

# APOPTOZİS

## -KAVRAM, MEKANİZMALAR, ONKOLOJİK ÖNEMİ-

APOPTOSIS  
-CONCEPT, MECHANISMS, SIGNIFICANCE IN ONCOLOGY-

Binnur ÖNAL

### SUMMARY

The maintenance of homeostasis in normal tissues reflects a balance between cell proliferation and cell death. *Programmed* cell death (Apoptosis) is the ubiquitous *physiological* phenomenon of *intentional* cell death that eliminates redundant cells, changes phenotypic composition during histogenesis, provides form during morphogenesis and balances mitosis in renewing tissues. This pathway of cell death is characterized by internucleosomal digestion of genomic DNA. Such DNA digestion can be induced by both physiological stimuli and cytotoxic treatment with many anticancer agents. This digestion has generally been considered to be mediated by a  $Ca^{++}/Mg^{++}$  dependent endonuclease that is activated by increases in intracellular  $Ca^{2+}$ . Morphologically apoptotic cells appear as small, condensed bodies. The chromatin is dense and fragmented, packed into compact membrane-bound bodies together with randomly distributed cell organelles. The plasma membrane shows extensive blebbing. It buds off projections so that the whole cell may split into several membrane-bound apoptotic bodies. Significant chemical changes take place in the plasma membrane. This helps in recognition of the apoptotic bodies by phagocytes. At this moment it is unclear if all cells can undergo apoptosis or it is a characteristic of only some tissues which are predisposed to apoptotic death being directly under the control of hormones or growth factors. This *active* form of cell death is controlled by a genetic program(s) that kills the targeted cell without causing subsequent inflammation. Tumor suppressor gene such as p 53 and oncogene such as bcl-2 are found to be closely related to apoptotic processes in a cell.

Control of programmed cell death in normal and redundant cells could provide new implications for therapy in many conditions such as cancer, AIDS, leukemia, myocardial infarction and neurodegenerative diseases.

(Key words: Cell death, cell suicide bcl-2, proto-oncogene, tumor suppressor gene)

## ÖZET

Yaşayan doku ortamında hücrelerin tek tek silindiği *fizyolojik* bir ölüm şekli olan apoptozis 1980'li yıllarda yeniden bilim dünyasının gündemine gelmiş ve günümüzde biyoloji ile tıp bilimlerinin en yoğun şekilde araştırılan konularından biri olmuştur. Normal dokularda homeostazın sürdürülmesi hücre çoğalması ve ölümü arasında bir dengenin yansımasıdır.

*Programlanmış* hücre ölümü (Apoptozis) hasarlı hücreleri ortadan kaldıran, histogenez ve morfogenezde rol oynayan, kendini yenileyen dokularda mitozu dengeleyen özgün bir fenomendir. *Hücrenin intiharı* olarak da kabul edilen bu ölüm modeli, genomik DNA'nın internükleozomal sindirimi ile karakterlidir. DNA sindirimi hem fizyolojik uyarılarla hem de sitotoksik tedaviler ile uyarılabilmektedir. Söz konusu sindirim sürecinin, hücre içi Ca artışı ile aktive olan, -Ca ve Mg'a bağımlı- endonükleaz tarafından kontrol edildiği düşünülmektedir. Morfolojik olarak apoptotik hücreler *küçük, yoğunlaşmış cisimcikler* olarak gözlenirler. Nüve kromatini yoğunlaşmış hücre organelleri ile birlikte membrana bağlı cisimcikler oluştururlar. Sitoplazma yüzeyinde kabarcıklar gelişir, hücre membrana bağlı apoptotik cisimciklere dönüşür. Sitoplazma membranında gelişen özgün kimyasal değişiklikler, apoptik cisimciklerin fagositler tarafından tanınmasını kolaylaştırır. Hücre ölümünün bu *aktif* formu, hedef hücreyi dokuda inflamatuvar yanıtı yol açmadan öldüren; başta bcl-2 ve p53 olmak üzere pek çok protoonkogen ve tümör supresör genin rol aldığı genetik program(lar) tarafından kontrol edilmektedir. Beş trilyondan fazla hücreyi barındıran insan organizmasında tüm hücrelerin mi apoptozise gidebildikleri yoksa hormon veya büyüme faktörlerinin doğrudan kontrolünde bulunan apoptotik ölüme yatkınlığın yalnızca bazı dokulara mı özgü olduğu sorusu günümüzde hala aydınlatılmamıştır.

Hücrelerdeki bu "ölüm şalterini" programlı biçimde kullanabilen bilim dünyası kanser, AIDS, lösemi, myokard enfarktüsü, Parkinson ve Alzheimer gibi sayısız hastalığı yönlendirmek, dolayısı ile iyileştirmek ve yaşamı uzatmak için temel bilgileri sağlayabilecektir.

(Anahtar Sözcükler: Hücre ölümü, hücre intiharı, bcl-2, proto-onkogen, tümör supresör gen)

Büyüme, farklılaşma ve ölüm bir hücrenin yaşam döngüsünün temel unsurlarıdır. Çok hücreli canlılarda, hücreler arasındaki dengenin ve hücre canlılığının sürdürülmesi endokrin, otokrin ve parokrin uyarılara bağlıdır. Bu uyarıların *yetersiz* kaldığı durumlarda hücre ölümünün gerçekleşebileceği tezini destekleyen araştırma sonuçları vardır (1, 2). Bunun yanı sıra, eksojen/endojen *sitotoksik etkenler* ve immün sistemin *efektör hücrelerinin* neden oldukları hücre ölümleri de bilinmektedir (3). Etkeni ne olursa olsun, hücre ölümlerinin belirli modeller ile gerçekleştiği, biyokimyasal ve morfolojik araştırmalarda gözlenmektedir. (3, 4). 1990'lı yıllara değin, hücre ölümünün, apoptozis ve nekroz olmak üzere, mekanizma ve morfolojileri birbirinden tümüyle farklı iki modelin dışında, son yıllarda,

seyrek olarak, iki tipe de tam olarak uymayan, henüz isimlendirilmemiş hücre ölüm şekilleri bazı araştırmalarda belirtilmiştir. (5).

## I. APOPTOZİS İLE İLİŞKİLİ KAVRAMLAR:

### Apoptozis Nedir?

"Fizyolojik hücre ölümü", "programlanmış hücre ölümü", "Aktif hücre ölümü" "hücrenin intiharı" gibi tanımlamalar ile de anılmakta olan apoptozis, son yıllarda biyoloji ile temel ve klinik tıp bilimlerinde yoğun araştırma ve tartışmalara konu olmaktadır. Hücrelerin kendi kendilerini *yok ettikleri*; yeni gen ekspresyonları (yeni gen ürünlerinin ortaya çıkması) *aktif* RNA /protein sentezi ve ATP Formundaki enerjiye gereksinim gösteren bu *programlı, fizyolojik* ölüm modeli, patolojik

TABLO 1: Nekroz ve apoptozis'in ayırıcı özellikleri

	NEKROZ	APOPTOZİS
<b>Uyaran</b>	Patolojik (Hipoksi, toksin vb.)	Fizyolojik veya Patolojik
<b>Histoloji</b>	Hücre gruplarında şişme Koagülasyon nekrozu Organellerde parçalanma	Dokuda, <i>tek tek</i> hücrelerde Kromatin yoğunlaşması Apoptotik cisimcikler
<b>DNA parçalanması</b>	Yaygın, rastlantısal	İnternükleozomal
<b>Mekanizma</b>	ATP azalması  Membran hasarı Serbest radikal hasar <i>İlerleyici kimyasal-yapısal parçalanma</i>	ATP ve RNA/protein sentez artışı Endonükleaz aktivasyonu Gen aktivasyonu Membran tomurcuklanması  <i>Makromolekül sentezi aktif hücre ölümü</i>
<b>Doku yanıtı</b>	Yangısal reaksiyon	Yangı yok Apoptotik cisimciklerin fagositozu

bir ölüm modeli olan nekrozdan tümüyle farklıdır (Tablo 1). Apoptozis, **büyüme faktörleri** ve **hormonlarla** ve **genetik** olarak kontrol edilmektedir. Apoptozis ve nekroz arasındaki *işlevsel fark*, apoptotik hücrelerde sitoplazma zarının zar bütünlüğü bozulmadan önce, komşu sağlam hücrelerden farklı ve organizmaya yabancı (nonsel) olarak tanınmalarını sağlayacak şekilde değişikliğe uğramasıdır.

İnsan vücudunda beş trilyondan fazla hücre vardır. Hücre içinde "kendi kendini yok eden bir ölüm programı"nın varlığı 21. yüzyıl eşliğinde heyecan verici bir fenomendir.

#### Tarihçe

Programlı hücre ölümü, embriyogenez döneminde uzun yıllardır belirtilmesine karşın; fizyolojik hücre ölümü 1972'de Kerr,

Currie ve Wyllie tarafından tanımlanmış ve Apoptozis olarak adlandırılmıştır. Grekçe'de *apo* (= ayrı) ve *ptozis* (= düşen) kelimelerinden oluşan apoptozis *sonbaharda yaprak dökümü*'nü tanımlayan bir kelimedir(6). Bu araştırmacılar hücre ölümünün apoptotik modelinin özel bir morfolojisi olduğunu, ultrastrüktürel düzeyde kanıtlamışlardır (4). Deneysel düzeyde apoptozis, ilk kez 1980'de Wyllie tarafından başarılmıştır. Olgunlaşmamış timus hücrelerine glukokortikoid uygulayarak apoptotik hücre ölümünü gerçekleştiren araştırmacı, apoptotik hücre DNA'sının jel elektroforezini yaparak, ayrılan DNA bantlarının bir merdiven görünümünde olduğunu göstermiştir (7).

#### Organizmada Bilinen Apoptotik Ölüm Modelleri

Apoptozis organizmada, aşağıda örnek-

leri sunulan, birçok fizyolojik ve patolojik olayda rol oynamaktadır (3,8):

\* **Embriyogenez-** (implantasyon, organogenez, gelişimsel küçülme) ve **metamorfoz sürecinde programlı hücre yıkımı**,

\* **Sürekli çoğalan hücre popülasyonlarında** (epidermis, bağırsak mukoza epitelileri, hepatositler, adrenal zona retikularis hücreleri) **hücre kaybı**, - bu hücre popülasyonlarında mitoz ve apoptozis dengededir.

\* **İmmün hücrelerin ortadan kaldırılması-** (sitokin deplesyonundan sonra hem B hem de T hücrelerinin ve timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin azaltılması),

\* **Sitotoksik T hücrelerinin yol açtığı hücre ölümü-** (hücrel immün red yanıtı: vücudun oluşan bir kanser hücrelerini tanıması ve yok etmesi; Graft Versus Host Reaksiyonu),

\* **Erişkinde hormona bağımlı doku küçülmesi** (menstrüel siklusta endometrial hücre yıkımı, menapozda over follikül atrezisi, emzirme dönemi sonrasında meme parankimindeki azalma, ACTH çekilmesinden sonra adrenal atrofisi),

\* **Hormona bağımlı dokularda patolojik atrofi-** (kastrasyon sonrasında prostat atrofisi, glukokortikoid uygulamasından sonra timusta lenfosit kaybı),

\* **Hiperplazi involüsyonu-** (hipersellüler glomerüler hastalıkların iyileşmesi),

\* **Parankimal organlarda kanal tıkanmasından sonra patolojik atrofi-** (pankreas, tükrük bezi ve böbrek),

\* **Bazı viral hastalıklarda hücre hasarı-** (viral hepatitte karaciğer sinüzoidlerinde görülen ve Councilman cisimcikleri olarak bilinen apoptotik hücre fragmanları),

\* **İnflamasyonun iyileşmesi** - (olgun nötrofillerin ortadan kaldırılması),

\* **Tümörlerde hücre ölümü-** (bazal ve skuamöz hücreli deri kanserlerinde, an-

tikarla uyarılmış lösemik hücre ölümü, endokrin tümörlerin gerilemesi, kemoterapi uygulamasında kanser hücresi ölümü),

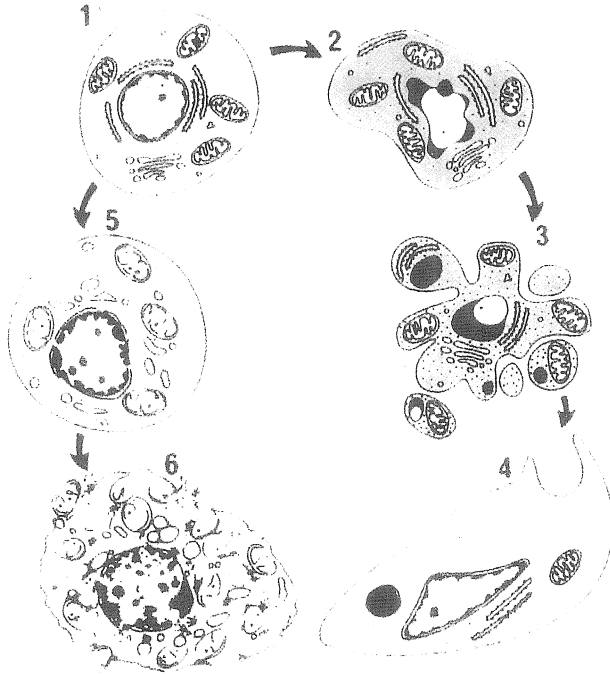
\* **Çeşitli incitici uyarımlarla oluşan hücre ölümü-** (hipertermi, radyasyon, sitotoksik ilaçlar ve hipoksi gibi nekroza yol açabilen etkenler, hafif dozlarda apoptotik süreci başlatırlar; ayrıca timik kortikal hücre ölümü, yeni doğanda böbrek nefrojenik hücre ölümü bu grubun diğer örneklerindedir).

### Morfolojik değişiklikler

Apoptozisi en iyi şekilde gözlemlemek ve nekrozdan ayırıcı tanısını yapabilmek *elektron mikroskopu* ile mümkün olabilmektedir (Şekil 1).

Apoptosize giden hücrelerdeki morfolojik değişimler 3 fazda gerçekleşmektedir (4, 9, 10): **İlk aşama** en çarpıcı değişikliklerin olduğu dönemdir. Hücre çekirdeğinin boyutu azalır. Çekirdek periferinde- membran altında yarım ay ya da oval şeklinde- **kromatin yoğunlaşması** dikkat çekicidir. Çekirdekçik partiküllere dönüşür. Apoptotik hücrelerde mikrovillus ve bağlantı bölgeleri gibi özelleşmiş yüzey **strüktürleri kaybolur**; hücre düzeyi düzgün ve yuvarlak bir görünüm alarak komşu hücreler ile bağlantısı kesilir. Hücre hacmi azalır, hücre küçülür, sitoplazmik organeller kompaktlaşır, düz endoplazmik retikulum dilate olur. **Yoğunlaşmış sitoplazmada** vakuoller ortaya çıkar. Dilate sisternalar hücre membranı ile birleşerek, hücre yüzeyinde baloncuklar oluşturur. Nekrotik hücre ölümünün aksine, mitokondriler olağan görünümündedir.

**İkinci aşama**'da hücre yüzeyinde balonlaşma ve çekirdek sınırlarında düzensizlik belirgindir. Hem çekirdek hem de sitoplazma değişik boyutlarda parçalara ayrılır. Bu parçalardan bazıları yuvarlak, düzgün, hücre membranına bağlı ve her biri membranla çevrili "**apoptotik cisimcikler**"e dönüşür. Apoptotik cisimciklerin bazılarında çekirdek parçacıkları bulunurken, diğer



Şekil 1: Apoptozisde ve nekrozda ultrastrüktürel değişiklikler (8).

(1) Normal hücre. **Apoptozis** sürecinde (2) nükleer membranda kromatin yoğunlaşması ve parçalanması, sitoplazmada kompaktlaşma (3) çekirdek parçalanması, hücre yüzeyinde baloncuk oluşumu, baloncuklardan *apoptotik cisimciklerin* gelişimi (4) komşu hücrelerin apoptotik cisimcikleri fagositozu ve sindirimi. **Nekroz** bulguları olarak (5) kromatinin düzensiz yığınlara dönüşümü, organellerde şişme, mitokondriyalarda hasar (6) membran rüptürü.

bazılarında sıkı biçimde paketlenmiş organelleri ile birlikte yalnızca sitoplazmik elemanlar izlenir. Apoptotik cisimcikler epitelyal yüzeylerden dökülebilir, hücreler arası boşlukta izlenebilir ya da çoğunlukla diğer hücreler tarafından fagosite edilirler. Fagositozu yapan hücreler: komşu, normal epitelyal hücreler ve tümör hücreleri (spontan apoptotik kaybolma) ya da aynı dokunun mononükleer fagositik sistem hücreleridir. Özellikle glandüler dokularda intraepitelyal makrofajlarda bu aktivite belirgindir (3). Apoptotik hücreler *acil fagositoz için hedef hücreleri* oluşturmaktadır. Apoptozis konusundaki zamanlamalı sinematografik çalışmalar, apoptotik süreci başlatan uyarılar sonrasında ilk yanıt döneminin yalnızca *birkaç dakika* sürdüğünü ve apoptotik hücrelerin oluştuğunu göstermektedir.

Hemen fagosite edilmezse, bu hücre partikülleri hücreler arası dokudan kaybolurlar (12). Fagosite edilmiş apoptotik hücreler *4-9 saat süre ile* dokular içinde tanımlanabilir kalır. Histolojik olarak belirgin apoptotik cisimciklerin *yarı ömrü 4 saattir*(13). Böylece tek bir apoptoz dalgasının tüm izleri dokudan *24 saat içinde* silinebilmektedir (14). Hücrelerin ortadan kaldırılma süresinin çok kısa olması nedeni ile apoptotik indekstekteki *hafif bir artış, yüksek oranda* bir hücre kaybını ifade etmektedir. Apoptotik mekanizmanın çok hızlı işlemesi ve güç saptanması nedeni ile atrofiye uğrayan ve hücre sayısı 3 gün içinde yarı yarıya azalan bir organda, ışık mikroskopunda görülebilen apoptotik hücre oranı % 5'den azdır.

Üçüncü aşama bir "*in vitro otoliz*" dönemidir. "*Sekonder nekroz*" olarak da adlan-

dırılan ve lizozomal enzimlerce parçalanmanın sonucu olan bu değişiklikler, genellikle *fagosite eden komşu hücrenin* fagozomu içinde meydana gelir (Heterofaji- Tip I hücre ölümü). Bazı sistemlerde ise *apoptotik cisimcikler içindeki* lizozomlar, sindirimde aktiftirler (Otofaji- Tip II hücre ölümü). Hormon bağımlı organlarda, trofik hormon yokluğunda oluşan küçülme sürecinde ise dokuda yoğun olarak izlenen apoptotik cisimciklerle komşu hücreler başa çıkamazlar ve küçülen dokuyu istila eden *makrofajlar* tarafından sitozollerinde sindirilirler (Tip III hücre ölümü). Söz konusu üç tip hücre ölümünde de hücre membranları kaybolur, organeller tanınmaz olur ve gözlenen artık bir "lizozomal rezidüel cisimcik"tir. Apoptozisin sürekli olarak oluştuğu dokularda, *elektron mikroskopisi* ile görülen apoptotik cisimciklerin çoğunluğu bu fazdadır.

*Işık mikroskopisinde* ise apoptotik hücreler komşu hücrelerden bağlantılarını kaybederek ayrılmaları, onlardan daha küçük boyutta olmaları ve düzgün-yuvarlak hücre

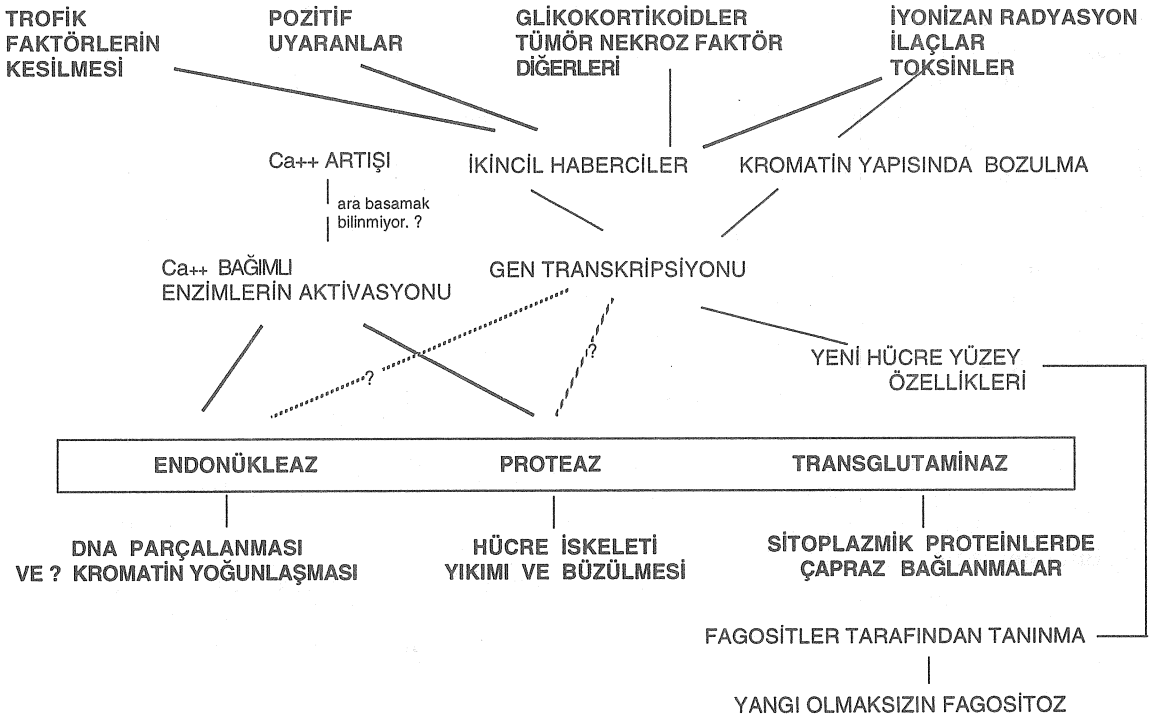
konturları, kompakt sitoplazmaları ile ya da koyu-hiperkromatik ve sıklıkla parçalı çekirdekleri ile tanınabilirler. Patologlar tarafından uzun yıllar "*melanozis koli*" olarak bilinen lezyonun, lamina propriada, mukozal hücrelerden köken almış apoptotik cisimcikler ile yüklü makrofajların birikimi olduğu anlaşılmıştır (15). Benzer şekilde lenf bezi germinal merkezlerindeki "*tingible body makrofaj*"lar lenfositlerin apoptotik kalıntıları ile yüklüdür (3). Epidermiste gözlenen *diskeratotik hücreler* (Civatte body), dökülen *intestinal döşeyici* hücreler, viral hepatitteki *asidofil* (Councilman) *cisimcikler* morfoloğların yıllardır aşına oldukları, ancak son yıllarda nitelikleri anlaşılan diğer apoptotik hücre örnekleridir.

## II. APOPTOZİSİN MEKANİZMALARI

### Hücre içi olaylar

"Hücre dışı ortamdan etkilenen bir biyokimyasal ve genetik olaylar dizisi" olan apoptoziste sinval iletimi ve moleküler mekanizmalar üzerine araştırmalar süregelmektedir (16): Farklı uyarılar ortak ölüm

ŞEKİL 2: Apoptozis mekanizması



programını nasıl aktive etmektedirler? Bu programın harekete geçirici ve düzenleyici faktörleri nelerdir? Bu sorunların yanıtları henüz kesin olarak bilinmese de son yıllarda giderek yoğunlaşan araştırmalar, apoptotik ölüm programının Şekil 2'de sunulan ana hatlarının anlaşılmasını sağlamıştır:

\* Hücre membranı seçici geçirgenliğini büyük oranda korumakta, ancak aktive olan proteazlar yaygın proteoliz yaratmakta; hücre iskeleti ve bazı membran proteinlerinin proteolizi sonucunda yüzey membranında baloncuklar oluşmaktadır. Tomurcuklanma ve parçalanma ile hücre hacminin azalmasında *transglutaminaz* enziminin de rolü vardır.

\* Apoptozisteki internükleozomal DNA parçalanması *kalsiyuma duyarlı* endonükleazlar ile gerçekleşmektedir: Apoptoz sırasında belirginleşen *endonükleolitik aktiviteler* kromatin halindeki DNA'yı, yaklaşık  $10^5$  baz çifti büyüklükte parçacıklar oluşturacak şekilde, internükleozomal aralıklarda kesmektedir. Böylece apoptotik hücrelerden saflaştırılan DNA molekülleri, bir nükleozomal büyüklükten (180-200 baz çifti) başlayarak onun tam katları büyüklüklerde bulunmakta ve boyutlarına göre ayrıldıkları jel elektroforezi sonucunda merdivene benzer görüntüler oluşturmaktadır. "*Apoptotik DNA merdiveni*" olarak tanımlanan bu görünüm apoptozu tanımda kullanılan en yaygın ve geçerli kriterlerden biri olarak kabul edilmiştir, ancak görülmesi zorunlu değildir. Internükleozomal DNA parçalanması sonucunda *kromatin* parçalanmakta ve *yoğunlaşma* göstermektedir.

\* Apoptotik cisimlerin fagositler tarafından tanınması *immünolojik olmayan* bir mekanizma ile olmaktadır. Bazı özelleşmiş şekerler ile reseptör moleküllerinin makrofaj-apoptotik cisim ilişkisinde rolü olduğu düşünülmektedir (17).

Apoptoziste hücre içi sinyal iletim sisteminde rol oynadığı düşünülen şu faktörler üzerinde araştırmalar süregelmektedir:

\* *Kalsiyum* (Ca) iyonlarının sitozoldeki konsantrasyonunun apoptozis sırasında yükseldiği sıkça gözlenmektedir (18), ancak apoptozu nasıl uyardığı tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Ca, siklik adenosin monofosfat (cAMP), c GMP (siklik guanin monofosfat), calmodulin gibi kalsiyum bağlayan moleküller ve protein kinazlarla etkileşerek sinyal iletiminde önemli rol oynar. Hücre içi cAMP yükselmesinin farklı hücrelerde apoptozu uyardığı bildirilmektedir (19); ancak sitozolde Ca yükselmesinin cAMP' den bağımsız olarak da apoptoz oluşturabildiğine ilişkin bulgular vardır (20).

\* Tümör promoteri forbol esterleri *protein kinaz C* (PKC)'yi uyarmakta; lenfosit (21) ve nöronlarda (22) apoptozu önlemektedirler. PKC apoptoziste en önemli sinyal iletim yollarından biridir. PKC inhibitörlerinin çoğalan hücrelerde apoptozu yol açmaları ise, PKC'nin *apoptozisi engelleyici* bir etkisinin olduğunu düşündürmektedir.

\* Pro-oksidan maddeler ve *oksidatif hasarın* bir çok hücrede apoptozu yol açtığı belirtilmektedir (23, 24);

\* *Proteolitik aktivitenin* apoptozis süresince, hücre çekirdeğinde gözlenen değişikliklerde rol oynadığı düşünülmektedir (25).

Apoptotik hücrelerde proteolizin ileri derecelere ulaşması geçiğinden yola çıkarak *flow (akım) sitometri* (toplam hücre proteini ve DNA ölçümleri yanısıra), *apoptotik, nekrotik* ve *canlı* hücrelerin ayırt edilmesinde güvenilir bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (26).

\* *Tümör nekroz faktörü  $\alpha$* 'nın, in vitro koşullarda apoptozisi tetiklediği görülmektedir (27, 28). In vivo koşullarda tümörlerde izlenen apoptozisin bir bölümü, infiltran makrofajlarca bu sitokin salgılanmasına bağlı olabilir. Diğer bir bölümü de, sitotoksik T lenfositlerince tümöre saldırının sonucu olabilir (29). Öte yandan kimyasal karsinogenlerin uygulanmasından sonra karcinogenlerde gelişen nodüller ve preneoplastik

odaklarda apoptozisin arttığı gözlenmektedir (30, 31).

### Apoptozis modülatörleri

\* Büyüme ve karsinogenezde etkili olan *onkogen* ve *supresör*- bazı genlerin inaktivasyonu veya overekspresyonunun (genetik bilginin aşırı derecede ortaya konulması), apoptotik sürecin tetiğinin çekilmesinde rol oynadığı düşünülmektedir: Bazı hormonlar ve sitokinlerin salgılanması ile hücrenin yaşamını uzattığı sanılan *Bcl-2 geni* (*b cell leukemia- lymphoma-2*) bunlardan biridir. *C-myc* onkogeninin protein ürünü, hem apoptozisi hem de *bcl-2* varlığında, büyümeyi uyarmaktadır (32). Olağan koşullarda apoptozisi uyaran *p 53*'ün mutasyona uğraması (mutant *p 53*) durumunda ya da yokluğunda hücre yaşamı uzamaktadır. *p 53* sıklıkla, *DNA hasarı* sonucunda apoptozu uyarmakla birlikte (33), hasarsız hücrelerin uygunsuz koşullarda çoğalmaya zorlanmaları durumunda da *S* fazındaki hücrelerin apoptotik ölümüne neden olabilmektedir (34, 35). Öte yandan *DNA hasarı*, *S* fazındaki hücrelerde *p 53*'ten bağımsız olarak apoptoz oluşturabilmektedir (36). Söz konusu tamir edilemeyen hasarlar mutasyon olarak kalacağı için, hasarlı hücrelerin apoptozla yok edilmeleri *evrim teorisinin pozitif seçici bir özelliği* olarak değerlendirilebilir. Ayrıca *p 53*'ün, *bcl-2/bax* heterodimerleri (heterojen eşleşme) oluşmasını azaltarak da apoptozu uyarıcı rol oynayabileceğini düşündüren bazı bulgular elde edilmiştir (37). Bu çalışmalar ışığında, hücre bölünmesi ile ilişkileri daha önce gösterilmiş *myc* ve *ras* gibi onkogenlerin hücre ölümünün hazırlanmasında da rol oynadığı anlaşılmaktadır. Çoğalmakta olan hücrelerin dinlenme durumundakilere göre ölmeye *kalıtsal olarak daha yatkın* oldukları, malin hücrelerin bu durumun üstesinden gelebilmek için hücre ölümünün düzenlenmesi ile ilgili mutasyonlara başvurdukları düşünülmektedir.

*DNA*'daki değişiklikler, hücre malin transformasyonuna neden olur. Organiz-

manın buna yanıtızsızlığı kanser tablosunu ortaya çıkarır. Kanser dokusunda bölünen hücrelerin ölen hücrelere oranı, kanserin gelişim hızını belirler. Malin tümörler kontrol edilemeyen hücre artışları olmakla birlikte; bazı tümörler hücre çoğalmasından ziyade yeterli hücre ölümünün olmamasına bağlı olarak gelişir. İnsan vücudunda bir hücre, incitici ajanlara karşı farklı şekillerde yanıt verebilir: hasar onarılan kadar hücre bölünmesini geciktirebilir, apoptozise gidebilir veya hücre büyüme siklusu boyunca gelişim gösterebilir. Apoptozis malin transformasyonu önlemenin etkin yöntemlerinden biridir, çünkü genetik olarak hasarlı hücreleri uzaklaştırır. Ancak yetersiz-den- gesiz apoptozis: kanser, AIDS veya otoimmün hastalık gelişimine yol açabilir. Son yıllarda apoptozis kontrolünü, moleküler düzeyde anlama yönündeki çabalar, tümör hücrelerinin spontan kaybını açıklayabilmeyi çok ötesinde, apoptozisin *potansiyel onkolojik önemini* açıklığa kavuşturmuştur. Tümörlerde apoptozisin artması tümör hücrelerinin kimi intrinsek süreçlerinden kaynaklanabilir; *benzer tümörlerde farklı apoptozis oranları* farklı onkojenik etkileşimlerin göstergesidir (38).

Buttayan ve arkadaşlarının bir araştırmasında, kastrasyonu takiben sıçan prostat bezinde, *c-myc* m-RNA düzeyinde belirgin artış kaydedilmiştir. Bu süreçte, involüsyon esnasında oluşan transkripsiyon (*DNA* üzerinde RNA sentezi) seviyeleri düşük, apoptozis en yüksek düzeyde saptanmıştır. Aynı yazarlar, *c-myc*'den önce *c-fos* geninin de uyarıldığını buldular. Araştırmacılar, mitoz ve apoptozisin *ortak sinyalizasyon mekanizmalarını* kullanabileceklerini belirttiler (39).

### Tümör gelişimi ve apoptozis

Tümörlerde apoptozisin varlığı yeni olmayıp, 20 yıldan uzun bir süredir birçok tümörde kinetik çalışmalarda farkına varılan "*spontan hücre kaybı*"ndan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Elektron mikroskopik çalışmalar, insan bazal ve skuamöz hücreli kanserlerinde (40) ve sıçan meme tümör-



lerinde (41), ooferektomi sonrasında yaygın ve sürekli hücre kaybını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, skuamöz hücre kanserlerinde radyasyon sonrası, apoptoziste belirgin artış gözlenmiştir. Birçok tümörde etkinliği kabul edilmiş olan radyoterapi (42), sitotoksik kemoterapi (43), hipertermi (44) ve hormon ablasyonu (45) gibi tedavi modellerinin apoptozisi arttırdığı günümüzde kabul edilmektedir. Bu konudaki kantitatif çalışmalar az sayıda olmakla birlikte, hızlı involüsyona uğrayan dokularda apoptotik hücrelerin çok sayıda bulunması nedeni ile *apoptozisin klinik anlamı* dikkate alınmalıdır. Apoptozis, tümörlü dokularda özellikle nekroz odakları çevresinde belirgindir; tümör içermeyen dokularda apoptozisi arttıran bir etken olarak bilinen *hafif iskeminin* bu olayda etkili olduğu düşünülmektedir (46, 47).

Epitelyal tümörlerde: *tümör tipini, prognozu, tedavi modelini* belirlemede apoptozisin rolüne yönelik araştırmalarda *bcl-2 protonkogeni* ile yürütülen araştırmalar önemli bir yer tutmaktadır. Bcl-2 bilinen en etkili hücre ölümü baskılayıcısıdır. Bcl-2 geni fazla miktarda eksprese eden hücreler apoptozise çok dirençlidir. Bcl-2 overekspresyonu ilk kez folliküler hücreli lenfomada tanımlanmıştır. Bu tümörde aşırı hücre çoğalmasından ziyade, apoptozisin olmaması söz konusudur. Hücrelerin *sonradan kazanılmış ölümsüzlükleri* tümör nedenidir. Bcl-2 geni, ilk olarak, iç *mitokondrial membran* proteinini kodlayan bir protoonkogen olarak tanımlanmış olup, daha sonraki yıllarda *nükleus membranı* ve *endoplazmik retikulumda* da saptanmıştır (48). Programlanmış hücre ölümünü bloke eden bcl-2'nin gösterilebildiği *lenfoid dışı dokular* şu şekilde gruplandırılabilir (49):

\* Hormonlar ve büyüme faktörlerinin hiperplazi ve involüsyonu kontrol ettiği glandüler epitel, \*\* Yaşam süreleri uzun kök hücreleri ile karakterli, deri ve barsak gibi karmaşık farklılaşma gösteren epitel, \*\*\* Nöronlar gibi uzun ömürlü postmitotik hücreler.

Apoptotik hücre devinimini gösteren bu dokularda bcl-2, sıklıkla *uzun yaşayan* veya *çoğalan hücre bölgelerine* sınırlıdır. Apoptozisin antidotu olarak bcl-2'nin fonksiyonu, bu dokularda progenitor (öncül) ve efektor (harekete geçirici) hücrelerin yaşam sürelerini uzatmaktadır. Ayrıca bcl-2 molekülü in vivo koşullarda bax proteini ile heterodimerler oluşturmaktadır. Araştırma sonuçlarına göre bax proteini, bcl-2'nin apoptozisi engelleyen aktivitesini önlemekte ve bax/bax homodimerleri (homojen eşleşme) arttığında apoptozis hızlanmaktadır. Bu veriler ışığında hücre içi apoptozis sinyalinin açılıp kapanmasında *bcl-2 ile bax* proteinlerinin *karşılıklı etkileşim*-lerinin çok önemli olduğu anlaşılmaktadır (50). Öte yandan bcl-2'den farklı olarak, son zamanlarda keşfedilen apoptozis represör (durdurucu) gen ürünleri arasında bcl-2 ile ilişkili bir protein olan bcl-xL ve Abl bulunmaktadır.

### III. APOPTOZİSİN KLİNİK ÖNEMİ

#### Epitelyal tümörlerde apoptozis çalışmaları

Prostat ve meme gibi hormona bağımlı dokularda aktif hücre ölümü: hormonun söz konusu ortamdan çekilmesinin yanısıra anti androjen-anti östrojen, kalsiyum kanal agonistleri veya TGF B (Transforme Edici Büyüme Faktörü) ile tedavi sonucunda da kolaylıkla uyarılmaktadır (51). Prostat ve meme gibi karmaşık salgı dokularında apoptozis ile kanser arasında gizli kalmış bir ilişki mevcuttur. Bu ilişki, her ikisinin de tedavi modellerinde ortaya çıkar; tedavi, apoptozisi uyarabilmek için hormonun ortamdan çekilmesine dayanır. Bu nedenle, bu organ kanserlerinde tedavinin başlamasından birkaç gün sonra "*apoptotik indeks*"in değerlendirilmesinin, tedaviye yanıtın iyi bir göstergesi olarak kabul edilebileceğini savunan araştırmacılar mevcuttur (51).

Prostat kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde bcl-2'nin rolünü araştırmak üzere yapılan çalışmalarda (52), *normal* prostatta bcl-2 ekspresyonu *bazal epitelyal* hücrelere lokalizedir. Bcl-2, androjene bağımlı 19 pros-

tat kanserinden 13'ünde saptanamazken, androjenden bağımsız prostat kanserleri, küçük hücreli prostat kanseri ve adenokarsinom nüksleri yaygın ve yüksek düzeyde bcl-2 boyanması göstermektedir ( $p < 0.01$ ). Çalışmanın sonucunda, androjen çekilmesini takiben bcl-2 ekspresyonu yükselmekte ve tümörün androjen bağımsızlığından bağımlılığına doğru yönelişi ile korelasyon göstermektedir. İlginç olarak, atrofi veya değişici epitel metaplazisi gösteren prostat bezlerinde kuvvetli boyanma izlenmektedir. Vurgulanması gereken bir nokta TRPM-2 ve TGP-B gibi apoptozisin uyarılması ile ilgili gen ekspresyonlarının aksine, bcl-2 ekspresyonundaki artışın, apoptozisin zirveye ulaştığı bilinen 3. gün sonuna kadar belirgin olmamasıdır. Kemik iliği metastazı yapmış prostat kanserlerinde bcl-2 ekspresyonunun saptanabilir düzeylerinin olmayışı ilginç bir gözlemdir. Kabul etmek gerekir ki bcl-2, ortamına bağımlı olarak eksprese olabilir; Ve kanserin dağılımı, kendine özgü stromal-epitelyal etkileşimler sonucudur. Sonuç olarak, androjen çekilme tedavisi, kemik iliği metastazları hariç, bcl-2 ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu artmış ekspresyon sonucu, malin hücre popülasyonunda *apoptozise dirençli bir fenotip* ortaya çıkmaktadır. Çalışma verileri göstermektedir ki, prostat kanseri birincil (primer) bir moleküler olaydan ziyade, androjen çekilmesini takiben, tümör nükslerinin *gelişimi ile ilişkili ikincil (sekonder) bir olaydır*. İlginç olarak, prostat küçük hücreli kanserleri da yüksek düzeyde bcl-2 ekspresyonu göstermektedir. Bu tümörler androjen çekilme tedavisine yanıtız olup, oldukça hızlı fatal gidiş göstermektedirler. Bu tümörlerdeki bcl-2 geni deregülasyonunun primer düzeyde bir patojenik olayı temsil edip etmediği araştırılmalıdır. Aihara ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (53), kansere komşu, tümör içermeyen prostat dokusunda çok düşük oranda apoptotik cisimcik izlenirken, kanser alanlarında yüksek düzeyde apoptotik cisimcik dikkati çekmiştir. İlginç ola-

rak, *apoptotik cisimcikler* ile artan Gleason derecelenmesi arasında *pozitif bir ilişki* saptanmıştır. Söz konusu pozitif ilişki göstermektedir ki: artan programlanmış hücre ölümü, Gleason derecelendirmesinin işaret ettiği *artan malin potansiyel* ile ilişkilidir.

*Meme kanseri hücrelerinde, bcl-2 ve p 53 gen ürünlerinin* programlanmış hücre ölümü ile ilişkisi araştırıldığında (54): iki proteinin ekspresyonları arasında *ters orantılı* bir ilişki saptanmıştır. Sonuçlar, mutant p 53'ün meme kanser hücrelerinde bcl-2 fonksiyonunun yerini alabileceğini, ayrıca bcl-2 ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. MCF-7 tipi kültür hücrelerinde mutant p 53 overekspresyonunun, hem protein hem m-RNA düzeyinde bcl-2 azalmasına yol açtığı izlenmiştir. Bcl-2'nin meme kanserinde oynadığı rolün tanınması klinik açıdan önemli sonuçlar doğurabilir: Örneğin, yüksek düzeyde bcl-2 ekspresyonu gösteren ve bilinen p-53 gen mutasyonu taşımayan meme kanser hücrelerinin, radyoterapi ve çeşitli kemoterapatik ajanlara daha dirençli olduklarını göstermek ilginç olabilir. Böyle olduğu takdirde, farklı prognostik değerlere sahip meme kanseri grupları tanımlanabilir. Allan ve arkadaşlarının bir çalışmasında, premenopozal dönemde fibroadenom, memenin kistik hastalığı ve kanser gibi nedenlerle uygulanan eksizyon veya ameliyat materyallerinin histolojik olarak 'normal' görünümlü alanlarında mitotik indeks, timidin labelling indeks ve apoptotik indeks ölçümleri yapılmıştır. Fibrokistik değişiklik gösteren meme ile kanser olgularında Apoptotik İndeks ve Apoptotik İndeks/Mitotik İndeks değerlerinde belirgin azalma izlenirken, fibroadenom olgularında bu değerlerde değişiklik gözlenmemiştir. Mitotik İndeks ve Labeling İndeks değerlerinde belirgin farklılık gözlenmediği dikkate alındığında: epitel hücrelerinde azalmış apoptozisin fibrokistik değişiklikler ve kanser gelişimi riskinin artışı ile ilişkisi olabileceği düşünülmüştür (55). Apoptozise eğilimin azalması birincil (primer) bir olay olabileceği gibi, dokunun farklılaşma modelinde bir

değişikliğe bağlı, ikincil (*sekonder*) bir olgu da olabilir. Öte yandan, Apoptozis ve meme kanseri metastazı mekanizmaları arasındaki bir karşılaştırma, iki süreç arasında önemli bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir. Metastatik yayılım sırasında hücreler epitelyal bazal membranı penetre ederek (delerek), stromaya girmek zorundadırlar. Damar içinde iken ve damar dışına çıkarılarken tümör hücrelerinin hücre dışı matriks ile etkileşimde bulunmaları ve onu parçalamaları gerekmektedir. Bunu yapmak için, tümör hücreleri kollejenaz IV gibi metaloproteazlar, stromelisin veya transin, plazminojen aktivatörleri, katepsin B ve katepsin D gibi bazı *proteazları* salgırlar (51). Meme epiteli bazal membranındaki hücre dışı matriks proteinlerinin, "interlökin-1 B-converting" enzimi (ICE) tarafından proteolizinin apoptozise yol açması ve ICE'nin baskılanması ile apoptozisin engellenmesi tümör gelişim mekanizması açısından ilginç bir örnek oluşturmaktadır (56).

*Karaciğerde bcl-2'nin hücresele dağılımına ilişkin bir immünohistokimyasal çalışmada*: 12 normal karaciğer, 33 tümör dışı hepatik lezyon, 46 benin veya malin karaciğer tümörü olgusu araştırılmıştır (57). Siroz ve fokal nodüler hiperplazi olgularında safra kanalında çoğalma gösteren epitel hücreleri bcl-2 için pozitif boyanma göstermiştir. 11 kolanjiokarsinom olgusundan 8'inde, 14 metastatik adenokarsinom olgusundan 6'sında bcl-2 pozitifliği saptandı. Hepatosellüler karsinomların (15 olgu) hiçbirisinde immünopozitiflik saptanmadı. Bu bulgular ışığında, büyük ve küçük safra kanalları epitel hücrelerinin *uzamış yaşam ve düşük dereceli çoğalma aktivasyonu* gösterebilecekleri ve en azından bazılarının hepatik öncül hücreler olabilecekleri düşünülmüştür. Ayrıca bcl-2 proteininin, *kolanjikarsinom* için bir *marker* olabileceği ve karaciğerin söz konusu iki primer tümörü arasında *ayırıcı tanıya yardımcı* olabileceği izlenimi doğmuştur. Bcl-2 ekspresyonunun epidermis ve barsak epiteli gibi hızlı olarak kendini yenileyen dokularda, *çoğalma gös-*

*teren hücresele komponentlere ve kök hücrelere ait olduğu bildirilmiştir. Çekirdekdeki bcl-2 ekspresyonunun ise hücre siklusu ile ilişkisi ve mitotik fazda yüksek ekspresyonu anlamlıdır* (58). Karaciğerde kök hücrelerin varlığı hala tartışmalı olmakla birlikte, bu hücrelerin varlığı ve periportal safra ductullerindeki yerleşimi bazı tartışmalarda öne sürülmektedir. Sıçanlarda kimyasal olarak uyarılmış hepatokarsinogenesiste kök hücreler uyarılabilmekte ve periportal alanlarda oval hücre çoğalmasına yol açabilmektedir (57). İskemik nekroza giden karaciğer dokusu, apoptozis morfolojisi göstermeden, belirgin DNA merdiven paterni gösterirken; en azından karaciğer hücrelerinde, kromatinin oligonükleozomal parçalara ayrılmasının apoptik hücre ölümüne özgü olmadığı gösterilmiştir.

In vitro kültür MCA-RH 7777 (Transplante Morris Hepatomu 7777) hücrelerinde ise DNA merdiven paterni, yalnızca apoptozisin karakteristik morfolojisine sahip hücrelerde saptanmıştır. Bu iki kriteri (*karakteristik morfoloji ve DNA merdiveni*) esas alarak, apoptotik sürecin transplante 7777 dokusunda oldukça aktive olduğu düşünülmektedir (59).

Bcl-2 proteininin çeşitli *keratinositik tümörlerde ve inflamatuvar deri hastalıklarında* ekspresyonu araştırıldığında (60): Bowen hastalığının % 73'nde, aktinik keratozun % 25'nde, bazal hücreli karsinomun % 67'sinde ve skuamöz hücreli karsinomun % 100'ünde belirgin bir bcl-2 ekspresyonu izlenmiştir; bu ekspresyon bazal hücreli kanser, Bowen hastalığı ve skuamöz hücreli kanserlerde lezyona sınırlı olup, çevre normal dokuda boyanma izlenmemiştir. İlginç olarak, atrofik tip Aktinik Keratoz olgularında bcl-2 ekspresyonu yokken, hipertrofik tip Aktinik Keratoz'da zayıf düzeyde bir bcl-2 pozitifliği saptandı. Keratinositik hücreli tümörlerde bcl-2 ekspresyonunun, keratinositlerde inflamasyona bağlı çoğalma olmadığı koşullarda, artmış hücre ömrüne bağlı olarak *tümör yönünde*

çoğalma ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Kolon mukozası kript epitelinde apoptotik cisimcik görülme sıklığı araştırılmış ve özellikle, 5-Fluorourasil başta olmak üzere nonsteroidal anti-inflamatuar ilaca bağlı kolitlerde insidansın arttığı ve her 100 kript için 5'den fazla apoptotik cisimcik görülen koşullarda "ilaç etkisi"nin düşünülmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. İlginç olarak, artan kript apoptozisleri inflamasyonla birlikte ve hem yüzey epiteli hem de lamina propria'da belirgin lenfosit artışı vardır. Tablonun mekanizması henüz açıklanamamakla birlikte "immünolojik" köken düşünülmektedir (61).

Walker ve arkadaşları erişkinde, akciğerin indifferan küçük hücreli karsinomu metastazi tanısı alan, Romanowsky tipi boyalar ile boyanmış kemik iliği aspirasyon materyallerinde paranükleer yerleşimli, mavi inklüzyonlar saptamışlardır. Bu inklüzyonlar 1-4 mikron çapında, küre şeklinde ve iyi sınırlı cisimcikler olarak tanımlanmışlardır. Ultrastrüktüel incelemeler ve Feulgen boyası ile yapılan araştırmalarda bu inklüzyonların, nükleer ve sitoplazmik materyal içeren fagositik lizozomlar (apoptotik cisimcikler)'i temsil ettiği düşünülmüştür (62). Bu araştırmayı temel alan Mullins ve arkadaşları söz konusu inklüzyonların akciğer küçük hücreli karsinomlarının, küçük hücreli olmayan karsinomlardan ve lenfomalardan ayırıcı tanısındaki rolünü irdelemek üzere değişik tekniklerle hazırlanan yayma, ince iğne aspirasyon ve dokundurma (imprint) materyallerinde yürüttükleri araştırmada benzer sonuçlar elde etmişler; yalnızca havada kurutulmuş ve Romanowski tipi solüsyonlarda boyanmış, akciğer küçük hücreli karsinomlarında bu apoptotik cisimcikleri gözlemişlerdir (63).

Renal hücre tümörlerin gelişimi ve ilerlemesinde bcl-2 deregülasyonunun rolünü araştırmak üzere yürütülen bir çalışmada (64): tüm olgularda yüksek düzeyde bcl-2 pozitifliği saptanmıştır. Bu olgularda bcl-2

m-RNA düzeylerinin de yüksek oluşu, renal hücreli karsinomlarda bcl-2 yüksekliğinin, artmış bcl-2 transkripsiyonu veya artmış mesaj stabilitesi olarak değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmüştür. Bcl-2 ekspresyonunun bcl-2 geninin deregülasyonu ile sonuçlanan mutasyonel olayları içeren bir seleksiyon süreci mi, yoksa böbrekte normal koşullarda, yüksek düzeyde bcl-2 ekspresyonu gösteren epitelyal hücrelerin malin transformasyon veya tümör progresyonuna yatkınlığını mı temsil ettiği araştırılmalıdır.

Nazofarinks karsinomlarında, Epstein-Barr virüs DNA'sı ve fenotipik profilleri ile bcl-2 proteininin ekspresyonu arasındaki ilişki insitu hibridizasyon, immünohistokimya ve immüno blotting teknikleri ile araştırılmıştır. Bcl-2, indifferansiyel nazofarinks karsinomlarının % 80'nde, keratinize karsinomların 1/3'ünde ve 2 nazofaringeal adenokarsinom olgusunda pozitif olarak saptanmıştır. Bcl-2 ekspresyonu ile EBV-DNA veya EBV fenotipik profilleri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (65).

Apoptozisin rutin histolojik kesitlerde tanınması oldukça güçtür. Yoğun DNA parçalanması bu sürecin önemli bir karakteristiğidir. DNA kırılmalarının görülebilir hale getirilmesi apoptotik hücrelerin tanınmasını çok kolaylaştıracaktır. Geleneksel parafin kesitlerde, Tdt ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biotinli dUTP) kullanılarak yapılan insitu işaretleme ardından floresan veya enzimatik görüntüleme (=TUNEL yöntemi) ile apoptotik hücreler ayırılabilir (66). Benzer şekilde formalinde fikse, parafine gömülü dokular için geliştirilen yeni bir boyama yöntemi, insitu-end-labelling-ISEL'in tümörlerde apoptozis araştırma-arına ivme ve yeni bir boyut kazandıracağına inanılmaktadır (67).

Kanser tedavisinde apoptozisin yeri nedir?

Bazı genlerin hücre ölümünün denetlenmesinde etkili olduklarının ve malign tümör gelişimine katkıda bulduklarının gözlen-

mesi, bu gen ve gen ürünlerini kanser tedavisinde ön plana çıkarmıştır. Mutasyona bağlı overekspresyon sonucu malignitenin gelişimine katkıda bulunan ve apoptozisi engelleyen bir protein, saldırılmak için *iyi bir hedef*dir. Çünkü bu proteinin ekspresyonunu azaltmak tümör hücresinin kendiliğinden ölümüne yol açabileceği gibi; aynı zamanda sitotoksik ilaçlara karşı artan tümör direncini de önleyecektir. Kanser kemoterapisinin güncel sorunu, bir çok hücre grubunun sitotoksik ilaçlara karşı direnç göstermesidir. Bu durum, birçok tümörün bazı genlerdeki mutasyon sonucu geliştikleri gerçeğine de bağlı olabilir. Bir çok araştırma bcl-2 geninin over-ekspresyonu sonucu tümör hücrelerinin bir çok sitotoksik kemoterapik ilaca karşı direnç kazandığını göstermektedir (68).

Birçok in vitro çalışmanın sonuçları, tümör hücrelerinin çoğunda apoptozis yolunun kolayca açılabilirdiğini göstermektedir. Sitotoksik ilaçlar, düşük dozlarda, apoptozisi uyurabilmektedir. Bu nedenle, hücre ölümünü denetleyen genleri hedef alarak, tümör hücrelerinin sitotoksik kemoterapötiklere karşı *duyarlılığını değiştirmeyi* he-

defleyen çalışmalar yapılmaktadır. Bu stratejinin öncelikli hedefleri: bcl-2' yi etkisizleştiren (direkt yolla veya hücre içi eşî bax'la etkileşimini düzenleyerek), p 53'ün işlevini düzelten ya da etkilerini taklit eden ve bcr-abl ekspresyonunu düzenleyen ya da dengeleyen ilaçlar geliştirmektedir. Apoptozis araştırmaları özellikle kanserle savaşta 'yepyeni bir kulvar' açmış bulunmaktadır.

Kanser kemoterapisini yönlendirmek amacıyla, tümör hücre apoptozisinin desteklenmesi önemli bir tedavi modeli olarak düşünülürken AIDS'te lenfosit apoptozisinin engellenmesi bir tedavi şansı olarak karşımıza çıkmaktadır. RNA ve protein sentezini önleyen ajanlar ile lösemi hücrelerinin apoptozisi arttırılmaktadır. Artmış nöron ölümü ya da nöron hasarı ile karakterize *nörolojik hastalıklarda* apoptozisin bloke edilmesi temelinde bir tedavi modeli araştırılmaktadır. *Myokard enfarkti*sünde apoptozisi bloke eden ilaç uygulamasının, enfarkt alanını küçülteceği düşünülmektedir. Hücrenin apoptotik ölüm modelinin iyi anlaşılması, organizmadaki birçok patolojinin tanı ve tedavisi açısından önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Raff MC. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. *Science*. 1993 ; 262 : 695-700
2. Acheson A. A BDNF autocrine loop adult sensory neurons prevent cell death. *Nature* 1995 ; 374 : 450-3.
3. Arends MJ, Wyllie AH, Apoptosis: Mechanism and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol*. 1991 ; 32 : 223-54.
4. Ellis RE. Mechanisms and functions of cell death *Annu Rev Cell Biol* 1991 ; 7 : 663-98.
5. Schwartz LM. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1993 ; 90 : 980-4.
6. Cohen J. Apoptosis. *Hosp Pract*. 1994 ; 2(2) : 115.
7. Cohen J. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest*. 1993 ; 103(3) : 99.
8. Schoen FJ. Apoptosis. edr. Cotran RS. Kumar V. Robbins SL in *Robbins Pathologic Basis of Disease*. 5th. ed. Philadelphia: Saunders Comp. 1994 : 17-21.

9. Kerr JFR. Harmon B. Searle J. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibres *J Cell Sci*. 1974 ; 14 : 571-35.
10. Searle J. Lawson TA. Abbott PJ. Harmon B. Kerr JFR. An electron-microscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cell *J Pathol*. 1975 ; 116 : 129-38.
11. Wyllie AH. Beattie GJ. Hargreaves AD. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J*. 1981 ; 13 : 681-92.
12. Wyllie AH. The biology of cell death in tumors. *Anticancer Res*. 1985 ; 5 : 131-136.
13. Potten CS. Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and irradiation. *Nature*. 1977 ; 269 : 518-21.
14. Wyllie AH. Kerr JFR. Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980 ; 68 : 251-306.
15. Walker NI. Harmon BV. Gobe GC. Kerr JFR. Patterns of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*. 1988 ; 13 :

18-54.

16. Cooper DMF. Adenyl cyclases and the interactions between calcium and cAMP signalling. *Nature* 1985 ; 374 : 421-24.
17. Cohen JJ. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. *Chest*. 1993 ; 103 : 99-101
18. Hicotera P. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*. 1994 ; 16 : 279-88.
19. Vintermyr OK. Microinjected catalytic subunit of cAMP dependent protein kinase induces apoptosis in myeloid leukemia (IPC-81) cells. *Exp Cell Res*. 1993 ; 206 : 157-61.
20. McConkey DJ. Cyclic AMP potentiates glucocorticoid induced endogenous endonuclease activation in thymocytes. *FASEB J*. 1993 ; 7 : 580-85.
21. Walker PR. Relationship between apoptosis and the cell cycle in lymphocytes: roles of protein kinase C, tyrosine phosphorylation and AP 1. *Exp Cell. Res*. 1993 ; 207 : 142-51.
22. Batistatou A, Greene LA. Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. *J. Cell Biol*. 1993 ; 122 : 523-32.
23. Dybbukt JM. Different pro-oxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis or produce necrosis. *J. Biol Chem*. 1994 ; 296 : 30553-60.
24. Shearman MS. Inhibition of PC 12 cell redox activity is a specific, early indicator of the mechanisms of beta-amyloid mediated cell death. *Proc. Natl Acad Sci. USA*. 1994 ; 91 : 1470-4.
25. Delic Z. Ubiquitin pathway involvement in human lymphocyte gamma irradiation induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. 1993 ; 13 : 4875-53.
26. Darzynkiewichs Z. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 1992 ; 13 : 795-808.
27. Bellomo G, Perotti M, Taddei F, Mirabelli F, Finardi G. Tumor necrosis factor induces apoptosis in mammary adenocarcinoma cells by an increase in intracellular free Ca concentration and DNA fragmentation. *Cancer Res*, 1992 ; 52 : 1342-6.
28. Wright SC, Kumar P, Tam AW, Shen N, Varma M. Apoptosis and DNA fragmentation precede TNF-induced cytolysis in U937 cells. *J Cell Biochem* 1992 ; 48 : 344-55.
29. Curson C, Weedon D. Spontaneous regression in basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*. 1979 ; 6 : 432-7.
30. Bursch W, Lauer B, Timmermann-Trosiener I, Bartel G, Schippler J. Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters. *Carcinogenesis*. 1984 ; 5 : 453-8.
31. Columbano A, Ledda-Columbano GM, Rao PM, Rajalakshmi S, Sarma DSR. Occurrence of cell death (apoptosis) in preneoplastic and neoplastic liver cells: a sequential study. *Am J Pathol*. 1984 ; 116 : 441-6.
32. Bissonette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*. 1992 ; 359 : 552-4.
33. Clarke AR. Thymocyte apoptosis induced by p53 dependent and independent pathways. *Nature*. 1993 ; 362 : 849-52.
34. Qin XO. Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53 mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994 ; 91 : 10918-22.
35. Hermeking H, Eick D. Mediation of c-myc induced apoptosis by p53. *Science*. 1994 ; 265 : 2091-3.
36. Strasser A. DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cell via p53 independent mechanism inhibitable by Bcl-2. *Cell*. 1994 ; 79 : 329-39.
37. Myashita T. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and vivo. *Oncogene*. 1994 ; 9 : 1799-805.
38. Wyllie A. Cell death. *Int Rev Cytol*. 1987 ; 17 (Suppl) : 755-85.
39. Buttyan R, Zakari Z, Lockshin R, Wolgemuth D. Cascade induction of c-fos, c-myc, and heat shock 70K transcripts during regression of the rat ventral prostate gland. *Mol Endocrinol*. 1988 ; 2 : 650-7.
40. Kerr JFR, Searle J. A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J. Pathol*. 1972 ; 107 : 41-4 .
41. Currie AR, Kerr JFR, Scott GB. Regression of endocrine-dependent mammary tumors: the role of apoptosis. *Br J Cancer*. 1972 ; 26 : 239-57.
42. Kerr JFR, Searle J. Apoptosis: its nature and kinetic role. In: Meyn RE, Whithers HR, edr. *Radiation Biology in Cancer Research*. New York: Raven Press, 1980 : 367-84.
43. Searle J, Lawson TA, Abbott PJ, Harmon B, Kerr JFR. An electronmicroscope study of the mode of cell death induced by cancer-chemotherapeutic agents in populations of proliferating normal and neoplastic cells. *J Pathol*. 1975 ; 116 : 129-38.
44. Harmon BV, Takano YS, Winterford CM, Gobe GC. The role of apoptosis in the response of cells and tumors to mild hyperthermia. *Int J Radiat Biol*. 1991 ; 59 : 489-501.
45. Szende B, Srkalovic G, Groot K, Lapis K, Schally AV. Growth inhibition of mouse MXT mammary tumor by the luteinizing hormone-releasing hormone antagonist SB-75. *J Natl Cancer Inst*. 1990 ; 82 : 513-7.
46. Kerr JFR. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*. 1971 ; 105 : 13-20.
47. Gobe GC, Axelsen RA, Searle JW. Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest*. 1990 ; 63 : 770-9.
48. Krajewski S, Krajewska M, Shabaik A, Wang HG, Irie S. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of bcl-2 expression. *Cancer Res*. 1994 ; 54 : 5501-7.
49. Hockenbery M, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in

tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl Acad Sci. USA.* 1991 ; 88 : 6961-5.

50. Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. Bcl-2 Heterodimerizes in vivo with a conserved homolog Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993 ; 74 : 609-19.

51. Tenniswood MP, Guenette RS, Lakins J, Mooibroek M, Wong P. Active cell death in hormone-dependent tissues. *Cancer Metastasis Rev.* 1992 ; 11 : 197-220.

52. McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, Logothetis C, Chung LWK. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res.* 1992 ; 52 : 6940-4.

53. Aihara M, Truong LD, Dunn JK, Wheeler TM, Scardino PT. Frequency of apoptotic bodies positively correlates with Gleason grade in prostate cancer. *Hum Pathol.* 1994 ; 25 : 797-801.

54. Haldar S, Negrini M, Monne M, Sabbioni S, Croce CM. Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.* 1994 ; 54 : 2095-7.

55. Allan DJ, Howell A, Roberts SA, Williams JT, Watson RJ. Reduction in apoptosis relative to mitosis in histologically normal epithelium accompanies fibrocystic change and carcinoma of the premenopausal human breast. *J Pathol.* 1992 ; 167 : 25-32.

56. Boudreau N. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995 ; 267 : 891-3.

57. Charlotte F, L'Hermine A, Martin N et al. Immunohistochemical detection of bcl-2 protein in normal and pathological human liver. *Am J Pathol.* 1994 ; 144 : 460-5.

58. Lu QL, Hanby AM, Masser HMA, Gschmeissner SE, Lu PJ, et al. *J Cell Sci.* 1994 ; 107 (Pt 2) : 363-71.

59. Fukuda K, Masamichi K, Chiu JF. Demonstration of extensive chromatin cleavage in transplanted Morris hepatoma 7777 tissue: Apoptosis or necrosis? *Am J Pathol.*

1993 ; 142(3) : 635-46.

60. Nakagawa K, Yamamura K, Maeda S, Ichihashi M. Bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. *Cancer.* 1994 ; 74 : 1720-4.

61. Lee FD. Importance of apoptosis in the histopathology of drug related lesions in the large intestine. *J Clin Pathol.* 1993 ; 46(2) : 118-22.

62. Walker WP, Wittehow RJ, Bottles K, Layfield, Hirschowitz S. Paranuclear blue inclusions in small cell undifferentiated carcinoma. *Diagn Cytopathol.* 1994 ; 10 : 212-5.

63. Mullins RK, Thompson SK, Coogan PS, Shurbaji MS. Paranuclear blue inclusions: An aid in the cytopathologic diagnosis of primary and metastatic pulmonary and metastatic pulmonary small cell carcinoma. *Diagn Cytopathol.* 1994 ; 10 : 332-5.

64. Chandler D, Adel KE, Brisbay S, Redline RW, McDonnell TJ. Apoptosis and expression of the bcl-2 protooncogene in the fetal and adult human kidney. *Hum Pathol.* 1994 ; 25 : 789-96.

65. Lu QL, Elia G, Lucas C, Thomas JA. Bcl-2 protooncogene expression in Epstein-Barr-virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 1993 ; 53(1) : 29-35.

66. Gorczyca W. Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.* 1993 ; 53 : 1945-51.

67. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van de Velde CJ. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem.* 1993 ; 41(1) : 7-12.

68. Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, et al. BCL-2 modulation of apoptosis is induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res.* 1993 ; 53 : 3321-6.