluşmaktadır.

ROT 'ların önemli hedeflerinden biri mitokondrial DNA (mtDNA) 'dır. Mitokondrial DNA elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi için gerekli 13 polipeptid, 22 transfer RNA (tRNAs) ve 2 ribozomal RNA 'yı kodlamaktadır. Histonlardan yoksun olması ve elektron transport zincirine yakın konumda bulunması nedeniyle mtDNA oluşan ROT 'ların etkisine daha fazla maruz kalmaktadır. Mitokondrial oksidatif stres etkisi ile bozulan genomik stabilitenin yanı sıra hücre yaşamını yakından ilgilendiren protein, lipid ve membran yapılarının hasarlanması hücre ölümünün aktive olmasına yol açmaktadır.

Mitokondride oluşan süperoksid anyonunun önemli toksisitesi demir- kükürt (Fe-S) proteinlerinin direkt oksidasyonu ve inaktivasyonudur (Örn. Akonitaz).

Mitokondrial akonitaz inaktivasyonunun en az iki sonucu vardır :

1. İnaktif Fe-S merkezlerinden sürekli olarak Fe ve H_2O_2 salınımı sonucunda Haber-Weiss reaksiyonu için ortam oluşturulması ile oldukça reaktif olan OH radikali oluşmaktadır.

Oluşan OH radikali mitokondrial proteinleri, DNA ve lipidleri okside edebilmektedir.

2.Akonitazın Krebs siklusunda inaktive olması ile enerji oluşumu (ATP) azalmaktadır.

Moleküler kompozisyonu tam olarak aydınlatılamamış olmasına karşın mitokondrial geçiş porlarının (mitochondrial permeability transition , MPT) hücre ölümünde önemli rol oynadığı savunulmaktadır.

Mitokondrial geçiş porları için önerilen modele göre porlar voltaja bağımlı anyon kanalı, adenin nükleotid translokaz, siklofilin-D, heksokinaz, kreatin kinaz 'dan (VDAC-ANT-CyP-D) oluşmakta ve mitokondrinin iç-dış membranlar arası bölgesinde yerleşim göstermektedir.

Yapılan son çalışmalara göre ANT'nin kanser ilaçlarının (Örn: Doxorubicin) oluşturduğu ROT'ların ana hedefi olduğu savunulmaktadır. Süperoksid anyonunun ise VDAC 'ın açılması sonucunda Sitokrom c (Cyt c) salınımına neden olarak hücre ölümüne yol açtığı belirtilmektedir ⁴⁷ .

Sitokrom c normal şartlarda iç mitokondrial membranda anyonik bir fosfolipid olan kardiolipin ile elektrostatik etkileşime girerek membrana tutunmaktadır. Kardiolipinin oksidasyonu ile Cyt c 'nin bağlanma ilgisinin azaldığı daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda belirlenmiştir ^{47,48} .

Apoptotik hücrenin mitokondrisinde ROT oluşumuna katkıda bulunan diğer kaynaklardan biri p66Shc proteindir. Bir pro-oksidan olan p66Shc proteini elektron transport zincirindeki indirgeyici ajanların Cyt c 'nin oksidasyonunu sağlayarak H₂O₂ oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Genom stabilitesinden sorumlu olan p53 proteini de hücrenin redoks regülasyonunda yer alan diğer bir proteindir. Reaktif oksijen türevlerinin DNA ile etkileşimi sonucunda oluşan DNA hasarı p53 aktivitesinin artmasına neden olmakta bunun sonucunda da mitokondriden Cyt c salınımı ve kaspaz aktivasyonunu tetikleyen pro-apoptotik proteinlerin (Bax ve PUMA) ekspresyonunun artmasına neden olmaktadır. Hücrenin p53 düzeyi ve PUMA, Bax, ROT birikimi hücre ölüm mekanizmasının tetiklenmesini belirleyebilmektedir ⁴⁸ .

Sonuç olarak ROT'ların hücre-dışı / hücre-içi apoptozis tetikleme mekanizmalarında etkili oldukları ve apoptotik süreci gen düzeyinde etkiledikleri yapılan in vitro / in vivo çalışmalar sonucunda ispatlanmıştır ^{47, 48} .

2.3 Apoptozis Belirleme Yöntemleri

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmiştir.

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80 'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya çıkarılmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlanmıştır. 90 'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştigi bulunmuştur. Böylece kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90 'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır.

Apoptozis'in belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları, 2000 'li yılların başlarında sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere, kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan "keratin 18" 'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmiştir.

Apoptozis 'in belirlenmesinde kullanılan yöntemler :

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmünolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri olarak belirtilebilmektedir.

Apoptozis'in belirlenmesinde yöntem türünden ziyade, apoptozise özgü herhangi bir hücresel olayın / aktivitenin belirlenmesi esas alınarak değerlendirme yapılabilmektedir. Örn.Apoptozis DNA fragmentasyonu esas alınarak saptanacaksa bu metodların bir veya birden fazlası kullanılabilmektedir. DNA fragmentasyonu histokimyasal olarak gösterilebileceği gibi, biyokimyasal olarak da gösterilebilmektedir. Hatta ELISA ile de gösterilebilmektedir. Bu ayırmada önemli olan çalışılacak numunenin cinsidir.

Hücre kültürü yapılarak elde edilen bir numune ise, biyokimyasal bir yöntem olan Agaroze Jel Elektroforez 'i yapılabilmektedir.

Eğer bir dokudaki DNA fragmentasyonları (apoptotik hücreler) araştırılıyorsa o zaman da histokimyasal bir yöntem olan TUNEL yöntemi kullanılabilmektedir.

1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri :

I. Işık Mikroskobu

a.Hematoksilen Boyama

b.Giemsas Boyama

II. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop

a.Propidium İyodür

b.Hoechst Dye

III. Elektron Mikroskobu

IV. Faz Kontrast Mikroskobu

Apoptozisde görülen şekilsel özellikler, apoptozisin değerlendirilmesinde en güvenilir yöntemlerden biridir. Ancak şekilsel değişikliklerin çok kısa sürede ortaya çıkması ve tek tek hücrelerde görülmesi bu yöntemi yetersiz kılmaktadır.

2. İmmünohistokimyasal Yöntemler :

I. Anneksin V Yöntemi

II. TUNEL Yöntemi

III. M30 Yöntemi

IV. Kaspaz Yöntemi

I. Anneksin V Yöntemi : Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzünde yerleşmiş olan PS molekülleri, hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS 'ler, floresan bir madde (örn.FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilmektedir. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olmaktadır.

II. a. TUNEL Yöntemi : DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlamaktadır. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki hücrelerde veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilmektedir.

b. bio-dUTP : Parafin kesitlerde terminal deoksitransferaz yolu ile geliştirilen yöntemdir. 'nick-end' işaretleme ve 'in situ end' işaretleme yöntemi ile 'nick-end' işaretleme yönteminde terminal transferaz, 'in situ end' işaretleme yönteminde DNA polimeraz , DNA zincir kırıklarında biotinlenen nükleotidlere girmektedir ve işaretlenmiş DNA immunohistokimyasal olarak görülebilmektedir. Nekrozda da DNA zincir kırıkları görülebildiğinden sonuçların yorumlanmasında dikkatli olunmalıdır ⁴⁹ .

III. M30 Yöntemi : Apoptotik hücreler sitokeratin 18 'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenmektedir. Sadece sitokeratin 18 'i eksprese eden epitelyal kaynaklı dokularda kullanılması mümkündür.

IV. Kaspaz-3 Yöntemi : Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal metoduyla belirlenebilmektedir. Bunun için dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3 'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekmektedir.

3. Biyokimyasal Yöntemler :

I. Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi ; DNA fragmentasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır.

II. "Western Blotting" yöntemi ; substrat kırılmaları, aktif kaspazın belirlenmesi, sitokrom c salıverilmesinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

III. "Flow " Sitometri yöntemi ; DNA azalmasının tesbiti ve Anneksin V yönteminde tercih edilmektedir.

I. DNA Agaroz Jel Elektroforez Yöntemi : Apoptozis 'de DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırıldığı için, tipik merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşmaktadır. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekrozisde görülmemektedir.

II. "Western Blotting" Yöntemi : Apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. Bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. Kaspaz-3) "Western Blotting" yöntemi ile saptanması mümkündür. Bu yöntem ile Sitokrom c 'nin sitoplazmaya çıkıp çıkmadığı da belirlenebilmektedir.

III. "Flow" Sitometri Yöntemi : "Flow" sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozisde eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkün olmaktadır. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Flow sitometri yöntemi ile iki şekilde apoptozis incelenebilmektedir :

a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarı kıyaslanmaktadır ve azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu (sub-G1 piki) tayin edilebilmektedir.

b. Anneksin V kullanılarak floresan mikroskobu ile uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılmaktadır.

"Flow" sitometri grafiklerinde sağ-alt kadrandaki popülasyon anneksin-V 'nin pozitif ve propidium iodid 'in negatif olduğu apoptotik hücrelerin bulunduğu bölgedir.

IV. İmmunolojik Yöntemler :

1. ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tesbit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkün olmaktadır.

2. Fluorimetrik Yöntem kullanılarak kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesi mümkün olabilmektedir.

V. Moleküler Biyoloji Yöntemleri'nden "DNA Microarrays" teknolojisi ile Hücre Ölüm Reseptörleri ve Kaspazlar'ın gen ekspresyon dereceleri (mRNA) 'nin tesbitine çalışılmaktadır.

DNA "microarrays" teknolojisi henüz çok yeni ve pahalı bir yöntemdir. Bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA 'larının) tesbiti mümkün olabilmektedir.

Apoptozisin pek çok gen tarafından düzenlendiği, nekrozun ise toksik ya da fizik etkenlerle başlayan pasif dejeneratif bir olay olduğu düşünölmektedir ²⁷.

Bcl-2 ve Bcl-xL 'nin, hücre solunumunu durdurarak (oksijen azaltılması ya da respiratuar zincir inhibitörleri eklenmesi ile) başlatılan nekrotik hücre ölümünü baskılaması, tetrapeptid baskılayıcıları ve crmA (cytokine response modifier A:Sitokin yanıt değıştircisi A) içeren kaspaz baskılayıcılarının nekrotik hücre ölümünü geciktirmeleri, apoptozis ve bazı nekrotik hücre şekillerinin ana yolları paylaştığını düşündörmektedir ⁵⁰.

Hücre içi ATP düzeyinin ölçölmesi hücre ölüm şeklinin belirlenmesinde önemlidir. Apoptozis ATP 'ye bağımlı iken nekroz değildir. Bazı ölüm uyarıları ATP varlığında apoptozisi uyarmaktadır, ATPaz ise nekroza neden olmaktadır. Kaspaz aktivasyonunun işlevsel akışında sitoplazmik apoptotik etkileyicilerin çekirdek içine aktif taşınması ATP'ye bağılı olmaktadır (hangi basamağın ATP 'ye bağılı olduğu bilinmemektedir).

2.4 Bakteriyel Toksinlerin Apoptotik Etkisi

LPS ve IFN-gamma makrofajları uyarmaktadır. Makrofajlar INOS (Inducible nitric oxide synthase) aracılığı ile NO üretmekte ve JNK (c-jun-N-terminal kinase) yolu aktive olmaktadır. Bu olaylar apoptotik kaskadı tetiklemektedir ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Çünkü JNK yolu pro-apoptotik ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerini düzenlemektedir ⁵¹.

RAW 264.7 makrofaj hücreleri, LPS ve IFN-gamma ile muamele edilmiştir, LPS / IFN-gamma 'nın JNK yolunu aktive etmesi JNK yolunun Bcl-2 ailesi üyeleri üzerine etkisi ve bu etkide makrofajlar tarafından uyarım sonucu oluşan NO (nitrik oksit) 'in etkisi araştırılmıştır ⁵¹. siRNA ile JNK yolu inhibe edilerek JNK yolu 'nun LPS ile uyarılan makrofajlardaki apoptozisde rolü olduğu doğrulanmıştır. INOS inhibitörü L-NIL kullanılarak NO üretimi baskılanmıştır. Bu durum JNK aktivasyonunu değiştirmiştir.

Sonuç olarak LPS / IFN-gamma ile uyarılan RAW 264.7 hücrelerinin mitokondrial ve nüklear kompartmanlarında, mitokondrial JNK aktivasyonunun NO bağımlı olduğu gözlenmiştir. Bu sonuca göre makrofajlarda LPS / IFN-gamma ile sağlanan apoptozisin NO bağımsız Bim fosforilasyonu, NO bağımlı Bax defosforilasyonunu içerdiği belirtilmiştir ⁵¹.

LPS ile aktive edilmiş CD4+CD25+ Tregulator hücrelerin (Treg) nötrofil fonksiyonunu inhibe ettiği ve nötrofil apoptozisini tetiklediği bildirilmiştir ⁽⁵²⁾ . Nötrofiller TLR3 dışında bütün bilinen TLRs (Toll-like reseptörler)'ni salmaktadırlar. TLR2 ve TLR4 nötrofillerde hücre adezyonunu ve sitokin üretimini arttırmaktadır. Dolayısıyla TLR4 ligandı LPS ve nötrofiller için güçlü aktivatördür. Nötrofillerden ROI (Reactive Oxygen Intermediates) üretimini ve sitokin-kemokin salınımını arttırmaktadır. Bu çalışmada LPS 'nin, CD4+CD25+ Treg hücrelerinin supresif etkisini arttırdığı, CD4+CD25+ Treg hücrelerinin de artan bu supresif etkisiyle nötrofil fonksiyonunu azalttığı ve apoptozisine neden olduğu gözlenmiştir.

LPS *E.coli* serotip R515'den elde edilmiş, İnsan PMNs (polimorfneükleer lökositler: nötrofiller) üzerinde çalışılmıştır. PMNs'in CD4+CD25+Treg ve CD4+CD25- T hücrelerle kültürü yapılmış, daha sonra LPS eklenmiş ve 5-18 saat inkübasyona bırakılmış ve CD11b CD62L CD16 nötrofil yüzey reseptörleri, CD4+CD25+Treg 'den TLR4 salınımı flow sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. FOXP3 salınımı Human Treg Flow Kit ile tesbit edilmiştir. (FOXP3, Treg hücrelerinin gelişmesi ve fonksiyonlarını yapmalarında önemli role sahip transkripsiyonel faktör). Nötrofil apoptozisinin belirlenmesinde Annexin V-FITC binding yöntemi kullanılmıştır. Annexin V fosfatidilserin 'e bağlanmaktadır. Erken ya da geç apoptozis ayrımı için bu boyama yöntemine ilave propidium iodide boyama yapılmıştır. ROI tesbiti için luminol - ECL ile ölçüm yapılmış ve MLX microtiter plate luminometer - chemiluminescence yöntemi kullanılmıştır. IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α sitokin salınımı human inflammation cytometric bead yöntemi ile ölçülmüştür.

Sonuç olarak; LPS'nin FOXP3 salınımını arttırdığı, LPS ile uyarılan CD4+CD25+Treg hücrelerin nötrofillerden ROI ve sitokin üretimini azalttığı ve nötrofil apoptozisini tetiklediği belirtilmiştir⁵².

RAW264.7 makrofaj hücreleri 'nde bir Endoplazmik Retikulum (ER) Stress Ajanı olan Brefeldin A 'nın sebep olduğu apoptozisi LPS 'nin önlediği bildirilmiştir⁵³.

Hücre Ölüm Reseptörü Yolu ve Mitokondrial Yol Apoptozis'in gerçekleşmesinde 2 ana yol olarak bildirilmiştir. Endoplazmik Retikulum Stress ilişkili Apoptozis 'de Apoptozis 'in gerçekleşmesinde 3.yol olarak bildirilmektedir.

Endoplazmik Retikulum Stres ilişkili Apoptozis; proteinkinaz, Ca⁺⁺, mitokondri, pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküller, kaspaz, hemoksijenaz-1, mitogen-activated protein kinases , mikrotubuller içermektedir.

ER Stres ilişkili apoptozis, Brefeldin A, Thapsigargin ve Tunicamycin gibi ER Stres ajanları ile karakterizedir. Bununla birlikte ER Stress ilişkili Apoptozis hala tam olarak açıklık kazanmamıştır.

LPS, makrofajları aktive etmektedir. Enflamatuvar mediatörlerin üretimine yol açmaktadır, hücre hasarı ve ölüm gerçekleşmektedir. Gerçekte LPS 'in çeşitli hücre tiplerinde apoptozis ile sağlanan sitotoksitesi gösterilmiştir. Bu sebeple LPS ERstress ilişkili apoptozise etki edebilmektedir ⁵³.

RAW 264.7 makrofaj hücreleri, 100ng/ml LPS ve Brefeldin A, Thapsigargin, Tunicamycin ER Stres ajanlarının çeşitli konsantrasyonları ile 24 saat inkübe edilmiştir. Hücre sitotoksitesi MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

Bu yöntem sonuçlarına göre LPS, Brefeldin A ile oluşan apoptozis 'de koruyucu etkili bulunmuştur. LPS, Thapsigargin ve Tunicamycin üzerine etkili bulunmamıştır. RAW264.7 makrofaj hücreleri Brefeldin A ile inkübe edildiğinde bu hücrelerde meydana gelen DNA fragmentasyonu üzerine LPS 'nin etkisi araştırılmıştır. Agaroz Jel Elektroforez ile LPS 'nin DNA fragmentasyonunu önlediği açıkça gözlenmiştir.

LPS dışındaki diğer makrofaj aktivatörleri (CpG DNA, TNF α , IFN γ) ile de bu çalışma yapılmıştır. CpG DNA 'nın LPS ile benzer sonuçlar verdiği gözlenmiştir, TNF α ve IFN γ 'nın böyle bir etkisi gözlenmemiştir.

Bu çalışmada Enzyme-Spesific Fluorometric yöntem ile RAW 264.7 hücrelerde Brefeldin A 'nın Caspase-1,3,4,12 aktivasyonunu sağladığı ve Immunblotting yöntem ile LPS'nin Caspase-1,3,4 aktivitesini bloke ettiği gösterilmiştir ⁵³.

LPS'nin, human monoblastic U937 hücrelerde apoptozis oluşumunu sağladığı belirtilmiştir⁵⁴. Bu sonuç, apoptozis'in karakteristik markırları olan nükleer fragmentasyon ve kaspaz altivitesine göre değerlendirilmiştir. Bu çalışmada kaspaz inhibitörü Z-VAD-fmk kullanılmıştır. Sitokrom c salınımı ve mitokondrial membran potansiyel kaybında değişiklik saptanmamıştır.

Sonuç olarak; LPS'nin human monoblastic U937 hücrelerde apoptozisi tetiklemesinde mitokondrial fonksiyonların önemli rol oynadığı ve mitokondrial disfonksiyonun oluşmasında kaspaz aktivitesine gerek duyulmadığı belirtilmektedir ⁵⁴.

LPS'nin, PMN (polimorf nuclear lökositler)'de spontan ve CD95 ilişkili apoptozisi, cIAP-2 (inhibitor of apoptozis protein-2) bağlantılı Kaspaz-3 aktivitesinin bozulmasıyla azalttığı belirtilmiştir ⁵⁵ .

Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla DEVD-af-cleavage assay, Ubiquitinated caspase-3 salınımı ve cIAP-2 protein salınımı Western Blot yöntemi ile belirlenmiştir. cIAP mRNA RT-PCR ile belirlenmiştir.

LPS'nin 2 saat içinde cIAP-2 mRNA ve proteininin oluşumunu sağladığı, Kaspaz-3 aktivasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca proteozomların inhibisyonunun, LPS 'nin CD95 ilişkili apoptozis ve spontan apoptozis ve Kaspaz-3 aktivitesinin bozulması üzerine anti-apoptotik etkisini ortadan kaldırdığı belirtilmiştir ve buna göre LPS tarafından oluşumu sağlanan cIAP-2 'nin ve proteozomlar tarafından Caspase-3 aktivasyonunun bozulmasındaki artışın PMN 'de apoptozis oluşumundan sorumlu olabileceği belirtilmektedir ⁵⁵ .

Staphylococcus aureus α -toksini 'nin, İnsan Umbilical Ven Endotel hücreleri 'nde apoptozis 'i tetiklediği bildirilmiştir ⁵⁶ .

Staphylococcus aureus α -toksini'nin pürifiye edilmiş sublitik konsantrasyonları monolayer endotel hücre kültürü ile 24 saat inkübe edilmiştir. Endotel hücrelerinde apoptozis belirlenmesi için DNA ekstraksiyon ve jel elektroforez yöntemi, terminal deoxytransferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) yöntemi kullanılmıştır. Mikroskopik değerlendirme-morfolojik değişikliklerin belirlenmesi için inverted mikroskop kullanılmıştır.

Sonuç olarak; *S.aureus* α -toksin' i ile muamele edilmiş endotel hücrelerinden genomik DNA ekstrakte edilmiş ve agaroz jel elektroforez yönteminde apoptozisin karakteristik belirteci internükleozomal DNA fragmentasyonu gösterilmiştir. *S.aureus* α -toksini 'nin insan umbilikal ven endotel hücrelerinde apoptozis sağladığı belirtilmiştir ⁵⁶ .

Nötrofillerin kısa yaşam süresi vardır. Yapılan in vitro çalışmalarda yaklaşık 16-20 saat içinde bu hücrelerin spontan apoptozise uğradığı belirtilmektedir. Bu işleyiş nötrofillerin proinflamatuvar işlevlerini düzenlemektedir. Böylece dokudan makrofajlarca atılmaları sağlanmaktadır. Bu şekilde nötrofiller tarafından salınan toksik maddelerden diğer hücrelerin etkilenmesi önlenmiş olmaktadır.

Nötrofillerde bu düzen oturmuş durumda iken, bazı inflamatuvar mediatörler, sitokinler, bakteriyel ürünler veya hipoksi gibi lokal durumlar nötrofillerin apoptozisini arttırabilmekte ya da geciktirebilmektedir ⁵⁷.

ROT (Reaktif Oksijen Türleri) 'nin ekstra - ve intra-selüler olduğu arasındaki ayrımı yapmak için nötrofiller 'in süperoksit dismutaz ile muamele edildiği ve bu çöpçü reseptörlerin ekstrasellüler süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit (H_2O_2) 'i arttırdığı belirtilmiştir ⁵⁷.

Enterotoksijenik *E.coli* enterotoksini 'nin faredekas içi enjeksiyonundan sonra dalak ve timus 'da meydana gelen atrofinin apoptozis ilişkili olduğu belirtilmiştir ⁵⁸. ETEC enterotoksini'nin IM enjeksiyonundan 26 saat ve 36 saat sonra timusda apoptozis belirteci olan DNA fragmentasyonunun meydana geldiği, timusdaki apoptozisin zaman bağımlı olduğu belirtilmiştir ⁵⁸.

ETEC enterotoksini'nin farede IM enjeksiyonundan sonra dalakta ve timusta Flow Sitometri yöntemi ile CD4+ CD8+ (çift pozitif) hücrelerin ve CD45+ B hücrelerin sayısında önemli oranda azalış belirlenmiştir.

Yüksek doz ETEC enterotoksini ile kültüre edilmiş timositlerde in vitro apoptozis sağlanmıştır.

Sonuç olarak; ETEC enterotoksini'nin farede IM enjeksiyonundan sonra dalakta ve timusta meydana gelen atrofinin sebebinin CD4+CD8+ hücrelerde ve CD45+ B hücrelerde meydana gelen apoptozis kaynaklı olabileceği belirtilmiştir. Toksinin serum seviyesine erişilememiştir ⁵⁸.

E.coli Shiga toksin-Shiga like toksininin insan epitel hücrelerinde apoptozis oluşturduğu ve Bcl-2 ailesinin bu apoptoziste düzenleyici rol aldığı belirtilmektedir ⁵⁹.

E.coli Shiga toksin, Stx1 ve Stx2 *E.coli* Shiga toksin (STEC) enfeksiyonlarında major virulans faktördür. Stx1 ve Stx2 için globotriaosylceramide (Gb3) reseptördür. Bu reseptör insan intestinal epitel hücrelerinde bulunmamaktadır. Bu nedenle STEC enfeksiyonlarında bu toksinlerin mekanizması açık değildir.

Stx1 ve Stx2 A-B modelinde, B subunit pentamer spesifik glikolipit reseptörlerine, Gb3 reseptöre bağlanmaktadır. Holotoksin endotoksikoz ile

alınmaktadır. Golgi cisimciğine ve sonra Endoplazmik Retikuluma transportu gerçekleşmektedir. 60S ribozomal subunit 'in 28 rRNA'sı üzerine etki etmektedir ve protein sentezini önlemektedir, sitotoksiste meydana getirmektedir.

Purifiye *E.coli* Shiga toksin ; Burkitt Lenfoma hücreleri, Vero hücreleri ve insan renal tubular epitelial hücrelerde apoptozis'e sebep olmaktadır.

E.coli strain R82Pjes 120 DH5a (Stx2 purifikasyonu için), strain JB28 (Stx1 purifikasyonu için) kullanılmıştır. Hep-8 hücreler (human laryngeal epithelial cell line,Gb3 salıyor), Caco-8 hücreler (human intestinal cell-line, Gb3 salıyor), T84 (human intestinal cell-line,Gb3 salmıyor) Stx1 ve Stx2 (12.5ng/ml) ile muamele edildikten sonra apoptozis belirleme yöntemleri ile bu hücrelerdeki apoptotik etki araştırılmıştır⁵⁹.

Stx1 ve Stx2 'nin Hep-2 hücrelerindeki apoptotik etkisi araştırılmış ve Stx1 'in etkisinin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Stx1 B alt ünite ile yapılan çalışmalarda yüksek konsantrasyonlarda apoptozis sağladığı belirlenmiştir. Hep-2 hücrelerinde nükleus fragmantasyonu, sitoplazmada vakuolleşme tipik apoptozis belirteci olarak saptanmıştır. Stx1 'in bu hücrelerde oluşturduğu apoptozis doz ve zaman bağımlı olarak gözlenmiştir. Caco-8 hücrelerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. T84 hücrelerinde ise apoptotik etki gözlenmemiştir. Bu sonuca göre Gb3 reseptörü'nün toksin ilişkili apoptoziste mutlaka gerekli olduğu belirtilmektedir⁵⁹.

Stx1 ve Stx2 uygulandıktan sonra Bcl-2, Bax, Bak salınımı Western Blot yöntemi ile ölçülmüş ve Stx1 ve Stx2 'nin Bax salınımını arttırdığı gözlenmiştir⁵⁹.

Bu çalışmada Z-VAD-fmk kaspaz inhibitörünün, doz bağımlı hücre ölümünü önlediği belirtilmiştir. Z-DEVD-fmk, kaspaz-3 inhibitörü 'nün apoptozisi önlediği gözlenmiştir.

Bcl-2 'nin aşırı salınımının ve kaspaz inhibitörlerinin apoptozisi önlediği belirtilmiştir⁵⁹.

Ek olarak Bcl-2 ailesi üyeleri, programlı hücre ölümü ile pro- ve anti-apoptotik proteinlerin ilişkisi gösterilmiştir. Gb3 reseptörü salan hücreler bu toksinlerle muamele edilince pro-apoptotik Bax artışı gözlenmiştir⁵⁹.

Sonuç olarak ; bu çalışmada E.coli tarafından salınan Stx1 ve Stx2 'nin, Gb3 salan insan mukozal epitel hücrelerinde apoptozis oluşumunu sağladığı anlaşılmıştır. İntestinal epitel hücreleri Gb3 reseptörü içermediğinden apoptozis'e uğramamaktadır ⁵⁹.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasal Bileşikler, Besiyerleri, Kitler

H9c2 (rat embriyonik kardiyomiyosit)

Kolera toksin ((Azide – Free) 501 - B VANDELL WAX, CAMPBELL, CA 408 / 866, mg / ml, Amerika)

Difteri toksin (1.8 mg / ml)

Stafilokokkal enterotoksin B (Staphylococcal enterotoxin B from *Staphylococcus aureus* (Sigma, Amerika))

LPS (*E.coli* O55:B5)

E.coli endotoxin standard (Sigma, Amerika)

FBS (Fetal Bovine Serum) (ısı ile inaktive edilmiş) 500ml (Gibco, İskoçya)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 500ml (Gibco, İskoçya)

DMEM (Fenol Red free) (w/o FBS, w/o Siprofloksasin, w/o β 2

Mercapthoethanol) (Gibco, İskoçya)

Penisilin (Biochrom AG, Almanya)

Streptomisin (Biochrom AG, Almanya)

L-glutamine (Biochrom AG, Almanya)

β 2 Mercapthoethanol (Fluca Biochemica, Almanya)

PBS 500ml (Gibco, İskoçya)

Trypsin - EDTA 0,25 % (1X) (Gibco, İskoçya)

Trypan Blue (Tripan Mavisi) %0,4 (Applichem, Almanya)

%5 DMSO içeren FBS (Fetal Bovine Serum)

0.5M Tris HCl pH :8

0.01M Tris HCl pH :7

5X RNA Loading Buffer

Ultra Pure Water 500ml (Gibco, İskoçya)

10X FA Gel Buffers

1X FA Gel Running Buffer

50X TAE (Tris acetate / EDTA) Buffer

1X TAE (Tris acetate / EDTA) Buffer

% 1.2 Agarose Gel

Ethidium bromide (10mg / ml)

%37 Formaldehyde

MTT Cell Proliferation Kit I (ROCHE)

2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (Sigma, Amerika) %97 FW: 487.3

Annexin V –FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences Pharmingen)

RNeasy Mini Kit – QIAGEN

RNase - Free DNase Set

RT Profiller PCR Array System SABiosciences

Apo Target Apo - BRDU (BIOSOURCE)

Hoescht stain

3.2. Aletler

Sınıf 2 Biyogüvenlik Kabini (Apollo Metis Biyoteknoloji, Türkiye)
Hassas Terazı (Shimadzu, Japonya)
Otoklav (Sanyo, Japonya)
Pastör Fırını (Electro-mag, Türkiye)
Vorteks (Heidolph, Almanya)
Otomatik pipet (Drummond , Amerika)
Tek kanallı ve sekiz kanallı pipetör (Socorex)
Mikropipetler 10µl, 100µl, 1000µl (Socorex)
Yatay Elektroforez
Soğutmalı Santrfüj (Beckman Coulter, Amerika)
Soğutmalı Mikrosantrfüj (BD, Amerika)
Jel Görüntüleme Sistemi (Sngene, Ingenius, ABD)
pHmetre (Accumet, AB15, Fisher Scientific, Amerika)
Manyetik Karıştırıcı (Jenway 1000, hotplate & Stirrer, İngiltere)
Distile Su Cihazı (Sartorius)
Enjektör 2ml, 5ml, 10ml, 20ml'lik steril enjektör (Süperset, Türkiye)
Tek kullanımlık steril enjektör filtresi 0,2µm (Corning incorporated, Corning, Germany)
Hücre kültürü flask 25-cm² ve 75-cm²
Noumber lamı (Reighert, Amerika)
Işık Mikroskopu (Olympus, Japonya)
İnverted Mikroskop (Leica DMLS)
CO₂ 'li Etüv (Revco Eite II, Amerika)
Derin dondurucu (-20) (Arçelik , Türkiye)
Derin dondurucu (-86) (Uğur, Türkiye)
Flow tüpleri
Flow Sitometri (Akan Hücre Ölçüm Cihazı (Becman Coulter, Almanya)
ELISA okuyucu
96 kuyucuklu plate düz tabanlı (Falcon)
96 kuyucuklu plate (siyah) düz tabanlı

96 kuyucuklu plate (uv) düz tabanlı (Costar)
15ml ve 50ml polipropilen konik tüp (Greiner, Bio-one GmbH, Germany)
Kapaklı ependorf (Rnase, Dnase ve pirojenden yoksun) (TPP, İskoçya)
Serolojik pipet, 5,10,25ml'lik (Beta Pette™, Amerika)
Sarı, mavi pipet ucu ; (Isolab)
Steril Pastör Pipeti ,3ml'lik (LP ITALIANA SPA, İtalya)
24 kuyucuklu well (TPP, Switzerland)
Microdalga
Elektroforez tankı
Su banyosu (Termostatlı, ısıtmalı, rotorlu su banyosu)
Authorized Thermal Cyclor (eppendorf)
Light Cyclor 480 (Roche)
Fluoresan mikroskop

3.3. Çalışmada Kullanılan Bakteriyel Toksinler

Kolera toksin : Kolera toksin *Vibrio cholerae* tarafından salgılanan ekzotoksindir. Bakteriyel ekzotoksin bakteri kromozomuna integre olmuş filamantöz bir faj tarafından kodlanmaktadır. Kolera toksin A-5B toksinidir. B parçası 5 adet dairesel dizilmiş birbirine benzer peptidden oluşmaktadır. B parçası enterotoksinin bağlanma parçasıdır. B parçası toksin değil antijendir. A parçası A1 ve A2 kısımlarından oluşmaktadır. A1 kısmı biyolojik ve enzim aktivitesinden sorumlu olan esas kısımdır. A2 birleştirici kısım, A1'i B parçasına bağlamaktadır. İnce barsağın GM1 gangliosid reseptörlerine B alt birimleri ile bağlanmaktadır.

Difteri toksini : *Corynebacterium diphtheriae* 'nin ekzotoksindir. Difteri toksini geni corynephage β faj genomunda bulunmaktadır. Difteri toksini A-B modelindedir. Üreme ortamında mukozal yüzeyle temasa geçen toksinin B parçası , A parçasının hücreye girmesini sağlamaktadır. Ekzotoksinin A parçası, ADP riboziltransferaz aktivitesine sahiptir. A zinciri ökaryot hücrelerde protein sentezi için gerekli olan bir faktör olan EF-2 (uzama faktörü 2) 'yi inaktive ederek, protein sentezini durdurmaktadır.

Stafilokokkal Enterotoksin B : Pediatrik grupta ve hastanede yatan hastalarda antibiyotik nedenli ishal tabloları ile, erişkinlerde besin zehirlenmesinin yanı sıra non-menstrual toksik şok sendromları ile ilişkilendirilmiştir. Stafilokoksik enterokolit 'e neden olmaktadır. Hastane enfeksiyonlarında en çok karşılaşılan toksindir. Süperantijen özelliğindedir.

LPS (*E.coli* O55:B5) : Gram (-) bakterilerin hücre duvar yapısında yer almaktadır. Lipid A kısmı toksin özelliğindedir (Endotoksin).

3.4. Hücre Kültürü Çalışması

H9c2 (rat embriyonik kardiyak miyositler : American Type Culture Collection, Manassas, VA) 75cm² 'lik ve 25cm² 'lik doku kültür flasklarında %10 FBS (Heat Inactivated), %0.45 glucose, %0.15 sodium bicarbonate, %0.11 sodium pyruvate, 20µM L-glutamine, 100 IU / ml penicilin, 10 µg/ml streptomycin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besi yeri kullanılarak 37°C %5 CO₂ etüvde inkübe edilmiştir. Her gün inverted mikroskopta kültür flaskları gözlenmiştir ve her 3 günde bir besi yeri değiştirilmiştir. Hücreler kültür flaskının tabanını tamamen kaplayınca pasajlanmıştır.

3.5. Sitotoksitenin Belirlenmesi

Çalışmamızda bakteriyel toksinlerden kolera toksin, difteri toksini, Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB) ve LPS (*E.coli* O55:B5)'in rat embriyonik kardiyak miyositler üzerine apoptotik etkisinin değerlendirilmesinde ilk olarak toksinlerin hücre canlılığı üzerine etkisi belirlenmiştir.

Toksinlerin hücre canlılığı üzerine toksik etkisinin değerlendirilmesi amacıyla daha önce kültüre edilmiş H9c2 (rat embriyonik kardiyak miyositler) hücreleri tripsinize edilip hücre sayımı yapılmıştır. 96 kuyucuklu plate kullanılarak her kuyucukta 10.000 hücre/ml olacak şekilde hücreler dağıtılmıştır. Hücreler 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Her gün inverted mikroskopta hücreler gözlenmiştir. 72 saat sonra hücreler plate'in tabanını tamamen kaplayınca bakteriyel toksinlerden kolera toksininin 0,1µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml, 6µg/ml, 12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml konsantrasyonları, difteri toksininin 1µg/ml, 3µg/ml,

6µg/ml, 12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml konsantrasyonları, Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB)'nin 1µg/ml, 3µg/ml, 6µg/ml, 12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml konsantrasyonları ve LPS'in 15u/ml, 31u/ml, 62u/ml, 125u/ml, 250u/ml konsantrasyonları H9c2 hücreleri ile 24h 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. 24h sonra toksinlerin H9c2 hücreler üzerine sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) yöntemi uygulanarak hücre canlılığı (%) değerlendirilmiştir.

MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) yöntemi : Canlı hücre mitokondrisinde üretilen dehidrogenaz enzimi MTT gibi tetrazolium tuzlarını indirgemektedir. Hücre içinde koyu mavi renkte formazan kristalleri oluşmaktadır, formazan kristalleri redüktaz enzimi için substrattır. Spektrofotometrede okuma yapılarak hücre canlılığı (%) değerlendirilmektedir.

3.6. Apoptozis Değeri (%)

Sitotoksitenin meydana gelmesinde apoptozis / nekrozis oranının apoptozis değeri (%) olarak değerlendirilmesi amacıyla daha önce kültüre edilmiş H9c2 hücreleri tripsinize edilip hücre sayımı yapıldıktan sonra 6 kuyucuklu well kullanılarak her kuyucukta 100.000 hücre/ml olacak şekilde hücreler dağıtılmıştır. Hücreler 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler tamamen tabanı kaplayınca bakteriyel toksinlerden difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu H9c2 hücreler ile 24 saat 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Apoptozis değerinin belirlenmesi amacıyla Annexin V boyama yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar Flow Sitometri ile değerlendirilmiştir.

Annexin V boyama yöntemi : Annexin V hücre duvarının normalde iç yüzeyinde olan ancak apoptotik cisimlerde dış yüzeyde yer alan fosfatidil serin (PS) 'in varlığını göstermektedir.

Apoptotik Etki Oluşum Yolu

3.7.1 ROT (Reaktif Oksijen Türleri) salınımının belirlenmesi: Bakteri toksinlerinden difteri toksininin H9c2 hücrelerinden ROT salınımının belirlenmesi amacıyla daha önce 25'lik flask içinde kültüre edilmiş H9c2 (rat embriyonik kardiyak miyositler) hücreleri tripsinize edilip hücre sayımı yapılmıştır. 96 kuyucuklu plate kullanılarak her kuyucukta 10.000 hücre/ml olacak şekilde hücreler dağıtılmıştır. Hücreler 37 °C %5 CO₂'li etüvde 72 saat inkübe edilmiştir. Hücreler kuyucukların tabanını tamamen kaplayınca her bir kuyucuğa 100µl 10µM DCF (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) solusyonundan dağıtılmıştır. 30 dakika 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Süre sonunda supernatant atılmıştır ve bakteriyel toksinlerden difteri toksininin 6µg/ml, 12,5µg/ml, 25µg/ml konsantrasyonları H9c2 hücreler ile 37°C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. 2 saat ve 24 saat sonra spektrofotometrede okutulmuştur. Reaktif Oksijen Türleri (ROT) salınımindaki artış spektrofotometrede yüksek fluoresan yoğunluk ile değerlendirilmiştir.

3.7.2 Gen Aktivasyonunun Belirlenmesi: Apoptozis 'in oluşumunda önemi olan kaspazlardan Sınıf I (Başlatıcı Kaspazlar) olan Kaspaz 2, Kaspaz 8, Kaspaz 9 ve Sınıf II (Sonuçlandırıcı Kaspazlar) olan Kaspaz 3, Kaspaz 6, Kaspaz 7 gen salınım derecelerinin (mRNA) belirlenmesinde "DNA Microarrays" yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntem ile Apoptozis'e özgü 96 gen salınım derecesi aynı anda değerlendirilebilmektedir.

Apoptotik gen aktivasyonunun belirlenmesi amacıyla DMEM besiyeri içinde 500.000 hücre/ml olacak şekilde 75'lik flask 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler tabanı tamamen kaplayınca bakteriyel toksinlerden difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu H9c2 hücreler ile 5 saat 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası RNA izolasyonu çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada RNeasy Mini Kit (QIAGEN) kullanılmıştır. RNA izolasyonu sonrasında RNA kalitesi değerlendirilmiştir. RNA kalitesi değerlendirme sonuçları dikkate alınarak RT-PCR çalışmasında kullanılacak

RNA örneğimizin miktarı belirlenmiştir. Apoptotik gen ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla RT-PCR yöntemi kullanılmıştır.

'Real-Time" PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kantitatif sonuç verebilen PCR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar LightCycler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve ICycler (BIO-RAD) 'dır.

LightCycler sisteminin bir uygulamasında; yalnızca çift zincirli DNA 'ya bağlandıklarında floresan veren boyalar (Cyber green I) kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresanın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA 'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA 'ya bağlanan "cyber green" miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenmektedir.

PCR Arrayler, Real-Time PCR Master Mix ile çalışmaktadır. Bu mix SYBR Green ve / veya referans boyayı içermektedir.

3.8. Nükleer Morfoloji

3.8.1DNA fragmentasyonunun Belirlenmesi

Nükleer morfolojinin belirlenmesi amacıyla H9c2 hücreler 6 kuyucuklu well ve hücre slaytı kullanılarak kuyucuklara dağıtılmıştır. 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Hücreler kuyucukların tabanını tamamen kaplayınca bakteriyel toksinlerden difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu hücreler ile 24 saat 37 °C %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Süre sonunda Apo-BRDU yöntemi ve Hoechst boyama yöntemi kullanılmıştır.

Apoptozis'in belirlenmesinde son aşama DNA fragmentasyonunun belirlenmesidir. Bu amaçla Apo-BRDU yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Flow Sitometri ile değerlendirilmiştir.

Apoptotik cisimcikler ve nükleer morfolojinin belirlenmesi amacıyla Hoechst boyama yöntemi kullanılmıştır. Apoptozis'in kendine özgü DNA fragmentasyonunu göstermeye dayalı hücre boyama yöntemidir. Değerlendirilmesinde Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop kullanılmıştır.

3.9. İstatistiksel Analiz

Grafiklerin İstatistiksel Analizi'nde Student's t test kullanılmıştır. Değerlendirmelerin sonucunda $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

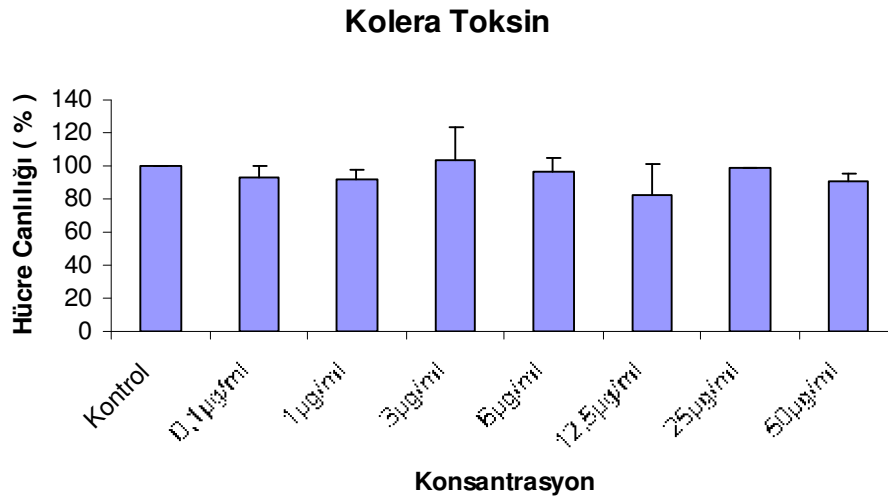
4.BULGULAR

Bakteriyel toksinlerden kolera toksin, difteri toksini, Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB), LPS (*E.coli* O55:B5) 'in kardiyak miyositler üzerine apoptotik etkisi çalışılmıştır. Bu amaçla in vitro (hücre kültürü) çalışma yapılmıştır.

4.1 Hücre Canlılığı (%)

4.1.1 Kolera toksininin H9c2 hücre canlılığı üzerine etkisi

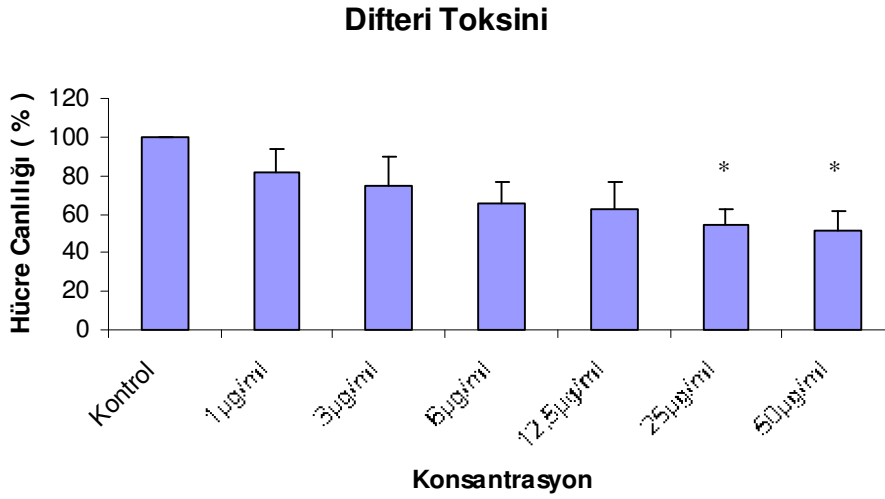
Bakteriyel toksinlerden kolera toksininin 0,1µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml, 6µg/ml, 12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml konsantrasyonları ile kontrol grubunun H9c2 hücre canlılığı üzerine etkisi arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Grafik1: Kolera toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri gösterilmiştir ($P > 0,05$)).



Grafik:1 Kolera toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri gösterilmiştir ($P > 0,05$).

4.1.2 Difteri toksininin H9c2 hücre canlılığı üzerine etkisi

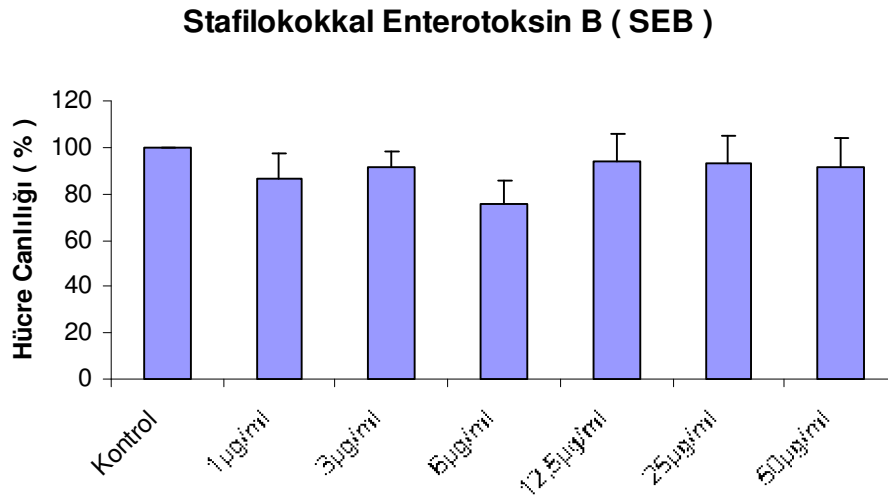
Bakteriyel toksinlerden difteri toksininin artan konsantrasyonlarda H9c2 hücre canlılığı üzerine etkisinin arttığı belirlenmiştir. Difteri toksininin artan konsantrasyonlarda H9c2 hücreleri üzerine canlılık (%) etkisinin istatistiksel olarak kontrol grubundan daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Grafik2: Difteri toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri gösterilmiştir (*P < 0,05)).



Grafik:2 Difteri toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri gösterilmiştir (* P < 0,05).

4.1.3 Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB) 'nin H9c2 hücre canlılığı üzerine etkisi

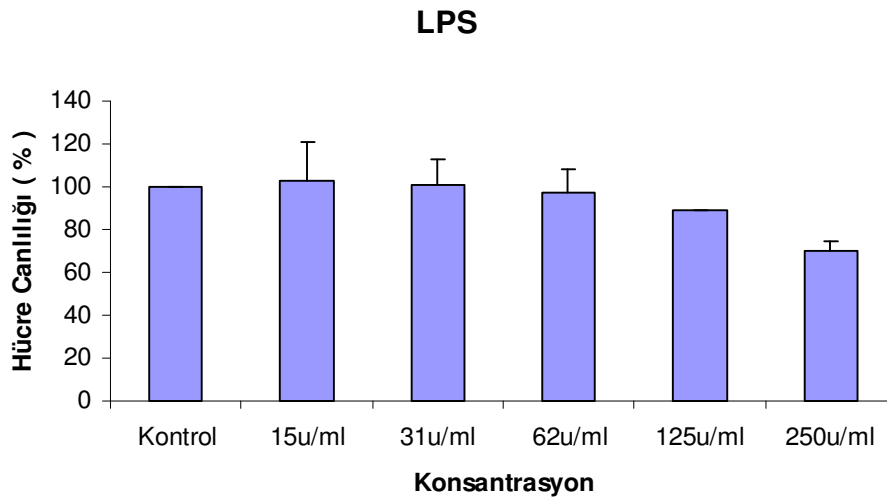
Bakteriyel toksinlerden Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB) 'nin 1µg/ml, 3µg/ml, 6µg/ml, 12,5µg/ml, 25µg/ml, 50µg/ml konsantrasyonları ile kontrol grubu nun H9c2 hücre canlılığı üzerine etkisi arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Grafik3: Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB) 'nin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri gösterilmiştir ($P > 0,05$)).



Grafik:3 Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB) 'nin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri gösterilmiştir ($P > 0,05$).

4.1.4 LPS (*E.coli* O55:B5)'in H9c2 hücre canlılığı üzerine etkisi

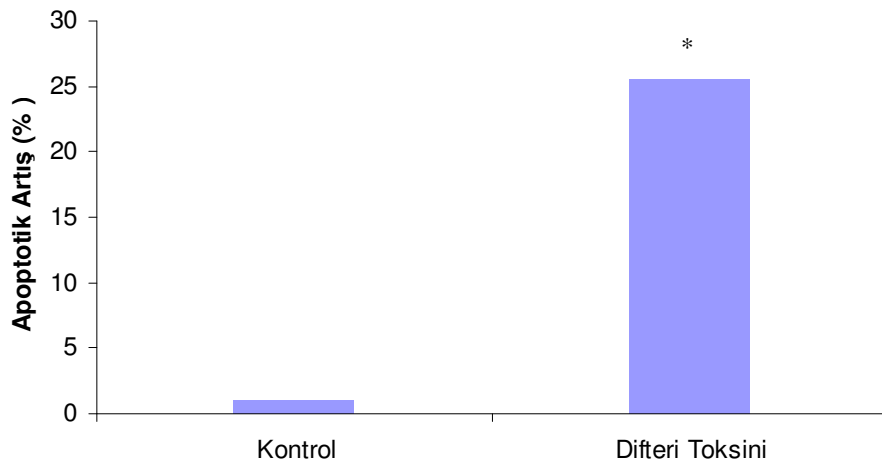
Bakteriyel toksinlerden LPS ın 15u/ml, 31u/ml, 62u/ml, 125u/ml, 250u/ml konsantrasyonları ile kontrol grubunun H9c2 hücre canlılığı üzerine etkisi arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (Grafik4: LPS (*E.coli* O55:B5)'in farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri gösterilmiştir ($P > 0,05$)).



Grafik:4 *E.coli* O55:B5 LPS ının farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin canlılık (%) değeri gösterilmiştir ($P > 0,05$).

4.2 Apoptozis Değeri (%)

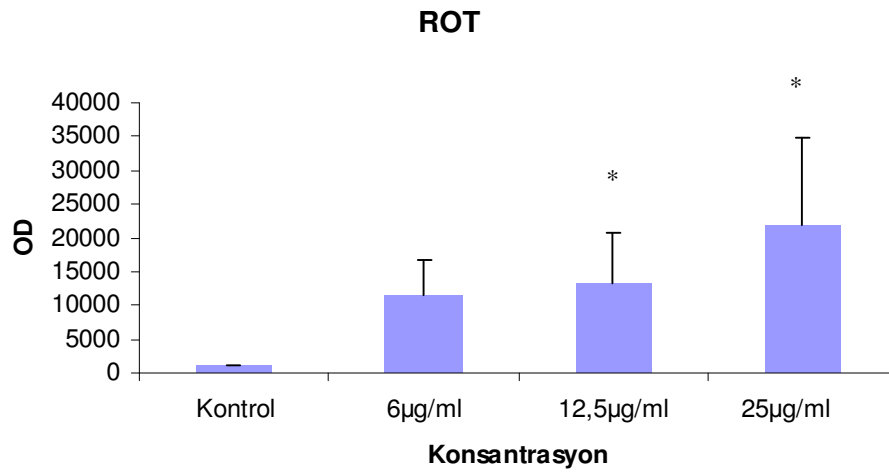
Bakteriyel toksinlerden difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonunun apoptotik hücre değeri (%) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik 5: Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Apoptotik Hücre Artışı (%) gösterilmiştir (*P < 0,05)).



Grafik:5 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Apoptotik Hücre Artışı (%) gösterilmiştir (* P < 0,05).

4.3 Reaktif Oksijen Türleri (ROT) salınımının belirlenmesi

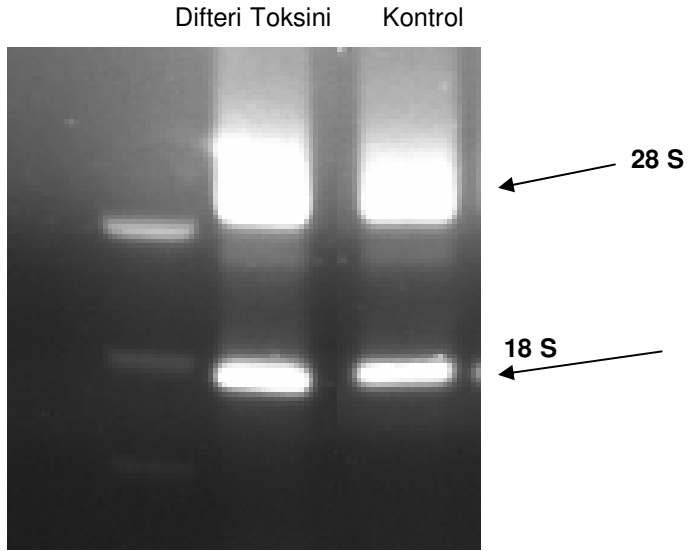
Bakteriyel toksinlerden difteri toksininin artan konsantrasyonlarda H9c2 hücrelerinden ROT salınımını arttırdığı belirlenmiştir. Difteri toksininin artan konsantrasyonları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik 6: Difteri toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin ROT (Reaktif Oksijen Türleri) salınımı gösterilmiştir (*P < 0,05)).



Grafik:6 Difteri toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin ROT (Reaktif Oksijen Türleri) salınımı gösterilmiştir (*P < 0,05).

4.4 Apoptozis Gen Aktivasyonunun Belirlenmesi

4.4.1 RNA izolasyonu



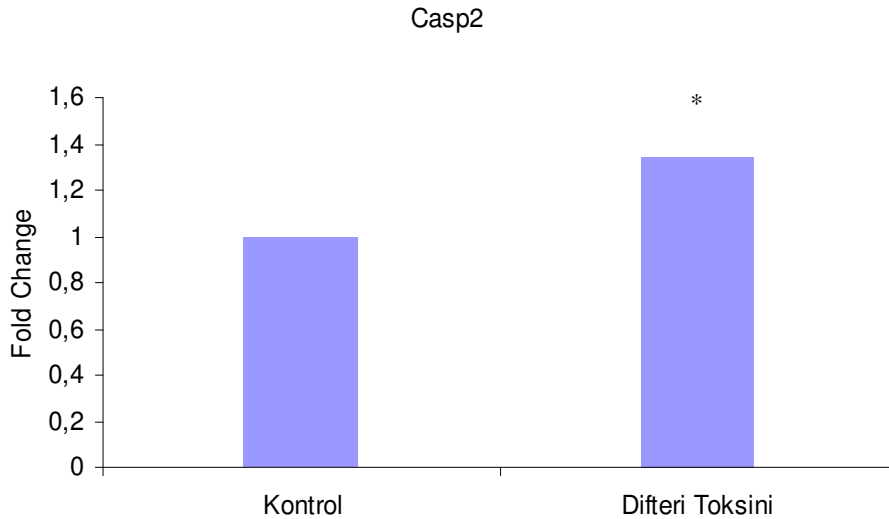
Resim:1 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin RNA İzolasyonu

4.4.2 Kaspaz Aktivitesinin Belirlenmesi

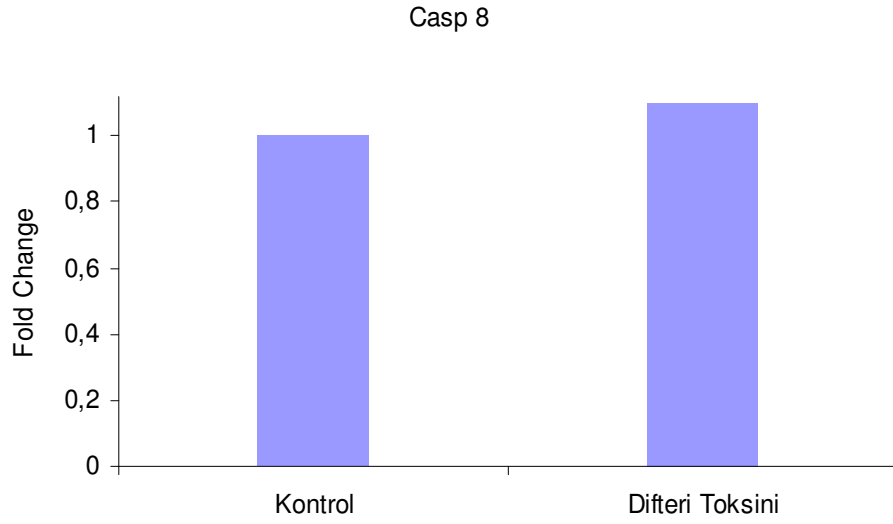
Kaspaz 2, Kaspaz 8, Kaspaz 9

Sinyal iletiminde rol alan ve cellat kaspazları aktive eden aktivasyon kaspazlarıdır. Sınıf I ya da Başlatıcı Kaspazlar olarak adlandırılmaktadır.

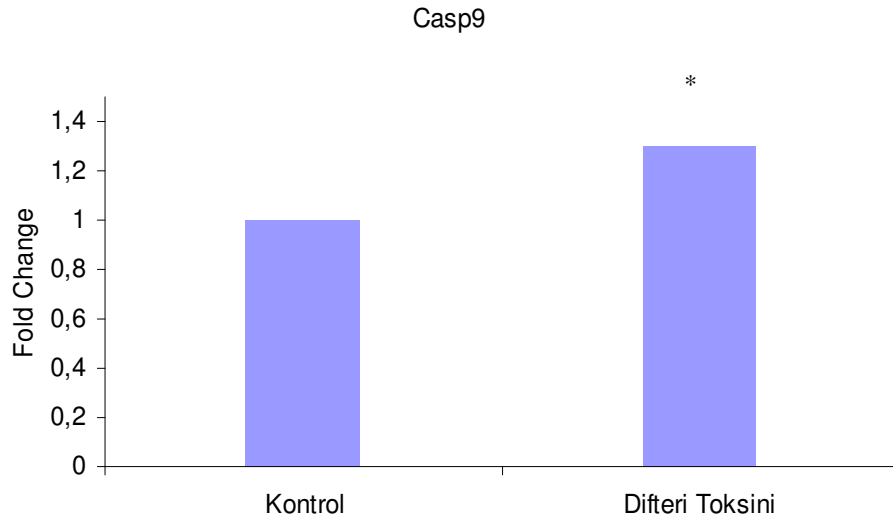
Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonunun H9c2 hücrelerinin Kaspaz 2, Kaspaz 9 mRNA seviyesi üzerine etkisi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik 7 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 2 mRNA seviyesi gösterilmiştir. Grafik 9 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 9 mRNA seviyesi gösterilmiştir (*P<0.05)). Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonunun H9c2 hücrelerinin Kaspaz 8 mRNA seviyesi üzerine etkisi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 8 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 8 mRNA seviyesi gösterilmiştir (p > 0,05)).



Grafik :7 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 2 mRNA seviyesi gösterilmiştir (* P < 0,05).



Grafik :8 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 8 mRNA seviyesi gösterilmiştir ($P > 0,05$).

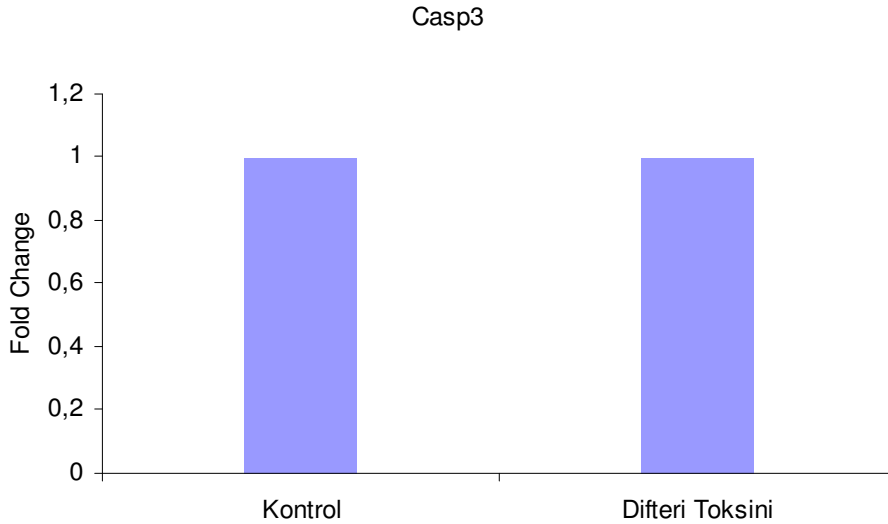


Grafik:9 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 9 mRNA seviyesi gösterilmiştir (* $P < 0,05$).

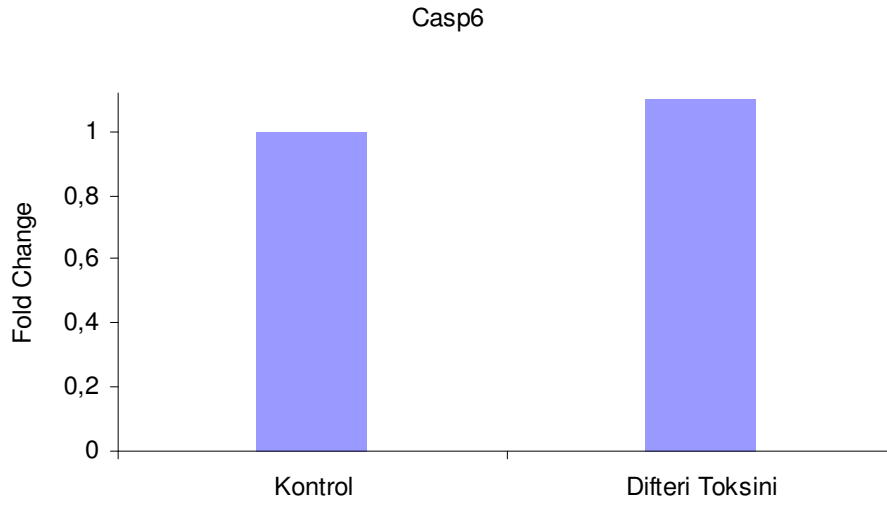
Kaspaz 3, Kaspaz 6, Kaspaz 7

Çeşitli hücrel proteinleri parçalayan, küçük bir bağlanma bölgesi olan cellat kaspazlardır. Sınıf II ya da Sonuçlandırıcı Kaspazlar olarak adlandırılmaktadır.

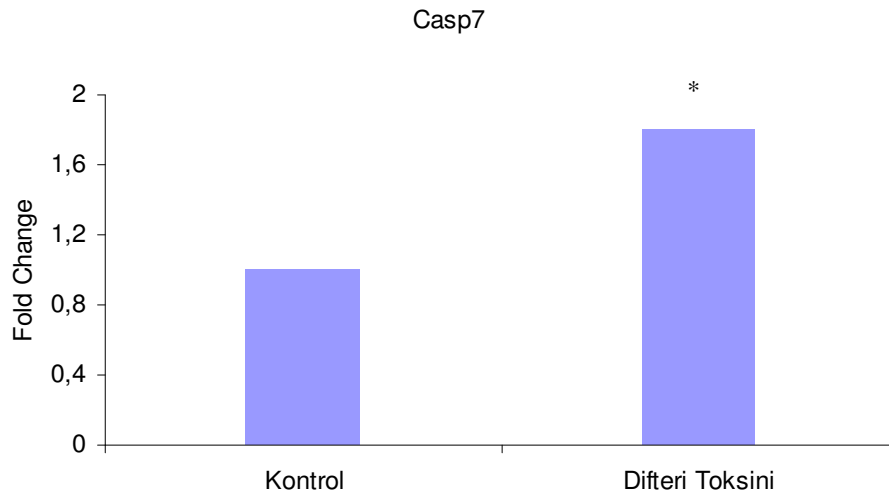
Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonunun H9c2 hücrelerinin Kaspaz 3, Kaspaz 6 mRNA seviyesi üzerine etkisi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 10 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 3 mRNA seviyesi gösterilmiştir. Grafik 11 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 6 mRNA seviyesi gösterilmiştir ($P > 0.05$)). Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu Kaspaz 7 mRNA seviyesinin belirlenmesinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik 12 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 7 mRNA seviyesi gösterilmiştir ($*P < 0,05$)).



Grafik:10 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 3 mRNA seviyesi gösterilmiştir ($P > 0,05$).



Grafik:11 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 6 mRNA seviyesi gösterilmiştir ($P > 0,05$).

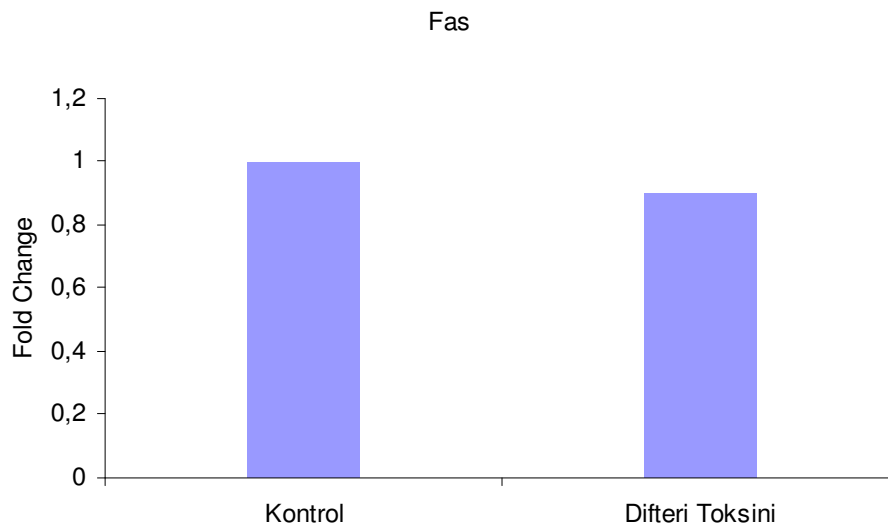


Grafik:12 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Kaspaz 7 mRNA seviyesi gösterilmiştir (* $P < 0,05$).

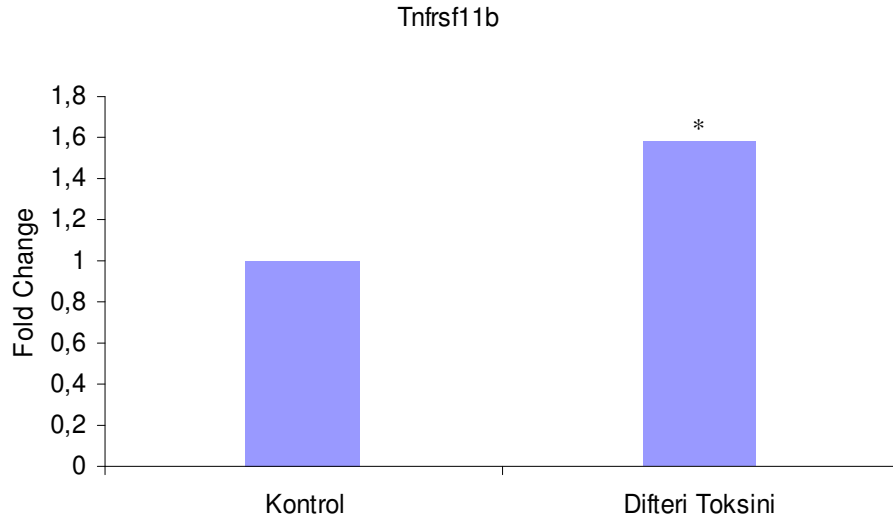
4.4.3 Apoptozis’de Önemli Olan Diğer Gen Aktivasyonlarının Belirlenmesi

TNF Reseptör Ailesi’nden Fas ve Tnfrsf11b Apoptozis’in dışı yol ile meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadırlar.

Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Fas mRNA seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 13 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Fas mRNA seviyesinin gösterilmesi ($P > 0,05$)). Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Tnfrsf11b mRNA seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik 14 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Tnfrsf11b mRNA seviyesinin gösterilmiştir (* $P < 0,05$)).



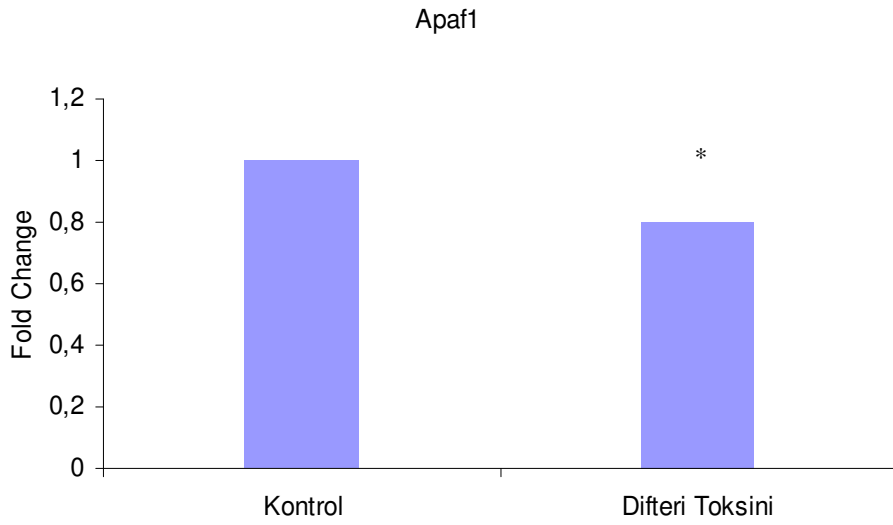
Grafik:13 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Fas mRNA seviyesinin gösterilmesi ($P > 0,05$).



Grafik:14 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Tnfrsf11b mRNA seviyesinin gösterilmesi (* $P < 0,05$).

Apaf1 Apoptozis'in iç yol ile meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır.

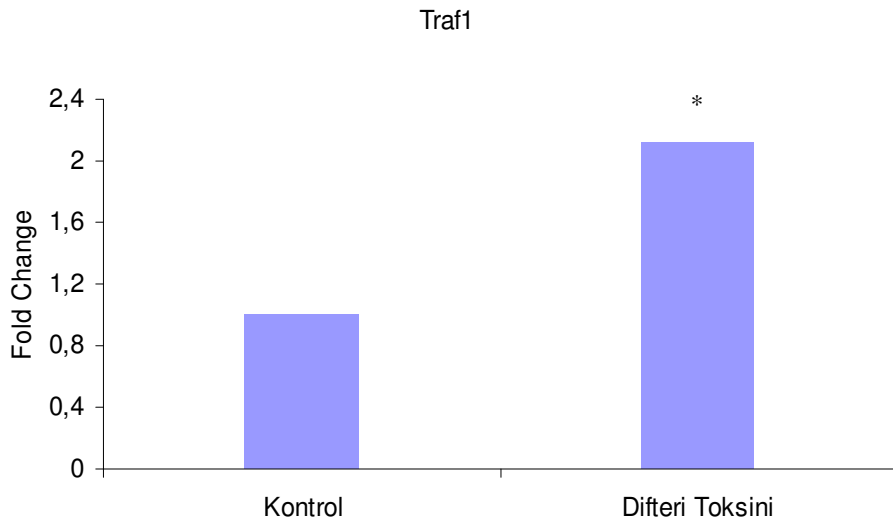
Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Apaf1 mRNA seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik 15 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Apaf1 mRNA seviyesi gösterilmiştir (* P < 0,05)).



Grafik:15 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Apaf1 mRNA seviyesinin gösterilmesi (* P < 0,05).

TRAF1 antiapoptotik etkiye sahiptir.

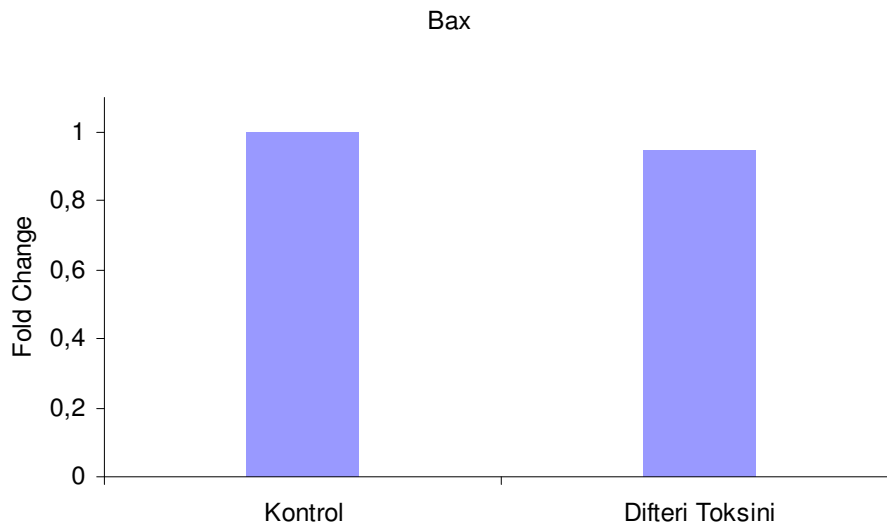
Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin TRAF1 mRNA seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik 16 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin TRAF1 mRNA seviyesi gösterilmiştir (* P < 0,05)).



Grafik:16 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Traf1 mRNA seviyesi gösterilmiştir (* P < 0,05).

Bax proapoptotik özelliktedir. Bax difteri toksininin yapısal olarak tam benzeridir.

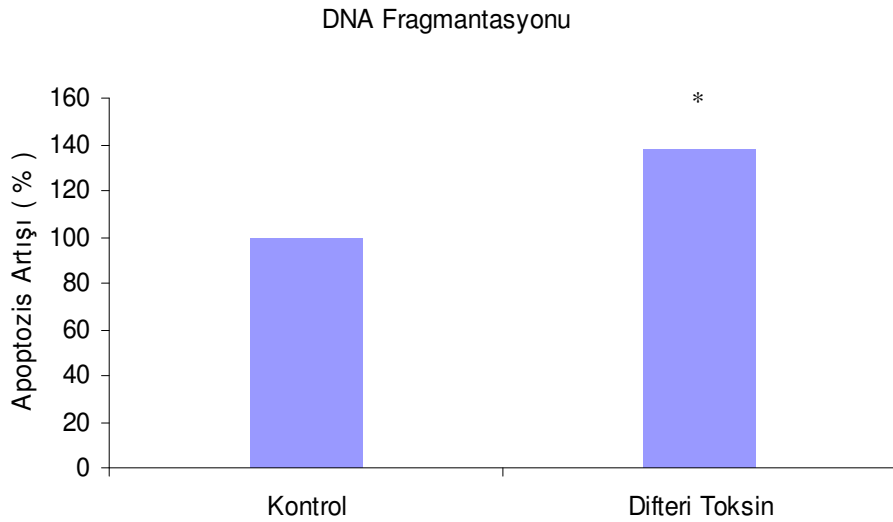
Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Bax mRNA seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Grafik 17 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Bax mRNA seviyesi gösterilmiştir ($P > 0,05$)).



Grafik:17 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin Bax mRNA seviyesi gösterilmiştir ($P > 0,05$).

4.5 DNA Fragmantasyonu

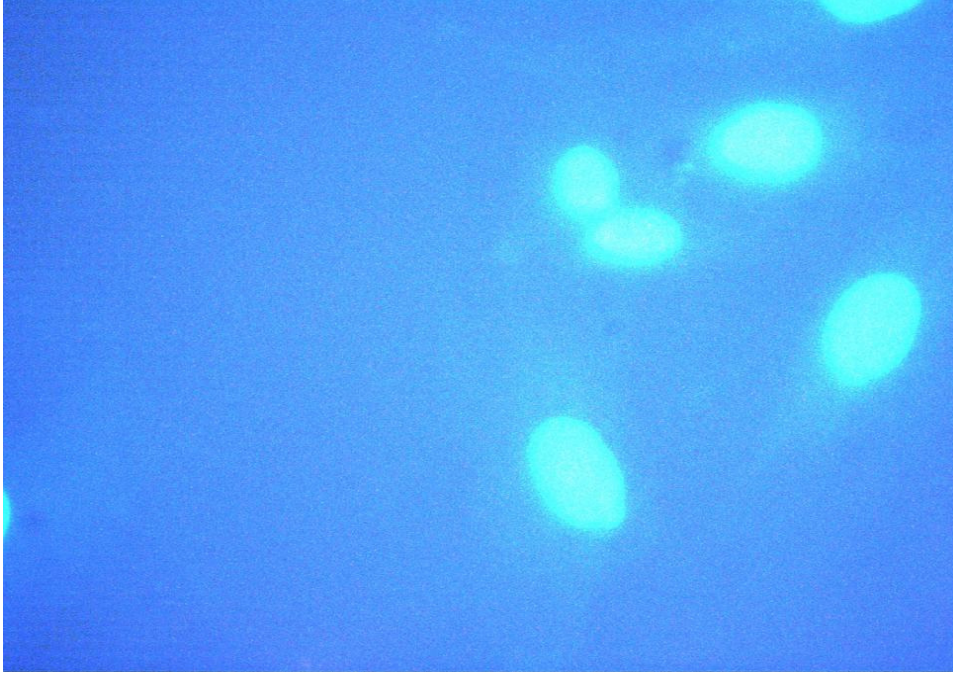
Bakteriyel toksinlerden difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin DNA fagmantasyonu / apoptozis artışı (%) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Grafik 18 : Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin DNA fragmantasyonu / apoptozis artışı (%) gösterilmiştir (*P < 0,05)).



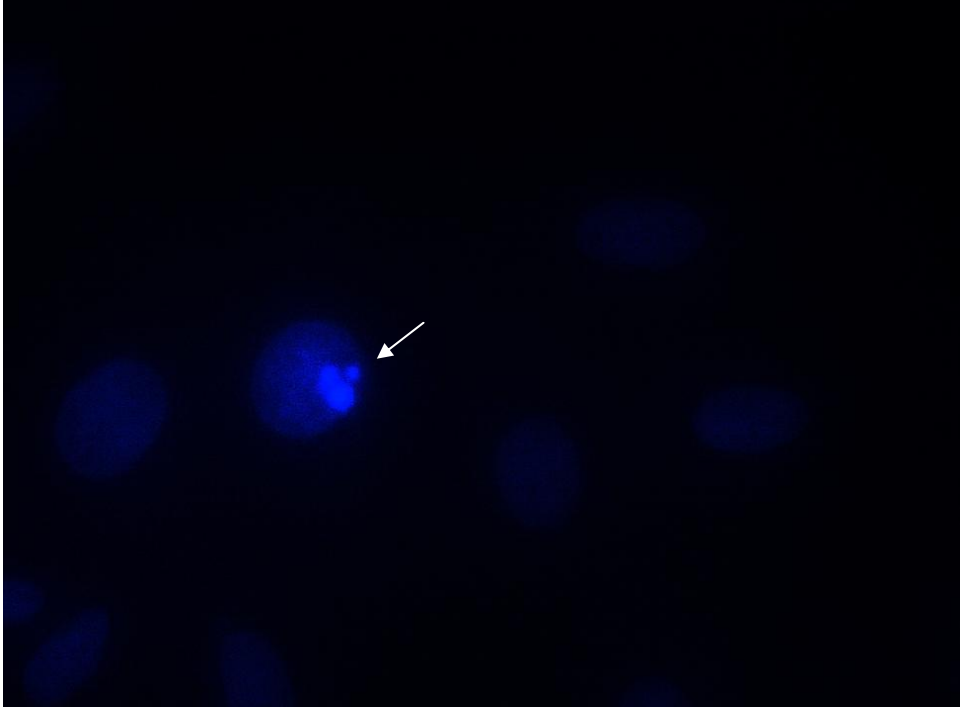
Grafik:18 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin DNA fragmantasyonu gösterilmiştir (* P < 0,05).

4.6 Nükleer Morfoloji

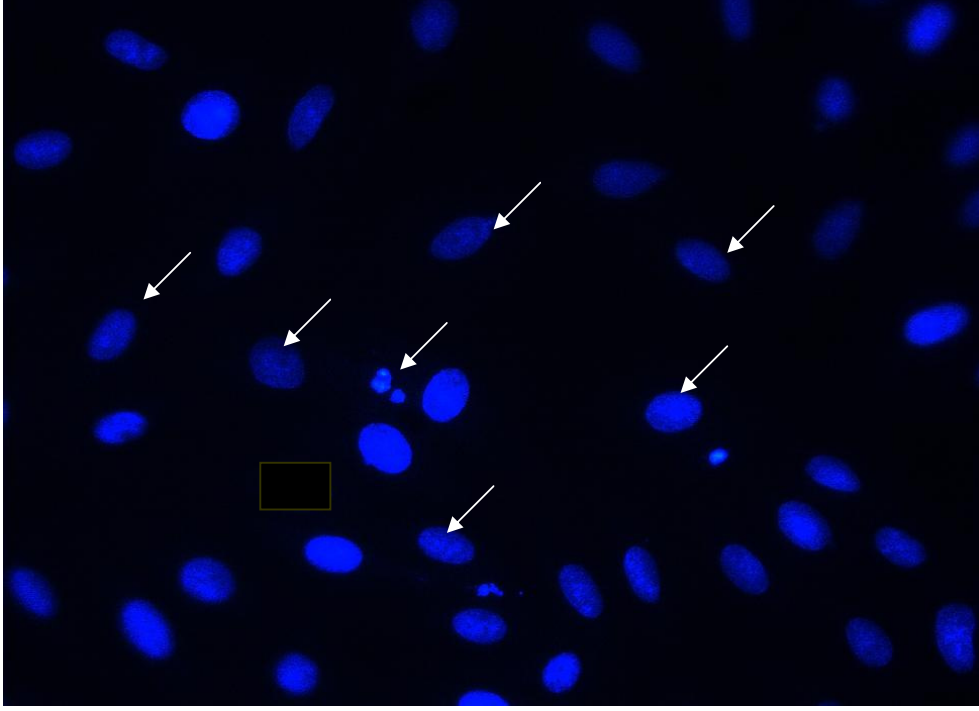
Apoptotik hücrenin nükleer morfolojisi Hoechst Dye yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. Resimlerde Apoptotik cisimcikler de görülmektedir.



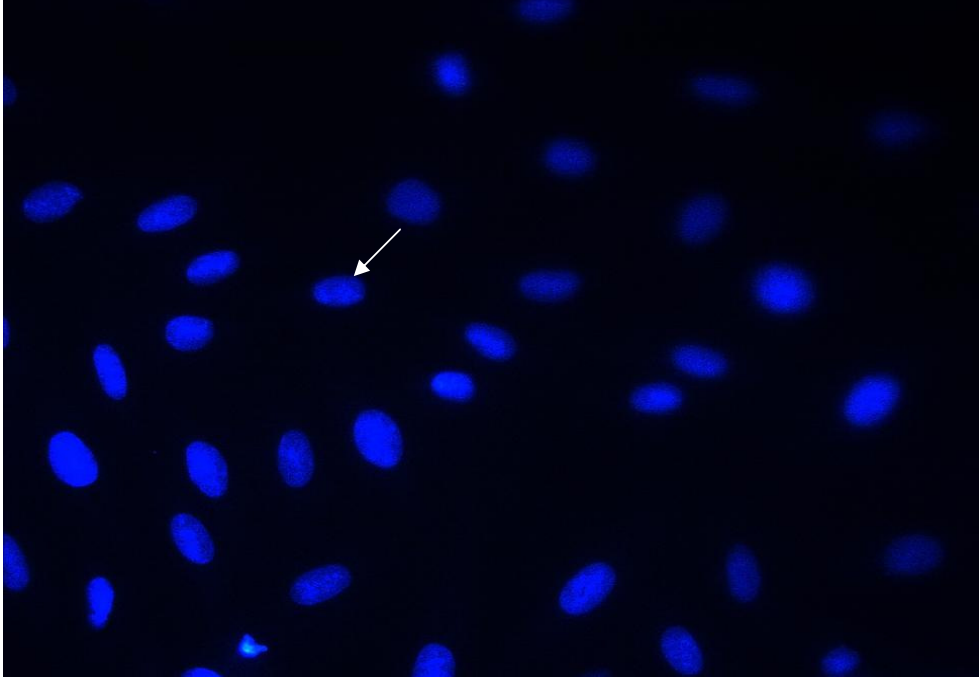
Resim:2 Toksin ile inkübe edilmemiş H9c2 hücrelerinin (Kontrol Grubu) nükleer morfolojisi gösterilmiştir.



Resim:3 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin nükleer morfolojisi gösterilmiştir. Resimde apoptotik cisimcikler görülmektedir.



Resim:4 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin nükleer morfolojisi gösterilmiştir.



Resim:5 Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilmiş H9c2 hücrelerinin nükleer morfolojisi gösterilmiştir.

5.TARTIŞMA

Bakteriyel toksinlerden bazıları apoptozis oluşumunu sağliyorken, bazıları apoptozis oluşumunu bloke etmektedir ^{2-6,12} .

Bu çalışmada bakteriyel toksinlerden kolera toksin, difteri toksini, Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB), LPS 'in rat embriyonik kardiyak miyositler (H9c2) üzerine apoptotik etkisi çalışılmıştır.

Kolera toksin, difteri toksini, Stafilokokkal Enterotoksin B, LPS 'in farklı konsantrasyonları rat embriyonik kardiyak miyositler (H9c2) ile 24h inkübe edilmiştir. 24 saat sonra bakteriyel toksinlerin H9c2 hücreleri üzerine sitotoksik değerinin belirlenmesi amacıyla MTT yöntemi uygulanmıştır. Difteri toksininin doz bağımlı olarak H9c2 hücre canlılığı üzerine etkili olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada LPS 'in PMCs (peritoneal mesothelial cells) üzerine apoptotik etkisi araştırılmıştır ⁶⁰ . Ikappa Balpha, nükleer faktör p65 yolunun bu apoptotik etkide rolü değerlendirilmiştir ⁶⁰ .

PMCs 'in apoptozisinin belirlenmesinde Hoechst 33258 flouresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Sitotoksiste değerlendirilmesinde MTT yöntemi, Nükleer Faktör p65 yolu aktivitesinin belirlenmesinde immunflouresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Western blot yöntemi ile Ikappa Balpha salınımı belirtilmiştir. TNF aktivitesi için L929 hücre kültürü, TNF α mRNA seviyesinin belirlenmesi amacıyla RT-PCR kullanılmıştır.

Yapılan bu çalışmada LPS'in, PMCs gelişimini inhibe ederek sitotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir⁶⁰. LPS doz ve süre bağımlı olarak PMCs 'den TNF α salınımını sağlamıştır⁶⁰. Bu durum apoptozisi tetiklemiştir. Bu olayda IkappaBalpha NF P65 yolunun önemli rol oynadığı belirtilmiştir ⁶⁰.

Bu çalışmanın sonucuna göre LPS (Lipopolisakkarit) peritoneal mesotelial hücreler üzerinde doz ve süre bağımlı olarak toksik etki göstermektedir ⁶⁰ . Fakat bizim yaptığımız çalışmada LPS 'in rat embriyonik kardiyak miyositler üzerine uygulanan farklı dozlarının etkinliğinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir. Her iki çalışmada da sitotoksiste MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

LPS 'in uygulandığı hücrede hücre canlılığı (%) üzerine etkisi hücre tipine göre değişiklik göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada Miyeloid leukemia hücreleri üzerine difteri füzyon toksin'inin apoptotik etkisi çalışılmıştır⁶¹. Miyeloid leukemia hücreleri'nin difteri toksini ile muamele edilmesinden sonra reseptör bağımsız FADD (Fas associated death domain) proteini vasıtasıyla apoptozis oluşumu gözlenmiştir ⁶¹.

Difteri füzyon toksin, DT388-GMCSF 1,5µg/ml U937 myeloid leukemia hücreler ile 7saat inkübe edilmiştir. DNA fragmentasyonu agaroz jel elektroforez yöntemi ile belirlenmiştir. Nükleer morfolojinin belirlenmesi için Hoescht 33258 boyama yöntemi kullanılmıştır.

Difteri füzyon toksini'nin, U937 (Myeloid leukemia) hücrelerinde kromatin bozulması, hücresel ve nükleer fragmentasyon meydana getirerek apoptozise yol açtığı gösterilmiştir ⁶¹. Kaspaz inhibitörleri kullanıldığında, apoptozisin önlendiği gözlenmiştir. Apoptozis başlangıç kaspazları olan Kaspaz 8 'i, Kaspaz 9 'u ve efektör Kaspaz 3 'ü aktive ettiği belirtilmiştir ⁶¹.

Kaspaz 8, DT388-GMCSF ile sağlanan apoptoziste önemli delil olarak belirtilmektedir. Kaspaz 8 FADD bağlı mekanizma ile aktive olmaktadır. FADD-DN (FADD negatif molekül) ile DT388-GMCSF ile sağlanan apoptozisin önlendiği gözlenmiştir ⁶¹.

FADD bağlı apoptozisin ölüm reseptörlerinin Fas, TNF-1 veya TNFR içermediği belirtilmiştir. Çünkü, yapılan deneysel çalışmalarda bu reseptörlerin inhibitörlerinin uygulanmasıyla DT388-GMCSF'in tetiklediği apoptozisin önlenmediği gözlenmiştir.

U937 Myeloid Leukemia hücreleri'nde DT388-GMCSF reseptör bağımsız FADD ilişkili apoptozis oluşumunu sağlıyor sonucuna varılmıştır ⁶¹.

Ayrıca bu çalışmanın sonuç bölümünde DT388-GMCSF, AML (Akut Myeloid Leukemia) ve diğer kanserler için yeni tedavi modeli olabilir denilmektedir ⁶¹.

Difteri toksini 388-GMCSF 'in, U937 Myeloid Leukemia hücreler üzerine apoptotik etkisinde Kaspaz 3, Kaspaz 8, Kaspaz 9 'un aktive olduğu ve apoptotik etkide bu aktivasyonun önemli olduğu belirtilmiştir ⁶¹.

Çalışmamızda difteri toksininin H9c2 (rat embriyonik kardiyak miyositler) hücreler üzerine apoptotik etkisinde Kaspaz 2, Kaspaz 9, Kaspaz 7 mRNA

seviyesi aktive olmakta Kaspaz 8, Kaspaz 3, Kaspaz 6 mRNA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı fark göstermemektedir.

Apoptozis 'in son aşaması DNA fragmentasyonu yapılan çalışmalarla benzer sonuçları içermektedir. Nükleer morfolojinin belirlenmesinde Hoechst Dye yöntemi yapılan çalışmalarda da kullanılmıştır.

Apoptozis 'in belirlenmesinde tüm çalışmalarda aynı yol izlenmiştir. Uygulanan yöntemler de aynıdır.

Difteri toksininin uygulandığı hücre, uygulanan doz, uygulama süresi Apoptozis 'in oluşum yolu üzerinde farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalarda da bizim çalışmamızda da asıl üzerinde durulan bu noktadır.

6.SONUÇ

Bakteriyel toksinlerden kolera toksin, Stafilokokkal Enterotoksin B (SEB), LPS 'in farklı konsantrasyonlarının H9c2 hücreler üzerine sitotoksik etkisi kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır.

Bakteriyel toksinlerden difteri toksininin artan konsantrasyonlarda H9c2 hücreler üzerine sitotoksik etkili olduğu ve uygulanan en yüksek konsantrasyon olan 50µg/ml konsantrasyonun canlılık değeri (%) üzerine en etkin konsantrasyon olduğu belirlenmiştir. Anneksin V yöntemi uygulanarak bu sitotoksik etkinin Apoptozis ile meydana geldiği belirlenmiştir.

Difteri toksininin rat embriyonik kardiyak miyositler üzerine apoptotik etkisinin bu hücrelerde spontan olarak meydana gelen apoptozis'i arttırıcı yönde olduğu gözlenmiştir. Apoptotik artış'ın meydana gelmesinde rol alan faktörlerin belirlenmesine çalışılmıştır.

Difteri toksininin artan konsantrasyonlarında Reaktif Oksijen Türleri'nin salınımının da arttığı belirlenmiştir. Apoptotik artışta ROT salınımının doz bağımlı artışının önemine dikkat çekilmiştir.

Sonuç olarak difteri toksini artan konsantrasyonlarda rat embriyonik kardiyak miyositler üzerine apoptotik etki göstermektedir. Bu apoptotik etkinin meydana gelmesinde reaktif oksijen türlerinin etkinliği söz konusudur.

Difteri toksininin H9c2 hücrelerinde Kaspaz 2, Kaspaz 9, Kaspaz 7 mRNA seviyelerini arttırdığı belirlenmiştir. Kaspaz 2 ve Kaspaz 9 sınıf I (başlatıcı kaspazlar) olarak adlandırılmaktadır. Kaspaz 7 sınıf II (sonuçlandırıcı kaspazlar) olarak adlandırılmaktadır.

Sonuç olarak ; Difteri toksininin H9c2 hücrelerinde apoptotik etkisinde Kaspaz aktivitesi önemlidir.

TNF Reseptör Ailesi'nden Tnfrsf11b'nin mRNA seviyesinde artış belirlenmiştir. Bu artış kontrol grubuna göre anlamlı olarak kabul edilmiştir. Apoptozis'in oluşumunda dış (ekstrensek) yol'da önemi olan TNF Reseptör Ailesi Kaspaz 8 aktivitesini de içermektedir. Çalışmamızda Kaspaz 8 mRNA seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır.

TNF Reseptör Ailesi'nden Fas mRNA seviyesi de kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır.

Apaf1 Apoptozis oluşumunda iç (intrensek) yol' da önemlidir. Apaf1 mRNA seviyesindeki azalış kontrol grubuna göre anlamlıdır. Kaspaz 9 iç (intrensek) yol'da önemi olan kaspazdır. Kaspaz 9 mRNA seviyesindeki artış kontrol grubuna göre anlamlıdır. Önemli olan nokta şudur : Apaf1 üzerinden apoptotik etkide azalma Kaspaz 9 üzerinden Apoptotik etkide artma söz konusudur.

Difteri toksininin antiapoptotik etkiye sahip Traf1 mRNA seviyesindeki artışı kontrol grubuna göre anlamlıdır. Difteri toksini bu gen üzerinden antiapoptotik etki göstermektedir.

Sonuç olarak difteri toksini doz bağımlı olarak H9c2 (rat embriyonik kardiyak miyositler) üzerine apoptotik etkiyi arttırıcı ve inhibe edici olmak üzere iki farklı şekilde etki etmektedir.

Difteri toksininin rat embriyonik kardiyak miyositler üzerine olan bu apoptotik etkisinde reaktif oksijen türleri, kaspaz aktivitesi ve Apoptozis'de önemli olan diğer gen aktivasyonları önemli bulunmuştur.

Böylece difteri toksininin kalp kası hücresi üzerine olan apoptotik etkisi, belirlenen apoptotik gen aktivasyonları dikkate alınarak kontrol altında tutulabilecektir.

ÖZET

Anahtar Kelimeler:

Apoptozis, Kolera toksin, Difteri toksini, Stafilokokkal Enterotoksin B, E.coli LPS, rat embriyonik kardiyak miyositler (H9c2), canlılık, Reaktif Oksijen Türleri (ROT), Kaspaz, DNA fragmentasyonu, MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide), Flow Sitometri, DCF (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate), RT-PCR, Apo-BRDU, Hoechst Dye

BAKTERİYEL TOKSİNLERİN KARDİYAK MİYOSİTLER ÜZERİNE APOPTOTİK ETKİSİ

Bakteriyel toksinlerden kolera toksin, difteri toksini, Stafilokokkal Enterotoksin B, Lipopolisakkarit 'in farklı konsantrasyonları 24h rat embriyonik kardiyak miyositler (H9c2) ile inkübe edilmiştir. Bakteriyel toksinlerin sitotoksik etkisi, hücre canlılığı (%)'nın belirlenebilmesi için MTT yöntemi ile analiz edilmiştir.

Kolera toksin, Stafilokokkal Enterotoksin B, Lipopolisakkarit 'in H9c2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır. Difteri toksininin H9c2 hücrelerinin canlılığı üzerine etkisinin doz bağımlı olduğu belirlenmiştir. Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu H9c2 hücrelerinin canlılık değeri (%) değerlendirilmesinde kontrol grubuna göre anlamlı bulunmuştur.

Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilen H9c2 hücrelerinde Flow Sitometri yöntemi ile Apoptotik Hücre Artışı (%), difteri toksininin farklı konsantrasyonları ile 24h inkübe edilen H9c2 hücrelerinde DCF yöntemi ile reaktif oksijen türleri salınımı, difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 5h inkübe edilen H9c2 hücrelerinde RT-PCR yöntemi ile Kaspaz 2, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Kaspaz 3, Kaspaz 6, Kaspaz7, Fas, Tnfrsf11b, Apaf1, Traf1, Bax mRNA seviyeleri belirlenmiştir. Difteri toksininin 50µg/ml konsantrasyonu ile 24h inkübe edilen H9c2 hücrelerinde Apo BRDU yöntemi ile internükleozomal DNA fragmentasyonu, nüklear morfolojinin belirlenmesi amacıyla Hoechst Dye yöntemi kullanılmıştır.

Difteri toksininin sitotoksik etkisinin hücrelerde meydana gelen apoptotik etkiden kaynaklandığı apoptotik hücre artışı (%) değeri ile belirlenmiştir.

Difteri toksininin H9c2 (rat embriyonik kardiyak miyositler) üzerine apoptotik etkisinde Kaspaz 2, Kaspaz 9, Kaspaz 7 mRNA seviyesi aktive olmakta Kaspaz 8, Kaspaz 3, Kaspaz 6 mRNAseviyesi değişmemektedir. Apoptotik etkide kaspaz aktivitesi önemlidir.

Apoptotik yolda rol alan diğer gen aktivasyonları değerlendirildiğinde Tnfrsf11b , Traf1 mRNA seviyesi aktive olmaktadır. Apaf1 mRNA seviyesi azalmaktadır.

Sonuç olarak ; difteri toksini H9c2 hücreler üzerinde apoptotik etki oluşturmaktadır. Bu etki apoptozisi indükleme ve inhibe etme olmak üzere iki farklı şekilde meydana gelmektedir.

SUMMARY

Key Words:

Apoptosis, Cholerae toxin, Diphtheriae toxin, Staphylococcus Enterotoxin B, LPS (Lipopolysaccharide), rat embryonic cardiac myocytes (H9c2), viability, Reactive Oxygen Species (ROS), Caspase (Apoptosis-related cysteine peptidase), DNA fragmentation, MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide), Flow Cytometry, DCF (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate), RT-PCR, Apo-BRDU, Hoechst Dye

APOPTOTIC EFFECT OF BACTERIAL TOXINS ON CARDIAC MYOCYTES

Rat embryonic cardiac myocytes (H9c2) were incubated with different concentrations of bacterial toxins, such as cholerae toxin, diphtheriae toxin, Staphylococcus Enterotoxin B, Lipopolysaccharide for 24hs. The cytotoxic effect of bacterial toxins was analysed by MTT assay for the percentage of cell viability.

There was no statistical significance for the effects of cholerae toxin, Staphylococcus Enterotoxin B, Lipopolysaccharide on viability in H9c2 cells. The effect of Diphtheriae toxin on the viability of H9c2 cells was dose-dependent. Diphtheriae toxin in the concentration of 50µg/ml affected the percentage of viability in H9c2 cells significantly.

H9c2 cells were incubated with Diphtheriae toxin in the concentration of 50µg/ml for 24hs. The percentage of apoptotic cells were analysed by Flow Cytometry. H9c2 cells were incubated with different concentrations of diphtheriae toxin for 24hs. Production of Reactive Oxygen Species were analysed by DCF assay. H9c2 cells were incubated with diphtheriae toxin in the concentration of 50µg/ml for 5hs. mRNA levels of Caspase 2, Caspase 8, Caspase 9 , Caspase 3, Caspase 6, Caspase 7, Fas, Tnfrsf11b, Apaf1, Traf1, Bax were analysed by RT-PCR . H9c2 cells were incubated with diphtheriae toxin in the concentration of 50µg/ml for 24hs. Internucleosomal DNA fragmentation, which is known as terminal stage of Apoptosis, was analysed by Apo-BRDU assay, nuclear morphology was analysed by Hoechst Dye assay.

According to the percentage of Apoptotic cells, the cytotoxic effect of Diphtheriae toxin on H9c2 cells results from apoptotic effect of toxin itself.

Diphtheriae toxin increased production of ROS in a dose-dependent manner and increased mRNA levels of Caspase 2, Caspase 9, Caspase 7, Tnfrsf11b, Traf1 in H9c2 cells. Diphtheriae toxin decreased mRNA levels of Apaf1 in H9c2 cells.

In conclusion; Diphtheriae toxin increased apoptotic effect through dose-dependent production of ROS and increased apoptotic effect by augmentation of mRNA levels of Caspase 2, Caspase 9, Caspase 7 in H9c2 cells. Diphtheriae toxin decreased Apoptotic effect by reducing of mRNA levels of Apaf1, Traf1 in H9c2 cells.

KAYNAKLAR

1. Cummings, M.C., Winterfold, C.M., Walker N.I., Apoptosis. Am.J.Surg. Pathol. 1997;21:88-101
2. Arab, S., Rutka, J. and Lingwood, C.A., Verotoxin induces apoptosis and the complete, rapid, long-term, elimination, of human astrocytoma xenografts in nude mice. Oncology Res. 1999;11:33-39
3. Jones, N.L., Islur, A., Haq, R., Mascarenhas, M., Karmali, M.A., Perdue , M.H., Zanke, B.W. and Sherman, P.M. *Escherichia coli* shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. Am.J.Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2000;278: G811-G819.
4. Ito, K., Takaishi, H., Jin Y., Song, F., Denning , T.L. and Ernst, P.B. Staphylococcal Enterotoxin B stimulates expansion of autoreactive responses by IL-10. J.Immunol. 2000;164: 2994-3001.
5. Hsu, L.J., Jan, M.S. and Lin, Y.S. In vivo Staphylococcal Enterotoxin B (SEB)-primed murine splenocytes secrete mediators which suppress CD25 (hi) expression and cell cycle progression of naive splenocytes in response to SEB in vitro. Cell Immunol. 2000;201: 50-57
6. Finlay, B.B. and Cossart , P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. Science 1997;276: 718-725
7. Chang, M.P., Bramhall, J., Graves, S., Bonavida , B. and Wisnieski , B.J. Internucleosomal DNA cleavage precedes diphtheriae toxin –induced cytolysis: evidence that cell lysis is not a simple consequence of translation inhibition. J.Biol.Chem.1989;264: 15261-15267.
8. Wisnieski, B.J., Amini , S.M. and Tseng, Y. Characterization of the deoxyribonuclease and ADP–ribosyltransferase activities of CRM45, atruncated homologue of diphtheriae toxin. J.Nat.Toxins 1998;3:255-267
9. Menzies, B.E. and Kourteva, I. *Staphylococcus aureus* alpha-toxin induces apoptosis in endothelial cells. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2000;29:39-45

10. Subauste, M.C., Von Herrath, M., Benard, V., Chamberlain, C.E., Chuang, T., Chu, K., Bokoch, G.M. and Hahn, K.M. Rho family proteins modulate rapid apoptosis induced by cytotoxic T lymphocytes and fas. *J.Biol.Chem.* 2000;275: 9725-9733
11. Buquet, P. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. 2nd ed.New York:Academic Press 1999;
12. Liu, J., Akahoshi, T., Sasahana, T., Kitasato, H., Namai, R., Sasaki, T., Inoue, M. And Kondo, H. Inhibition of neutrophil apoptosis by verotoxin 2 derived from *Escherichia coli* 0157:H7. *Infect. Immun.* 1999;67: 6203-6205
13. Vereker, E., Campbell, V., Roche, E., McEntee, E. and Lynch, M.A. Lipopolysaccharide inhibits long term potentiation in the rat dentate gyrus by activating caspase -1. *J.Biol.Chem.*2000;275:26252-26258
14. Tsuji , T., Asano, Y., Handa, T., Honma, Y., Ichinose, Y. and Yokochi, T. Induction of apoptosis in lymphoid tissues of mice after intramuscular injection of enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin. *Immunobiology* 2000;201:377-390
15. KaneAB. Redefining apoptosis. *Am J. Pathol.* 1995; 146:1-2
16. Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J. Pathol.*1995;146:16-9
17. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis An overview of cell death. *Am J. Pathol.* 1995;146:3-5
18. Kerr JFR, Winterfold CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013-26
19. Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissue: An overview. *Cancer Metastas Rev.* 1992;11:95-103
20. Mason RP. Effects of calcium channel blockers on cellular apoptosis. Implications for carcinogenic potential. *Cancer* 1999;85:2093-102
21. Conroy LA, Alexander DR. The role of intracellular signalling pathways regulating thymocyte and leukemic T cell apoptosis. *Leukemia* 1996;10:1422-35
22. Carson DA, Riberio JM. Apoptosis and disease. *Lancet* 1993;341:1251-4

23. Homburg CHE, Roos D. Apoptosis of neutrophils. *Curr.Opin.Hematol.* 1996;3;94-9
24. Giles KM, Hart SP, Haslet C, Rossi A, Dransfield I. An appetite for apoptotic cells: controversies and challenges. *BrJ.Haematol.* 2000;109:1-12
25. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: Integration of genetic, biochemical, and cellular indicators. *J. Natl Cancer Inst.* 1994;86:1286-96
26. Owens GP, Cohen JJ. Identification of genes involved in programmed cell death. *Cancer Metastas Rev.* 1992;11:149-56
27. Gren DR, Martin SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr.Opin.Immunol.* 1995;7:694-703
28. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J. Med.* 1996;334:1717-25
29. Nagata S. Fas mediated apoptosis. In: Gorin N, Foa R, Mannucci PM (eds). 'Education Programme 1996 - Meet the Expert Sessions of the 2nd Meeting of the European Haematology Association, 29 May-1 June, Paris, France' Blackwell Science Ltd, Glasgow, 1996:61-2
30. Porter AG. Protein translocation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 1999;9:394-401
31. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J.Clin.Oncol.* 1999;17(9):2941-53
32. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 2001;11(9):372-7
33. Ivy SP, Lugo TG, Bernstein ML, Smith MA. Evolving molecular and targeted therapies. In: Pizzo PA, Poplack DG (eds): *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Fourth edition, Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002; pp309-49
34. Reed JC. Apoptosis and chemoresistance. In: Pui CH (ed): *Childhood Leukemias*. Cambridge University Press, Cambridge, 1999; pp255-65

35. Lucci A, Han TY, Liu YY, Giuliano AE, Cabot MC. Multidrug resistance modulators and doxorubicin synergize to elevate ceramide levels and elicit apoptosis in drug-resistant cancer cells. *Cancer* 1999;86:300-11
36. Fennell DA, Cotter FE. Controlling the mitochondrial gatekeeper for effective chemotherapy. *Br J Haematol.* 2000;111:52-60
37. Costantini P, Jacotot E, Decaudin D, Kroemer G. Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:1042-53
38. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000;10:369-77
39. Reed JC. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 1999;17(9):2941-53
40. Stewart BW. Mechanisms of apoptosis: Integration of genetic, biochemical and cellular indicators. *J Natl Cancer Inst.* 1994;86:1286-96
41. McCubrey JA, May WS, Duronio V, Mufson A. Serine/threonine phosphorylation in cytokine signal transduction. *Leukemia* 2000;14:9-21
42. Gren DR, Martin SJ. The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy. *Curr. Opin. Immunol.* 1995;7:694-703
43. Thiele CJ, Kastan MB. Biology of childhood cancer In: Pizzo PA, Poplack DG (eds): *Principles and Practice of Pediatric Oncology*. Fourth edition, Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002; pp89-119
44. Nagata S. Fas mediated apoptosis In: Gorin N, Foa R, Mannucci PM (eds). 'Education Programme 1996-Meet the Expert Sessions of the 2nd Meeting of the European Haematology Association, 29 May-1 June, Paris, France' Blackwell Science Ltd, Glasgow, 1996:61-2
45. Wei MC, Lindsten T, et al. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes and development* 2000; 14: 2060-2071
46. Rosse T, Oliver R, Money L, Rager M, et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 1998;391:496-9

47. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, Choi AM. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Jan;9(1):49-89
48. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 2007 May; 12(5):913-22
49. Apoptosis.Cummings MC, Winterfold CM, Walker NI. *Am.J.Surg.Pathol*. 1997;21:88-101.
50. Gren DR, Martin SJ.The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy . *Curr. Opin.Immunol*.1995;7:694-703.
51. Seminara AR. Ruvolo PP. Murad F. LPS / IFNgamma-induced RAW 264.7 apoptosis is regulated by both nitric oxide-dependent and independent pathways involving JNK and the Bcl-2 family, *Cell Cycle* 2007;15;6 (14):1772-8.
52. Lewkowicz P, Lewkowicz N, Sasiak A, Tchorzewski H. Lipopolysaccharide- Activated CD4+ CD25+ T Regulatory Cells Inhibit Neutrophil Function and Promote Their Apoptosis and Death, *The Journal of Immunology* 2006;177(10):7155-7163.
53. Islam S, Hassan F,Tumurkhuu G,Ito H, et al. Lipopolysaccharide prevents apoptosis induced by brefeldin A , an endoplasmic reticulum stres agent, in RAW 264.7 cells, *Biochem*. 2006;129;1306-1318.
54. Kuwabara T. Imajoh-Ohmi S. LPS-induced apoptosis is dependent upon mitochondrial dysfunction, *Apoptosis* 2004: 9; 467-474.
55. Mica L, Harter L, Trentz O, Keel M. Endotoxin reduced CD95-induced neutrophil apoptosis by cIAP-2-mediated caspase-3 degradation, *J.Am. Coll. Surg*. 2004;199:595-602.
56. Barbara S, Kourteva I, et al. *Staphylococcus aureus* α -toxin induced apoptosis in endothelial cells, *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2000;29;39-45.
57. Blomgran R, Zheng L, Stendahl O, Uropathogenic *Escherichia coli* Triggers Oxygen-Dependent Apoptosis in Human Neutrophils through the

- Cooperative Effect of Type 1 Fimbriae and Lipopolysaccharide, *Infection and Immunity* 2004;72;4570-4578.
58. Tsuji T, Asano Y, Honma Y, Ichinose Y, Yokochi T. Induction of apoptosis in lymphoid tissues of mice after intramuscular injection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Enterotoxin, *Immunobiology* 2000: 201(3); 377-390.
 59. Jones NL, Haq R, Mascarenhas M, et al. *Escherichia coli* shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family *Pediatric Research* 2000;47(5);573-
 60. Li ZM, Ma JF, Wang LN, Lipopolysaccharide influenced peritoneal mesothelial cells on the growth and expression of tumor necrosis factor through nuclear factor kappaB pathway, *Gut* 2006;55; 1801-1808.
 61. Thorburn J, Thorburn A, et al. Apoptosis by Leukemia Cell-targeted Diphtheriae toxin Occurs via Receptor-independent activation of Fas-associated Death Domain Protein, *Clin.Cancer Res.* 2003;9;861-5.

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında emeği geçen değerli danışman hocam sayın Prof.Dr.Turgut İMİR'e, bu çalışmanın planlanması ve yapılmasında emeği geçen değerli hocam sayın Doç.Dr.E.Ümit BAĞRIAÇIK'a, doktora çalışma sürecimde bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım sayın Prof.Dr.Nedim SULTAN'a, sayın Prof.Dr.Semra KUŞTİMUR'a, sayın Prof.Dr.Seyyal ROTA'ya, sayın Doç.Dr.Meltem YALINAY ÇIRAK'a, sayın Doç.Dr.Kayhan ÇAĞLAR'a, sayın Doç.Dr.Ayşe KALKANCI'ya, sayın Doç.Dr.Gülendam BOZDAYI'ya, sayın Doç.Dr.Işıl FİDAN'a, sayın Yrd.Doç.Dr.Funda DOĞRUMAN AL'a, sayın Uzm.Dr.Doruk ENGİN'e ve doktora eğitimim süresince birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma, zor günlerimde hep yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı : Sultan

Soyadı: YOLBAKAN

Doğum Yeri ve Tarihi: 06.09.1975 Ankara

Eğitimi: 2006-... Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Araştırma Görevlisi

2005-... Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD

Doktora

2003-2005 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi ABD

Nöroşirurji - Doktora

2002 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mezuniyet

1997 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Öğrenci Temsilcisi

1996 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

İngilizce Hazırlık Sınıfı (Ankara Üniversitesi TÖMER)

1995 Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Yabancı Dili: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: TÜRK MİKROBİYOLOJİ CEMİYETİ

Bilimsel Etkinlikleri (aldığı burslar, ödüller, projeleri)

2006 Ocak OVA antijenine karşı monoklonal antikor üretimi

2006 Mayıs Mukozal immünoloji (İntra epitelyal lenfosit eldesi)

2006 13-18 Haziran Uludağ / Bursa da gerçekleştirilen 3. Ulusal Mantar Hastalıkları ve Klinik Mikoloji Simpozyumu 'nda "*Aspergillus fumigatus* fare modelinde lenfosit yüzey antijenlerinin ekspresyonu" (poster)

2006 Aralık Üriner Sistem Epitel Hücrelerinin Bakterisidal Aktivitesi, Sitokin ve Kemokin yanıtı (Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi (2006) 36 (4):179-183)

2006 Aralık Flukonazol ve Amfoterisin B'nin *Candida* türlerine postantifungal etkisi (Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi (2006) 36(4):205-209)

2007 Eylül Deneysel Tek Taraflı İnmemiş Testis Modeli'nde , Lokal ve Kontrollü Salınan Fibroblast Büyüme Faktörü, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü ve Büyüme Hormonunun, Germ Hücre Populasyonuna Etkileri (II. Word Congress of the Word Federation of Associations of Pediatric Surgeons – WOFAPS, Buenos Aires (poster))

2007 Eylül Deneysel Tek Taraflı İnmemiş Testis Modeli'nde , Lokal ve Kontrollü Salınan Fibroblast Büyüme Faktörü, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü ve Büyüme Hormonunun, Germ Hücre Populasyonuna Etkileri (Çocuk Cerrahisi Dergisi)

2007 Periferal Mononükleer Hücrelerden Monosit izolasyonu

2008 *Aspergillus fumigatus* fare modelinde lenfosit yüzey antijenlerinin ekspresyonu (J.Infect Dev Ctries 2008 Feb 1;2 (1) : 34-9)

2008 Metisilin'e Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ile uyarılmış lenfositlerin hücre yüzey markırlarının ekspresyonu (Indian J.med.Res.2008 Jul; 128(1):71-8 (SCI Yayın Ödülü))

2008, 5-9 Ağustos Metisilin'e Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ile uyarılmış lenfositlerin hücre yüzey markırlarının ekspresyonu (XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology)

2008 Vajinal Kandidozlu Hastalardan İzole edilen *Candida albicans* Suşlarında Adezyon Genlerinden ALS, HWP ve SAP İfadesinin Gösterilmesi (Folia Microbiol. 53(2), 179-183 (2008))

2008, Haziran 24-28 Vajinal Kandidozlu Hastalardan İzole edilen *Candida albicans* Suşlarında Adezyon Genlerinden ALS, HWP ve SAP İfadesinin Gösterilmesi (5.Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (poster))

2008 *Viscum album* ssp. *album* ve *Hypericum perforatum*'un İn Vitro İnsan İmmün Sistem Hücreleri Üzerine Etkisi (Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2008; 30 (3) : 519-28 : 519-528)

2008 9 Nisan Programlı Hücre Ölümü – Apoptozis konulu sempozyum katılımı

2009 25-29 Mart On yaş ve üzeri kişilerde kabakulak. kızamık, varisella seroprevalansı (14.Türk Klinik ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi)

2009 Deneysel Tek Taraflı İnmemiş Testis Modeli 'nde , Lokal ve Kontrollü Salınan Fibroblast Büyüme Faktörü, İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü ve Büyüme Hormonunun, Germ Hücre Populasyonuna Etkileri (Urology 2009 ; Jul 17)

2009 Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP)

Bakteriyel Toksinlerin Kardiyak Miyositler Üzerine Apoptotik Etkisi

2009 Eylül SCI (Science Citation Index) yayın ödülü

(Gazi Üniversitesi Rektörlüğü)

2009 17 Kasım Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD tarafından düzenlenen 'Pratisyen Hekimlere Yönelik Mikrobiyolojik Yaklaşım' Konulu toplantı katılımı