

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LÖSEMİ HASTALARINDA KASPAZ 3 VE KASPAZ 9 GEN
POLİMORFİZMLERİ VE ENZİM DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melek MUNİROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Etem AKBAŞ

MERSİN-2015

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**LÖSEMİ HASTALARINDA KASPAZ 3 VE KASPAZ 9 GEN
POLİMORFİZMLERİ VE ENZİM DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melek MUNİROĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Etem AKBAŞ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

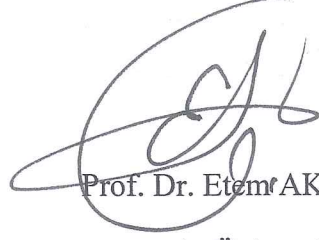
BAP-SBE TB(MM) 2011-5 YL kodlu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:277

MERSİN-2015

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan "Lösemi Hastalarında Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Gen Polimorfizmleri ve Enzim Düzeylerinin Araştırılması" başlıklı çalışma jürimiz tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

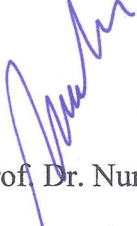


Prof. Dr. Etem AKBAŞ

Mersin Üniversitesi

Jüri Başkanı

Tez Savunma Tarihi: 30/04/2015



Prof. Dr. Nurcan ARAS

Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN

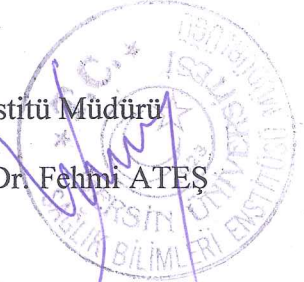
Mersin Üniversitesi

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulu'nun15.05.2015.....tarih ve2015/158.....sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Doç. Dr. Fehmi ATES



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, akademik açıdan yetişmemde büyük katkısı olan, danışman hocam Prof. Dr. Etem AKBAŞ'a, tezimin hazırlanması boyunca gösterdiği özveri ve bilimsel katkıdan dolayı teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız, Sn. Prof. Dr. M. Emin ERDAL'a ve anabilim dalımızın diğer değerli hocalarına yüksek lisans eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkıdan dolayı teşekkür ederim. Hasta ve kontrol gruplarını temin etmemdeki çalışmaları için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı hocalarından Sayın Prof. Dr. E. Naci TİFTİK'e, ve Yrd. Doç. Dr. Anıl TOMBAK'a; deneysel aşamada yardımlarını ve akademik desteğini esirgemeyen Eczacılık Fakültesi hocalarından Sayın Prof. Dr. Serap YALIN'a ve Öğr. Gör. Mehmet BERKÖZ'e; deney sonuçlarımın istatistiksel olarak değerlendirilmesi ve yorumlanmasında bilgi ve katkılarını sunan Biyoistatistik Anabilim Dalı hocalarından Öğr. Gör. Gülhan OREKECİ TEMEL'e; tezimin hazırlanmasında yardımlarını eksik etmeyen değerli çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan, her anlamda beni destekleyen, eğitimimin akademik yönde devam etmesini sağlayan, en değerlilerim olan ailem ve eşim Fırat MUNİROĞLU'na; yoğun çalışma dönemimde istemeyerek de olsa ihmal ettiğim ama yine de bir gülümsemesiyle tüm zorlukları bana unutturan biricik oğlum Ali'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Lösemi Hakkında Genel Bilgiler	3
2.1.1. Tanımlama ve Tarihçe	3
2.1.2. Lösemilerin Sınıflandırılması	4
2.1.2.1. Akut Miyoblastik Lösemi	5
2.1.2.2. Akut Lenfoblastik Lösemi	6
2.1.2.3. Kronik Miyoblastik Lösemi	6
2.1.2.4. Kronik Lenfoblastik Lösemi	8
2.1.3. Löseminin Epidemiyolojisi	8
2.1.4. Löseminin Etiyolojisi	9
2.1.4.1. Kalıtsal Faktörler	9
2.1.4.2. Çevresel Faktörler	10
2.2. Apoptoz	11
2.2.1. Apoptozun Tanımı ve Tarihçesi	11
2.2.2. Apoptozun Genel Özellikleri	12
2.2.3. Apoptozun Gerçekleşme Aşamaları ve Moleküler Mekanizması	15

2.2.3.1. Apoptozun Başlatılma Fazı	16
2.2.3.1.1. Ekstrinsik Yolak (Ölüm Reseptörleri Yolu)	19
2.2.3.1.2. İntrensik Yolak (Mitokondriyal Yol)	21
2.2.4. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	22
2.2.4.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemi	23
2.2.4.1.1. Işık Mikroskopisi	23
2.2.4.1.2. Elektron Mikroskopisi	23
2.2.4.1.3. Faz Kontrast Mikroskopisi	24
2.2.4.1.4. Floresan Mikroskobu/Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı	24
2.2.4.2. Histokimyasal Yöntemler	25
2.2.4.2.1. Anneksin V Yöntemi	25
2.2.4.2.2. TUNEL Yöntemi	25
2.2.4.2.3. Kaspaz 3 Yöntemi	26
2.2.4.2.4. M30 Yöntemi	26
2.2.4.2.5. Biyokimyasal Yöntemler	27
2.2.4.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi	27
2.2.4.2.7. Western Blotting Yöntemi	27
2.2.4.2.8. Flow Sitometri Yöntemi	27
2.2.4.3. İmmunolojik Yöntemler	28
2.2.4.3.1. ELISA Yöntemi	28
2.2.4.3.2. Fluorimetrik Yöntem	28
2.2.4.4. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	28
2.2.4.4.1. DNA Microarray Teknolojisi	28
2.2.5. Apoptozun Lösemi ve Diğer Hastalıklarla İlişkisi	29
2.3. Kaspazlar	30
2.3.1. Kaspazların Yapısı ve Kaspaz Türleri	31
2.3.1.1. Sitokin Aktivasyonu Yapan (Enflamatuvar) Kaspazlar	32
2.3.1.2. Başlatıcı Kaspazlar	33
2.3.1.3. Apoptozu Yürüten (Efektör) Kaspazlar	33
2.3.2. Kaspazların Aktivasyonu	33
2.3.3. Apoptozda Kaspaz 3 ve Kaspaz 9'un Önemi	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	36
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	36

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.1.3. Kan Serumunun Ayrılması	37
3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması	38
3.3. Kaspaz 3 G>T rs4647601 ve Kaspaz 9 A>G rs4645978 Polimorfizmlerinin RealTime PCR Yöntemiyle Moleküler Genetik Analizi	38
3.3.1. DNA İzolasyonu	38
3.3.2. Kalite ve Konsantrasyon Testi	39
3.3.3. Primer ve Prob Sentezi	39
3.3.4. Örnek Mikslerinin Hazırlanması	40
3.3.5. RealTime PCR Reaksiyon Ortamının Hazırlanması	41
3.4. Kan Serumunda Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Düzeylerinin Ölçümü	42
3.4.1. Kaspaz 9 Enzim Düzeyinin Belirlenmesi	42
3.4.2. Kaspaz 3 Enzim Düzeyinin Belirlenmesi	43
3.5. İstatistiksel Analizler	44
4. BULGULAR	45
4.1. RealTime PCR ile İlgili Bulgular	46
4.1.1. Kontrol Grubu ve Lösemi Hastalarında Kaspaz 3 G>T rs4647601 ve Kaspaz 9 A>G rs4645978 Polimorfizmlerine Ait Allel ve Genotip Frekanslarının Değerlendirilmesi	47
4.1.1.1. Kaspaz 3 G>T rs4647601 Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Frekansları	47
4.1.1.2. Kaspaz 9 A>G rs4645978 Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Frekansları	49
4.2. Kontrol Grubu ve Lösemi Hastalarında Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Düzeylerinin Değerlendirilmesi	51
4.2.1. Kaspaz 3 Enzim Düzeyinin Değerlendirilmesi	51
4.2.2. Kaspaz 9 Enzim Düzeyinin Değerlendirilmesi	52
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	59
7. KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Normal kandaki ve lösemi kanındaki eritrosit / lökosit hücreleri.....	3
Şekil 2.2. Hematopoetik farklılaşma.....	5
Şekil 2.3. t(9;22) translokasyonunun kırık noktalarının ve Ph kromozomunun şematik gösterimi.....	7
Şekil 2.4. C. elegans modelinde hücre ölüm mekanizmasının temel komponentleri.....	11
Şekil 2.5. Kurbağa, C. elegans ve insanda apoptoz.....	15
Şekil 2.6. Apoptotik sürecin gösterimi.....	16
Şekil 2.7. Apoptozun moleküler mekanizması.....	18
Şekil 2.8. Ekstrinsik ve intrinsik yollar.....	20
Şekil 2.9. Apoptoz sırasında hücre içi sinyallerle aktifleşen mitokondriyal yol.....	22
Şekil 2.10. Elektron mikroskopisi ile nukleus fragmantasyonunun gözlenmesi.....	24
Şekil 2.11. Faz kontrast mikroskopisi görüntüleri.....	24
Şekil 2.12. TUNEL metodu uygulanmış spinal kord görünümü.....	26
Şekil 2.13. Kaspaz kaskadı.....	32
Şekil 4.1. Kaspaz 3 G>T rs4647601 polimorfizmi allel oranlarının kontrol grubu ve lösemi hastaları arasındaki dağılımı (%).....	48
Şekil 4.2. Kaspaz 3 G>T rs4647601 polimorfizmi genotip oranlarının kontrol grubu ve lösemi hastaları arasındaki dağılımı (%).....	48
Şekil 4.3. Kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizmi allel oranlarının kontrol grubu ve lösemi hastaları arasındaki dağılımı (%).....	50
Şekil 4.4. Kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizmi genotip oranlarının kontrol grubu ve lösemi hastaları arasındaki dağılımı (%).....	50
Şekil 4.5. Kaspaz 3 enzim düzeyinin kontrol grubu ve lösemi hastaları arasındaki dağılımı.....	52
Şekil 4.6. Kaspaz 3 enzim düzeyinin kontrol grubu ve lösemi hastaları arasındaki dağılımı.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Apoptoz ve Nekroz Özelliklerinin Karşılaştırılması.....	13
Çizelge 2.2. Apoptozu Baskılayan ve Apoptozu Tetikleyen Genler.....	19
Çizelge 2.3. Kaspaz Türleri.....	32
Çizelge 3.1. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9'un Oluşum Yolağındaki Gen Polimorfizmleri.....	42
Çizelge 3.2. Gen Bölgesini Çoğaltmak için Kullanılan Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Primer Dizileri.....	42
Çizelge 3.3. Master Mix ile Hazırlanan Reaksiyon Hacmi ve RealTime PCR Protokolü.....	44
Çizelge 4.1. Kontrol Grubu ve Lösemi Hastalarının Cinsiyete Göre Dağılımı ve Yaş Ortalamaları.....	48
Çizelge 4.2. Kontrol Grubu ve Lösemi Hastalarının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı.....	49
Çizelge 4.3. Kaspaz 3 G>T rs4647601 Polimorfizmi Genotip ve Allel Oranlarının Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı.....	51
Çizelge 4.4. Kaspaz 9 A>G rs4645978 Polimorfizmi Genotip ve Allel Oranlarının Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı.....	53
Çizelge 4.5. Kaspaz 3 Enzim Düzeylerinin Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı (ng/ml).....	55
Çizelge 4.6. Kaspaz 9 Enzim Düzeylerinin Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı (ng/ml).....	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABL	: Abelson Murine Leukemia
AIF	: Apoptoz Uyarıcı Faktör
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Miyoblastik Lösemi
APAF1	: Apoptotic Protease Activating Factor 1
Apo	: Apolipoprotein
ASP	: Aspartik Asit
ATP	: Adenozin Trifosfat
bç	: Baz Çifti
Bad	: Bcl-2 associated Aganist of Cell Death
Bak	: Bcl-2 Antagonist / Killer
Bax	: Bcl-2 Associated X Protein
BCL	: B-cell Lymphoma
BCR	: Breakpoint Cluster Region Gene
Bid	: BH3-interacting Domain Aganist
Bim	: Bcl-2 Interacting Caspases
Bmf	: Bcl-2 Modifying Factor
Bik	: Bcl-2 İnteracting Killer
CD	: Cluster of Differentiation
CDK	: Cyclin-Dependent Kinases
Ced	: C. elegans Cell Death Gene
C. elegans	: Caenorhabditis elegans
CSF	: Colony Stimulating Factor
CARD	: Caspase Recruitmend Domain
DED	: Death Domain
DISC	: Death Inducing Signalling Complex
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilendimetiltetraasetik Asit
FADD	: Fas- associated Death Domain
FAS	: Fas Cell Surface Death Receptor
FASL	: Fas Ligandı

HB	: Hematoksilen Boyama
HIV	: Human Indeficiency Virus
HTrA2	: 5-hydroxytryptamine Receptor A
IAP	: Inhibitors of Apoptosis
ICE	: Interleukin-1 β -Converting Enzyme
IGF	: Insulin-like Growth Factor
IPNV	: Infectious Pancreatic Necrosis Virus
IL	: Interleukin
KLL	: Kronik Lenfoblastik Lösemi
KML	: Kronik Miyoblastik Lösemi
Kaspaz	: Cystein-dependent Aspartate-specific Proteases
LOH	: Loss of Heterozygosity
Mcl	: Myeloid Cell Leukemia
ml	: Mililitre
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NGF	: Nerve Growth Factor
Ph	: Philadelphia
PS	: Fosfotidilserinin
RIP	: Recetor-İnteracting Protein
SCCHN	: Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck
SCE	: Sister Chromatid Exchange
SMAC	: Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
TRADD	:TNFR-1 Associated Death Domain
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl Tranferase biotin- dUTP Nick End Labeling
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TNFR	: Tumor Necrosis Factor Receptor
UV	: Ultraviolet Rays
μl	: Mikrolitre

ÖZET

Lösemi Hastalarında Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Gen Polimorfizmleri ve Enzim Düzeylerinin Araştırılması

Lösemnin anlaşılabilmesi ve erken tanı ile tedavinin gerçekleştirilebilmesi için lösemnin gelişmesi sırasında meydana gelen moleküler değışiklikler araştırılmalıdır. Apoptoz, kontrollü hücre ölümüdür ve hematopoetik hücrelerde görev alan önemli mekanizmalardan biridir. Çalışmamızda apoptozu yürütme ve sonlandırma görevi olan kaspaz 3 G>T (GCG → TCG) rs4647601 polimorfizmi ile apoptozu başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9 -1263A>G rs4645978 polimorfizminin yanı sıra kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim düzeylerinin lösemiye yakalanma riskine olası etkilerini belirlemeyi hedefledik.

Çalışmamız Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji bilim dalı polikliniklerinde lösemi tanısı konmuş yaş ortalaması 56 olan 100 lösemi hastası ve yaş ortalaması 54.155 olan 100 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu olmak üzere toplam 200 bireyden oluşturuldu. Her iki gruba ait kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı ve genotipler Real Time PCR yöntemiyle belirlendi. Ayrıca her iki gruptan alınan kan örneklerinden elde edilen serumda kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim düzeyleri ölçüldü.

Kaspaz 3 G>T rs4647601 ve kaspaz 9 -1263A>G rs4645978 polimorfizmlerine ait allel ve genotip oranları ile lösemi arasında ilişki olmadığı belirlendi. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim düzeylerinin lösemiye yakalanma riskini arttırdığı saptandı. İleri yaşın ve erkek cinsiyetin lösemiye yakalanma riskini arttırdığı saptandı.

Çalışmamız Mersin ili örneklemindeki Türk toplumunda kaspaz 3 ve kaspaz 9'un ilgili polimorfizmlerinin ve enzim düzeylerinin lösemi ile ilişkisini belirlemek amacıyla yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışmanın ilgili polimorfizmlerle yapılacak diğer çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Polimorfizm, Kaspaz 3, Kaspaz 9, Lösemi

ABSTRACT

Investigation for Polymorphisms of Caspase 3 and Caspase 9 Gene and Enzym levels in Leukemia Patients

For understanding of leukemia and treated with early diagnosis , it should be investigated molecular changes that occur during the development of leukemia. Apoptosis is a controlled cell death and it's one of the important mechanisms in hematopoietic cells. In our study, we investigated caspase 3 which execution and termination of apoptosis, G>T (GCG → TCG) rs4647601 polymorphism and caspase 9 which apoptosis initiator caspase, -1263A>G rs4645978 polymorphism. Besides that we aimed to determine caspase 3 and caspase 9 enzyme levels possible effects on the risk of developing leukemia.

Our study's volume is including the mean age 56 of 100 individuals who have taken leukemia diagnosis have accepted as patients and 100 healthy individuals with the mean age of 54,155 as control group, for a total of about 200 people who were diagnosed with leukemia in policlinics of Mersin University Medical Faculty Hematology Department. From both of the groups' blood samples sequent of DNA isolation the genotypes detected by using Real-Time PCR for caspase 3 and caspase 9 polymorphisms. On the other hand we measured caspase 3 and caspase 9 enzyme levels in serum which obtained from blood samples.

Caspase 3 G>T rs4647601 polymorphism's alleles and genotype rates was determined not associated with leukemia. Likewise, caspase 9 A>G rs4645978 polymorphism's alleles and genotype rates was determined not show correlation with leukemia. Caspase 3 and caspase 9 enzyme levels was found to increase the risk of developing leukemia. To the risk factors in terms of developing leukemia; the risk of advanced age and male sex statistically significant with leukemia.

Our study is the first example of caspase 3 and caspase 9 gene's allele and genotype rates and enzyme levels in leukemia patients in Mersin province's sample of the Turkish population. This study is thought to be a guide for other studies about this caspase 3 and caspase 9 gene's polymorphisms ve enzyme levels.

Key Words: Polymorphism, Caspase 3, Caspase 9, Leukemia

1. GİRİŞ

Lösemiler kan hücrelerinin üretildiği kemik iliğinin klonal habis hastalıklarıdır. Aşırı çoğalan fakat tam olarak farklılaşamayan lökositler, kemik iliği, karaciğer, dalak, merkezi sinir sistemi ve diğer iç organları istila edebilir. Bu hücreler fazlaca üretilmesine karşın, farklılaşmadığı için fonksiyonunu yapan hücre sayısı giderek azalır ve bu hücrelerin sitopenik durumları gözlenir (1). Genel olarak lösemiler tüm kanserlerin % 8'ini oluştururlar. Erkeklerde lösemi daha sık gözlenmektedir. Ayrıca beyaz ırkta da daha siktir. Yetişkinlerde lösemi tanısı konma sıklığı çocuklardan 10 kat daha fazladır ve yaşla birlikte risk artar (2).

Malign hastalıkların etyolojisinde genetik materyalin önemli rol oynadığı moleküler ve sitogenetik gelişmelerle net bir şekilde açığa çıkmaktadır (1,3). Lösemilerin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte mültifaktöriyel olduğu düşünülmektedir (4). Özellikle ailesel lösemi olgularının tahmin edilenden fazla olması, genetik faktörün lösemi etyolojisinde önemine işaret etmektedir (5).

Normal gelişimin ve hastalıklarla bağlantılı patolojik durumların bir ögesi olarak ortaya çıkabilen 'programlanmış hücre ölümü' denilen apoptoz, çok hücreli pek çok canlıda bulunmuştur (6). Apoptozda hücre, fonksiyonlarını geri dönüşümsüz olarak kaybeder. Apoptoz normal hücre popülasyonunun yoğunluğunun sağlanmasında önemlidir ve apoptoz ile sağlanan hücre ölümünün baskılanması, kanser gelişiminin de belirleyicisidir (6-8). Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden (intrinsik) veya hücre dışından (ekstrinsik) gelebilir (9). Memelilerde apoptozun iki mekanizması vardır. Bu mekanizmalar; ölüm reseptörleri yolu (ekstrinsik) ve mitokondriyal (intrinsik) yoldur (8-10).

Lösemilerde ve malign tümörlerde hücre çoğalması ve hücre apoptozu arasındaki denge bozulmuştur. Apoptoz mekanizmasının çalışmamızla ilgili olan kısmı mitokondriyal yoldur. Bu yolda, gelen sinyaller sonucu membran geçirgenliği bozulmuş olan mitokondrilerden sitokrom c'ler salınarak Apaf 1 ve başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9 ile birleşerek apoptozom oluşmaktadır. Apoptozom başlangıçta inaktif halde bulunan sonlandırıcı kaspazlardan olan prokaspaz 3 ile birleştikten sonra prokaspaz 3, kaspaz 3 formuna dönüşerek aktifleşmekte ve sonuç olarak apoptoz gerçekleştirilmektedir (8,9).

Kaspazlar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunur. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon zinciri başlar (8,10). Kaspaz türleri 3'e ayrılmaktadır. Bunlar: Başlatıcı kaspazlar, etkili (efektör)

kaspazlar ve enflamatuvar kaspazlardır. Bizim alışmamızda kaspaz 3 ve kaspaz 9'u seçmemizin nedeni bunlardan birinin başlatıcı diğerinin sonlandırıcı (etkili) kaspaz olmasının yanı sıra ikisinin de mitokondriyal yolda görev alıp birbiriyle ilişki içerisinde olmalarından kaynaklanmaktadır.

Çalışmamızın amacı; apoptoz mekanizmasında önemli rollere sahip ve farklı kanser türleri için kanser oluşumu riskine etkisi olduğu belirlenmiş olan kaspaz 3'n intron 1 bölgesinde yer alan G>T (GCG'nin TCG'ye dönüşümü) 4647601 rs numaralı polimorfizminin ve kaspaz 9'un promotor bölgesinde yer alan -1263 A>G 4645978 rs numaralı polimorfizminin yanı sıra kaspaz 3 ile kaspaz 9'un serumda enzim düzeylerini ölçerek bu polimorfizm ve enzim düzeylerinin lösemi ile ilişkili olup olmadığını tanımlamaya çalışmaktır.

Bu alışma Mersin rneklemi temelinde Türk toplumunda kaspaz 3 ve kaspaz 9'un lösemi hastalarında polimorfizmlerinin ve enzim düzeylerinin bakıldığı ilk çalışma olması bakımından zgndr.

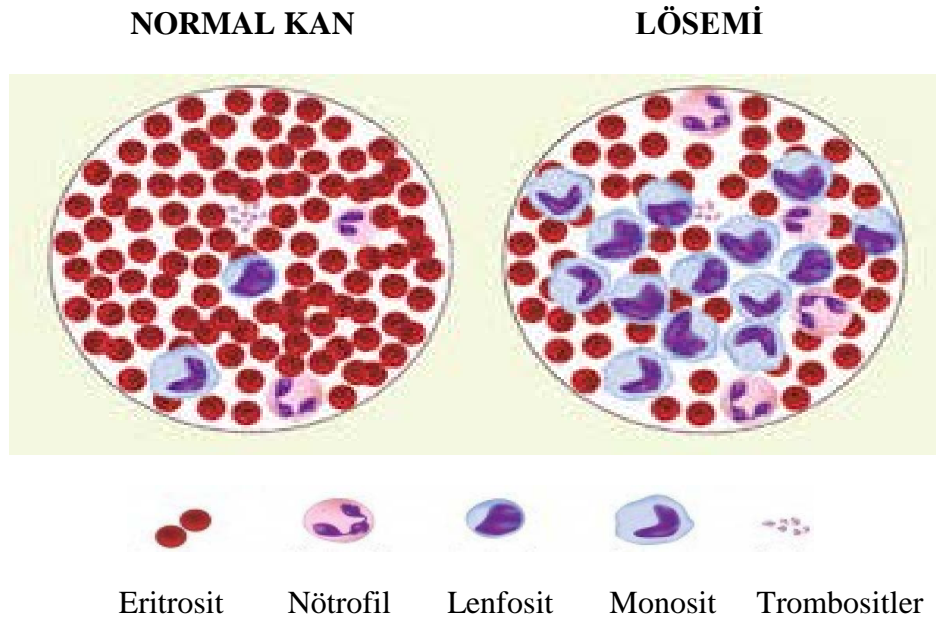
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lösemi Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Tanımlama ve Tarihçe

Hematoloji deyimini ilk kez Thomas Schwenke tarafından 1743’de kullanılmıştır (11). Velpeau, lösemi ile ilgili ilk vaka bildirimini gerçekleştirmiştir (12). Bu hastalığı ilk gözlemleyen Donne, ilk klinik makale oluşturan John Hughes Bennett’ dir. Hastada lösemnin mikroskobik tanısı 1846’da ilk kez Henry Fuller tarafından gerçekleştirilmiştir.

Lösemi ile ilgili ikinci olgu ise 1847’de Virchow tarafından rapor edilmiştir. Virchow; 1847’de yayınladığı makalesinde, alt abdomende dört yıldır şişlik şikayeti olan 50 yaşlarındaki hastanın ölümü sonrasında yaptığı inceleme sonucunda, damarların her yerinde iltihaba benzer bir oluşum ile birlikte değişik şekillerde hücre oluşumları olduğunu, normal kandaki eritrosit ve lökosit oranının tersine döndüğünü göstermiştir. Bu olguda tanımlanan hastalık günümüzde kronik lenfoblastik lösemi olarak adlandırılmaktadır (13-15).



Şekil 2.1. Normal kandaki ve lösemi kanındaki eritrosit / lökosit hücreleri

Virchow, 1849'da yayınladığı üçüncü olguda, kronik lösemnin splenik ve lenfatik formlarının olduğunu bildirmiştir. Bu sınıflamadan 12 yıl sonra kronik lösemnin, kronik lenfoblastik lösemi ve kronik miyoblastik lösemi olmak üzere iki ana tipi tanımlanmıştır (13). Akut lösemnin tanımı ise, 1857'de Nikolaus Friedreich tarafından yapılmıştır. Hastalığın ortaya çıkışından hastanın ölümüne kadar geçen sürenin kısalığı ve hastalığın hızlı bir seyir izlemesi nedeniyle Friedreich, bu durumu akut lösemnin lenfatik tipi olarak tanımlamıştır (14).

Ehrlich 1880 yılında beyaz kan hücrelerinin üç farklı granülosit tipi (eozinofil, bazofil, nötrofil) olduğunu göstermiştir. Bu yeni bulgu, kronik lösemide kemik iliğinin hastalığa yakalanan hücre dizisinin tipine göre, lenfoid ve miyeloid olarak sınıflandırılmasını kolaylaştırmıştır (16).

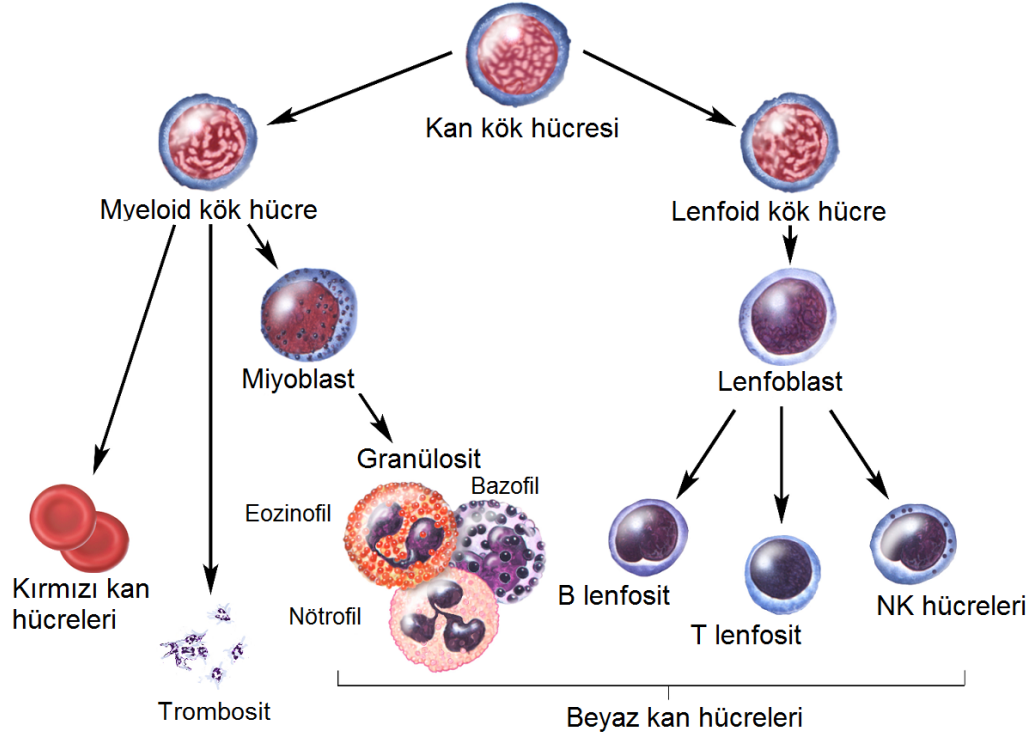
Naegeli, 1900'da periferik kanda lenfoblast ve miyoblastları görüntülemiştir (15,17). Akut monositer lösemnin tanımlanması ise 1913 yılında Dr. Hasan Reşat Sığındım ve Dr. Schilling tarafından yapılmıştır (14,18). Kronik miyoblastik lösemnin patogenezinin daha iyi anlaşılmasında Nowell ve Hungerford'un 1960'da bulduğu Philadelphia kromozomu etkili olmuştur (13,17).

Lösemi, vücuttaki kan üretim sistemini (lenfatik sistem ve kemik iliği) etkileyen kanser türüdür ve halk dilinde 'kan kanseri' olarak bilinmektedir. Kemik iliğinin lenfopoetik veya hemapoetik kök hücrelerinden veya öncü hücrelerinden kaynaklanan malign bir hastalıktır. Normal miyeloid ya da lenfoid hematopoezin spesifik bir kademesindeki duraklama ve klonal çoğalma sonucu neoplastik hücrelerin kemik iliği ve diğer dokularda toplanması ve periferik kanda birikmesi ile karakterize edilmektedir (19).

2.1.2. Lösemilerin Sınıflandırılması

Lösemiler, köken aldıkları hücre grubuna, semptomlarına, ortaya çıkış ve ilerleme hızlarının yanı sıra klinik seyirlerine göre gruplara ayrılırlar. Bu gruplar ortaya çıkış ve ilerleme hızlarına, klinik seyirlerine göre akut ve kronik lösemiler diye iki ana gruba ayrılırken; köken aldıkları hücre grubuna göre miyoblastik (myeloid) ve lenfoblastik (lenfoid) olmak üzere ikişer alt gruplara da ayrılmaktadır.

- Akut Miyoblastik Lösemi (AML)
- Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)
- Kronik Miyoblastik Lösemi (KML)
- Kronik Lenfoblastik Lösemi (KLL) (20).



Şekil 2.2. Hematopoetik farklılaşma

2.1.2.1. Akut Miyoblastik Lösemi

AML, hematopoetik ana hücrelerinin klonal çoğalması ile oluşur. AML’de lösemik hücreler myeloblast ve premyeloblast basamağında kalır ve olgunlaşamazlar. Bu nedenle farklılaşmamış ya da çok az farklılaşmış immatür hücreler şeklinde kendilerini gösterirler. Bu anormal hücrelerin kemik iliğinde çoğalması ve normal hücrelerin yerini alması nedeniyle kemik iliğinin yapısı tamamen bozulabilir (21,22). Çocukluk çağı AML insidansı, yenidoğan ve adölesan dönemindeki hafif bir artışın dışında genellikle tüm yaşlarda aynı orandadır (23-

25). Down sendromu, Fankoni anemisi, Kostmann sendromu, Bloom sendromu, Diamond-Blackfan anemisi gibi kalıtsal hastalıklarda AML görülme sıklığı artar (23).

Birçok özelliği ALL ile benzerdir (25). Yeni tanı almış AML hastaları indüksiyon kemoterapisi boyunca yatırılarak hastanede takip edilmelidir (20).

2.1.2.2. Akut Lenfoblastik Lösemi

ALL, lenfoid ana hücrelerinin klonal ekspresyonu sonucu gelişir (23,25). ALL de en önemli kromozomal anomali Philadelphia kromozomu t(9;22)(q34;q11) translokasyonudur. Bu translokasyon yetişkin ALL'lerin yaklaşık %30'unu, çocuk ALL'lerinde %5'ini kapsar (26,27). ALL, akut lösemilerin %75'ini oluşturur. 3-4/100.000 sıklıkla görülmekle birlikte, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda ortalama 2500-3000 çocukta yeni tanı konulmaktadır (23,24). Klinik olarak ALL tanısı alan bir hastada yaklaşık 10^{12} lösemik hücre bulunur ve bu hastada tam bir remisyonun sağlanabilmesi için kemoterapi ile tüm lösemik hücre sayısının %99'unun yok edilmesi gerekmektedir. ALL'li çocukların yaklaşık %85'inde remisyon indüksiyonu sağlanabilmektedir. Ancak remisyon sağlandıktan 1-2 ay sonra yeni bir tedavi uygulanmalıdır (25,28).

Akut lösemiler her yaşta görülebilen hastalık olup, çocuklarda 1-14 yaşlar arası ölümcüldür ve kendini ALL tipinde gösterirken, erişkinlerde ise daha sık olarak AML tipinde görülmektedir. Yaş ilerledikçe AML sıklığı artarken ALL sıklığı azalır (21,22).

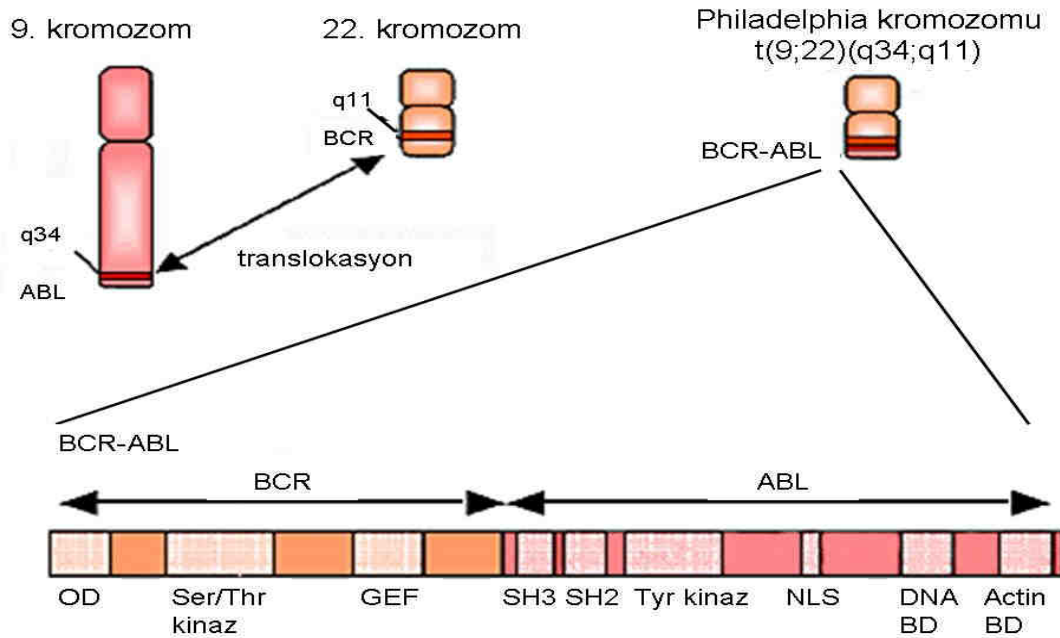
2.1.2.3. Kronik Miyoblastik Lösemi

KML, hematopoetik kök hücrelerinde kazanılan genetik değişikliklerden kaynaklanan klonal bir hastalıktır. Değişikliğe uğrayan kök hücreler, normal hematopoezin yerine geçen ve total myeloid kitlesinin büyük miktarda artmasına neden olan bir diferansiye hücre popülasyonu oluşturur (29). Hastalığın ilerlemesinde temel rol oynayan moleküler olaylar halen bilinmemektedir.

Myeloid transformasyondaki KML hastalarının %20'sinde, kolon karsinomu ve çeşitli solid tümörlerinin ilerlemesinde rol oynayan p53 tümör supresör geninde delesyonlar veya

nokta mutasyonları görülmüştür. Hastaların %15'i kromozom 9'da küçük delesyonlar taşır (29,30).

KML hastalarında en sık saptanan sitogenetik anomali 9. ve 22. kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyondur. 9q34 bölgesinde ve 22q11 bölgesinde birer kırık oluşur ve kopan parçaların karşılıklı yer değişimi sonucu $t(9;22)(q34;q11)$ translokasyonu oluşur (Şekil 2.3). Oluşan translokasyon sonucunda 22. kromozomda BCR-ABL fuzyon geni ortaya çıkar. Bu gen tirozin kinaz olan BCR-ABL fuzyon proteinini üretir. Tirozin kinaz fonksiyonuna sahip olan ABL, BCR geninin etkisiyle sürekli protein fosforlar ve hücre içi sinyal iletimini bozarak hücrelerin sürekli bölünmesini tetikleyen bölünme sinyallerinin proliferatif sinyal yollarına aktarılmasına neden olur. Böylece myeloid hücreleri sürekli bölünür ve bunun sonucunda lösemi hastalığı oluşur. 9 no'lu kromozom ile 22 no'lu kromozom arasındaki bu karşılıklı translokasyon sonucu oluşan 22. kromozomun yeni hali Philadelphia (Ph) kromozomu olarak adlandırılır ve normal homologundan daha küçük olduğundan dolayı sitogenetik incelemede kolaylıkla fark edilir. Philadelphia kromozomu KML'deki lösemi hücrelerinde görülen karakteristik sitogenetik anomalidir. (31,32).



Şekil 2.3. $t(9;22)$ translokasyonunun kırık noktalarının ve Ph kromozomunun şematik gösterimi (31).

Bu translokasyon spesifik olarak KML hastalığı ile ilişkilendirilmekle beraber, bazı ALL tiplerinde ve nadiren de novo AML olgularında görülür (29,33).

2.1.2.4. Kronik Lenfoblastik Lösemi

KLL, genellikle orta yaşta ve sıklıkla 60 yaşın üstünde görülür. KLL, matür lenfositlerin klonal ekspresyonundan kaynaklanır. Hastaların %95'inde hastalık B-lenfosit kaynaklıdır. Uzun yaşam süresine sahip, küçük, olgun lenfositlerin kemik iliği, periferik kan ve lenfoid organlarda artmış üretimleri ile lenf bezleri, dalak ve karaciğer dokularında büyüme olur (28).

Tüm lösemiler arasında en sinsi ve yavaş gidişli lösemi tipidir. KLL, genellikle belirtisizdir. Belirti görüldüğünde ise sıklıkla spesifik olmayan kolay yorulma, iştahsızlık ve kilo kaybı görülebilir. Bakteriyel enfeksiyonlara eğilim artmıştır. Çoğu hasta tanısının konulmasından itibaren 10 yıldan fazla yaşar. Ortalama yaşam süresi 4-6 yıldır. KLL oluşumu üzerine; genetik faktörler, bağışıklık sistemi yetmezlikleri ve kromozomal değişiklikler zemin hazırlar (34).

2.1.3. Lösemilerin Epidemiyolojisi

Genel olarak lösemiler tüm kanserlerin %8'ini oluştururlar. Erkeklerde lösemi daha sık gözlenmektedir. Ayrıca beyaz ırkta da daha sıktır. Yetişkinlerde lösemi tanısı konma sıklığı çocuklardan 10 kat daha fazladır ve risk yaşla birlikte artar. Çocuklar arasında ise 4 yaş altında daha sık gözlenir (2, 35, 36).

Gelişmiş ülkelerde akut lösemilerin %83'ünü ALL, %17'sini AML oluşturmakta olup, insidanda bölgesel farklılıklar görülebilir. Genel olarak, akut lösemiler çocuklarda ortaya çıkarken, kronik lösemiler yetişkinlerde görülme eğilimindedirler. Ergenlik çağında ve 20'li yaşlarda saptanan lösemilerin %50'sini, yetişkinlerdeki lösemilerin de %20'sini AML oluşturur. Hastaların %15'i 9'uncu kromozomda küçük delesyonlar taşır. 65 yaş altı AML hastalarında uzun süreli hastalısız yaşam oranı %40 civarındadır. Daha ileri yaştaki hastalarda ve özellikle sekonder AML olgularında prognoz daha kötüdür (27,28).

Ülkemizdeki kanser istatistiklerine göre ALL sıklık açısından birinci sırada yer almakta ve çeşitli merkezlerde tedavi gören hastaların en az %27'sini oluşturmaktadır. ALL, en sık gözlenen çocukluk çağı kanseridir ve 15 yaş altındaki çocuklarda gözlenen lösemilerin

%80'i ALL dir. ALL tüm lösemi türlerinin %75'ini oluşturur. 3-4/100.000 sıklıkla görülmekle birlikte, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda ortalama 2500-3000 çocukta yeni tanı konulmaktadır (23,24,35). Bazen yetişkinlerde de görülebilmekle birlikte, 50 yaşın üzerinde ALL son derece nadirdir.

KLL tüm lösemilerin %30'unu oluşturur. 30 yaşın altında nadiren görülürler, ancak görülme sıklığı yaşla birlikte artar ve en sık olarak 60-70 yaş arasında gözlenir.

KML yetişkinlerde gözlenen lösemilerin %20-30'unu meydana getirir ve 25-60 yaşları arasında gözlenir (35,36).

2.1.4. Lösemnin Etiyolojisi

Lösemilerin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte multifaktöriyel olduğu düşünülmektedir (4). Bu faktörleri temel olarak kalıtsal ve çevresel faktörler olmak üzere ikiye ayırabiliriz.

2.1.4.1. Kalıtsal Faktörler

Malign hastalıkların etiyolojisinde genetik materyalin önemli rol oynadığı moleküler ve sitogenetik gelişmelerle net bir şekilde açığa çıkmaktadır (1,3). Bazı kalıtsal hastalıklarda lösemi sıklığının artmış oluşu ve monozigot olan kardeşlerin birinde lösemnin görülmesiyle diğer kardeşte de görülme olasılığının yüksek oluşu lösemnin genetik eğiliminin olduğunun göstergesidir (4). Monozigot ikizlerde; hayatın ilk beş yılı içinde ikizlerden birinde lösemi gelişirse, ikinci ikizde de gelişme riski % 20'dir. Bir lösemi hastasının kardeşlerinde de lösemi görülme insidansı genel popülasyona göre dört kat daha yüksektir (3,5).

Kromozomal yapıdaki anormallik ve kararsızlıklar bu hastaları normal bireylere oranla daha hızlı kanserojen oluşumuna sürüklemektedir. Doğumsal kromozomal anomalileri bulunan olgularda malignite oranı sağlıklı bireylere göre daha yüksektir (21,37).

Kromozomal anomali olan Down Sendromlu (Trizomi 21) olgularda 10 yaşından önce lösemi riski 1/95'dir (4,5,38). Down sendromlu olgularda lösemi insidansı, sağlıklı bireylere göre 16-30 kat daha fazladır (39,40).

Bloom Sendromu'nda homolog rekombinasyon eğiliminin yanı sıra kardeş kromatid değişimi (Sister Chromatid Exchange: SCE) artışı görülmektedir ve 30 yaşından önce lösemi riski 1/8'dir.

Fankoni Anemisi hastalarında somatik hücrelerde kromozom aberrasyonlarında genel bir artış vardır ve 16 yaşından önce lösemi riski 1/12 olarak saptanmıştır (4,38).

Kromozom 14 ve 7'de anomali gözlenen bir immün yetmezlik hastalığı olan Ataksia Talenjiektazi'de, lenfoid malignite riski yüksektir.

Klinelfelter Sendromlu bireylerde lösemnin görülme olasılığı normal bireylere oranla daha yüksektir (41,42).

Poland ve Schwachman sendromları ile nörofibromatoziste lösemi riskinde artış gözlenmektedir (43-45).

2.1.4.2. Çevresel Faktörler

Fiziksel ve kimyasal ajanlar ile biyolojik ajanları (virüsler) içeren çevresel etkenlerin karsinojenik etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu karsinojenlerin kromozomlar üzerinde hasarlar yaparak kanser oluşturabildikleri bildirilmiştir (2,21,22).

Radyasyon araştırmacılarının kanserden ölümlerinin artması üzerine radyasyonun etkileri araştırılmaya başlanmıştır. 1940'lı yıllarda radyologlar arasında lösemnin görülme oranı artmıştır (46-48). Radyasyon, hücrede öncül nükleotidlerin yapısında değişikliğe neden olmaktadır. Bu da kromozomlarda kırılmalara, ring kromozom, disentrik kromozom ve sayısal anomalilere neden olarak lösemi insidansını arttırmaktadır (37).

1945'de Hiroşima ve Nagazaki'ye atılan atom bombalarından sonra hayatta kalanlarda lösemi insidansı artmıştır. Risk artışı ilk 5-7 yıl içinde en belirgin olup 20 yıl sonrasına kadar beklenenin üzerinde lösemi vakası bildirilmiştir (49,50). Radyasyona maruz kalma AML ve KML sıklığını artırırken KLL riskinde bir artış saptanmamıştır (51). Radyasyonun yanı sıra birçok kimyasal ajan karsinojenik etki göstermektedir. Ayrıca kimyasal karsinojenler hücre bölünmesi sırasında kromozom davranışlarını etkilemektedir. Kimyasal karsinojenlerin en önemlileri benzen ve alkilleyici ajanlardır (52,53). İstanbul'da benzene maruz kalanlarda lösemi insidansı normalden 2-3 kat daha fazla bulunmuştur (54). Benzer olarak kloramfenikol ve fenilbutazonun lökomojenik etkisini gösteren raporlar vardır (55).

2.2. Apoptoz

2.2.1. Apoptozun Tanımı ve Tarihçesi

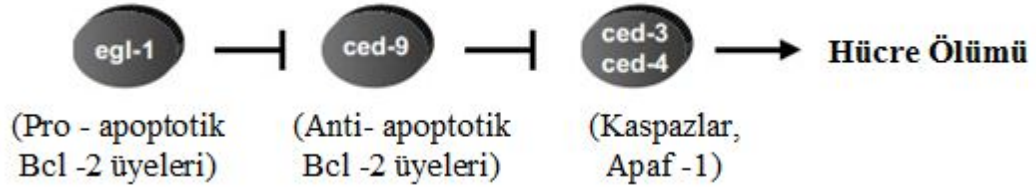
İmmün sistemin hemostazının ve maturasyonunun temel bir başlangıcı olan apoptoz, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (56,57).

Apoptoz terimini ilk olarak 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie, Yunanca da apo (ayrılan) ve ptosis (düşen) terimlerini birleştirerek 'ağaçtan dökülen yapraklar' anlamındaki 'apoptosis' terimiyle açıklamışlardır (58,59).

Wyllie 1984'de apoptotik hücrede morfolojik değişimlerin yanında birçok karakteristik biyokimyasal marker olduğunu gözlemlemiştir (60). Bunlardan en önemlisi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile DNA'da mono ve oligonükleozomal (180-200 bp) birimlerin merdiven gibi belli aralıklarla kırıklar göstermesinin nükleer kromatin fragmentasyonu olarak bilinmesidir (58).

1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozu seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozu yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozun genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (61).

1999'da Horvitz tarafından memelilerde apoptozun genetik mekanizmasının anlaşılmasında nematod *Caenorhabditis elegans* kullanılmıştır. *C. elegans*'da üç kilit gen tanımlanmıştır. Bunlar ced-3, ced-4 ve ced-9'dur. *C. elegans*'taki ced-3'ün memelilerdeki homoloğu ICE (interleukin-1 β -converting enzyme) dir. Bugüne kadar memelilerde tanımlanmış 11 tane ced-3 homoloğu protein vardır. İnsanda bu genin karşıladığı proteinler kaspazlara karşılık gelir. Ced-4 geninin homoloğu memelilerde Apaf-1 (apoptotik proteaz aktivasyon faktörü-1) genidir. Ced-9 geninin homoloğu ise bcl-2 dir (58). Ced-3 ve ced-4 apoptozu tetiklerken, ced-9 memelilerde homoloğu olan bcl-2 gen ailesi gibi apoptozu inhibe etmektedir. Örneğin balıkları enfekte eden bir virüsün (IPNV) hücrelerde apoptozu meydana getirdiği bunu da Bcl-2 gen ailesine ait olan Mcl-1 genini inhibe ederek yaptığı belirlenmiştir. Aynı şekilde HIV-1 enfeksiyonu taşıyan çocuklarda yapılan araştırmalarda, bu kişilerde Fas/Apo-1 gen aktivitelerinin yüksek olduğu ve aynı zamanda Bcl-2 gen aktivitesinin ise düşük olduğu gözlenmiştir (62).



Şekil 2.4. C. elegans modelinde hücre ölüm mekanizmasının temel komponentleri (63).

2.2.2. Apoptozun Genel Özellikleri

Organizma sürekli bir denge halindedir. Bir taraftan yeni hücreler sentezlenirken, diğer yandan var olan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmaktadır. Böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır. Bunlar; apoptoz ve nekrozdur (64,65).

Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Apoptoz ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptoz ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir (56,57,65). Nekroz hücredeki aşırı travma ya da hasarın bir sonucu olarak gelişmektedir ve akut işlevsel bozukluğa bağlı olarak hücrenin ölümü gerçekleşir. Hücrede iyon akışının kontrolü hızla kaybedildiği için pasif ve yıkıcı bir süreç olarak değerlendirilmektedir. İyon akış kontrolünün kaybedilmesi hücre içerisine fazla miktarda su girişine, hücre ve organellerin enerji harcamasına gerek kalmadan şişerek sitolize uğramalarına neden olmaktadır. Ölen hücre içeriğinin ekstraselüler alanlara akması ve pro-enflamatuvar hücrelere infiltrasyonu ile komşu hücrelerin ölmesi ve doku hasarının yaygınlaşması meydana gelmektedir (66). Apoptozda morfolojik değişimler; nükleer kondensasyon, hücre büzülmesi, membran şişmesi gibi değişimleri kapsarken, fizyolojik değişimler; spesifik endonükleazlarla DNA'nın 80-200 bazlık oligonükleotid fragmentlerine parçalanması, kaspazların aktivasyonu sonucu proteinlerin sindirilmesini kapsamaktadır (66,67).

Çizelge 2.1. Apoptoz ve Nekroz Özelliklerinin Karşılaştırılması

ÖZELLİK	NEKROZ	APOPTOZ
Yol açan nedenler	<ul style="list-style-type: none"> ➤ İskemi ➤ Hipertermi ➤ Hipoksi ➤ Litik viral enfeksiyon ➤ Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları ➤ Şiddetli oksidatif stress 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Büyüme faktörü eksikliği ➤ Hücre yaşlanması "Senescence" ➤ HIV ➤ Kanser ilaçları ➤ Radyasyon ➤ Yüksek doz glukokortikoid ➤ Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu ➤ Sitotoksik T lenfositler ➤ Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik özellikler	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hücre membranı bütünlüğünün kaybı ➤ Kromatin "flocculation"u ➤ Hücre şişmesi ➤ Organellerin disintegrasyonu ➤ Endoplazmik retikulumun dilatasyonu ➤ Büyük vakuollerin oluşumu ➤ Hücre lizisi 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu ➤ Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması ➤ Hücre küçülmesi ➤ Organellerde disintegrasyon yok ➤ Hücrenin intact mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bozulmuş iyon homeostazisi ➤ ATP gerekmez (pasif süreç) ➤ +4 °C'de gerçekleşebilir ➤ DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) ➤ Postlitik DNA fragmentasyonu(=ölümün geç safhasında) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması ➤ ATP gereklidir (aktif süreç) ➤ +4 °C'de gerçekleşmez) ➤ DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni = apoptozun en önemli belirteci) ➤ Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hücreler gruplar halinde ölür ➤ Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir ➤ Lizozomal enzimler salınır ➤ İnflamasyona neden olur 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür ➤ Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir ➤ Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler ➤ İnflamasyon görülmez

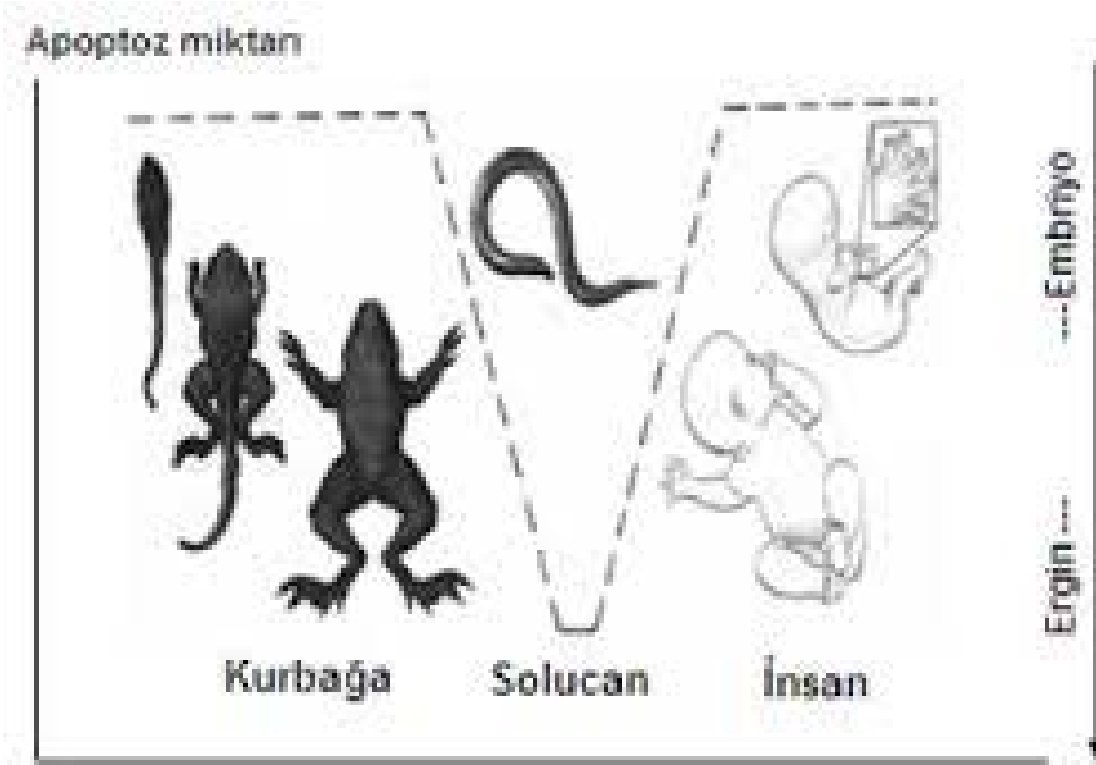
Apoptozda ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptozda yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (68,69).

Apoptoz, intrauterin dönemden itibaren başlar. Fizyolojik ve patolojik birçok olayda önemli bir rol oynar. Apoptoz, homeostazinin korunmasında embriyonik dönemde

ekstremitelerin ve içi boş organların oluşumunda, dişi fetüste Wolf ya da erkek fetüste Müller kanallarının körelmesi sırasında ve merkezi sinir sistemi gelişiminde nöron sayısının düzenlenmesinde yer alarak; doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçiminde temel bir işlev yürütmektedir. Ayrıca DNA'sı ağır hasar gören ya da virüsle enfekte olan hücrelerin ölümünü sağlayarak temel bir rol üstlenmektedir (70,71). Büyüme faktörlerinin ortamdaki çekildiği koşullarda (emzirme sonunda meme bezinin, doğum sonrası uterusun) organlarda gerçekleşen küçülmenin de temel mekanizması, ilgili organlardaki hücrelerin apoptozla ölümüdür (56). Bunlar dışında; embriyonik ve fetal dönemde; immün sistemin ve sinir sisteminin gelişmesinde önemli role sahiptir. İntrauterin dönemde, immün sistemin maturasyonu esnasında, santral lenfoid organlardaki otoreaktif lenfositlerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Böylece periferik lenfoid ve myeloid kompartmanların aşırı büyümesi kısıtlanır. Sinir sistemi gelişirken; aksonları hedef organlara ulaşamayan nöronların ortadan kaldırılmasını ve nöronlarla hedef organlar arasında oluşan bağlantı hatalarının onarılmasını sağlar (56,57,62,72).

Dokularda hücre homeostazının sağlanmasında, bağırsaktaki kript epitellerinin sürekli yenilenmesinde, immün reaksiyonlarda; viral hepatitte karaciğerde oluşan apoptotik hücrelerde (Concilman cisimcikleri) veya graft versus host reaksiyonlarında, hücrelerin herhangi bir nedenle hasarlanmaları durumunda veya yaşlılıkta; örneğin ısı, radyasyon, antikanser ilaçlar, hipoksi gibi durumlarda apoptoz mekanizması devreye girmektedir (56,57,62).

Apoptoz çok hücreli canlıların gelişimi esnasında da görülür. Çok hücreli canlıların normal ve doğru gelişimleri seçilmiş bazı hücrelerin apoptozla ölmesine bağlıdır. Örnek olarak 1 mm uzunluğunda transparant bir kurtçuk olan *Caenorhabditis elegans*'ın başlangıçta 1090 olan hücre sayısı tam olarak apoptozla 131 hücre azalır ve böylece hermafroditik formdan yetişkin forma dönüşür (68,73). Kurbağaların metamorfozu esnasında kuyruklarının kaybolarak yetişkin forma geçmeleri apoptozla gerçekleşir. Böylece yetişkin forma geçerler. Kuyruktaki hücreler apoptozla ölümlerini kaybolur. İnsan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdeleri oluşturan hücreler apoptoz sonucu kaybolarak daha işlevsel hale gelmektedir (74,75).



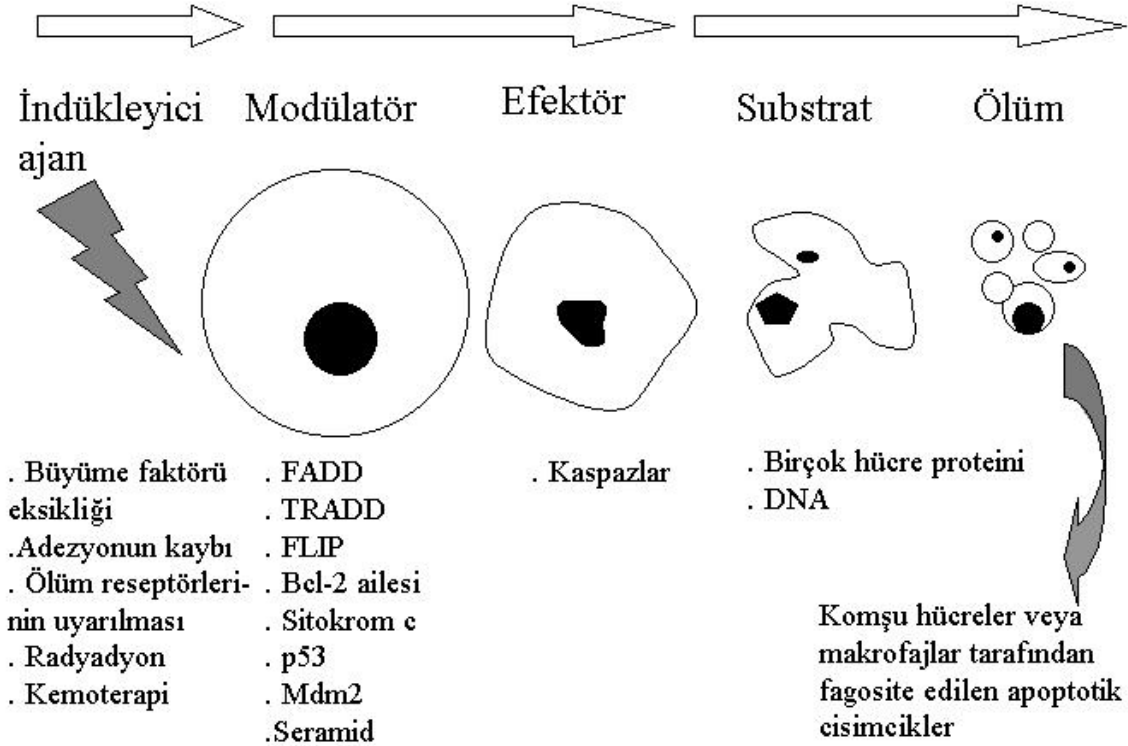
Şekil 2.5. Kurbağa, *C. elegans* ve insanda apoptoz (76).

2.2.3. Apoptozun Gerçekleşme Aşamaları ve Moleküler Mekanizması

Apoptoz, belirli uyarılarla başlatılan moleküler olayların enerjiye bağımlı döngüsünün son noktasıdır ve dört ardışık basamağı vardır. Bunlar:

1. Ekstra ve intraselüler sinyallerle apoptozun başlatılma fazı.
2. Kontrol ve düzenlenme fazı: İntraselüler pozitif ve negatif düzenleyici moleküllerle apoptozun stimülasyonu veya inhibisyonu söz konusudur.
3. İnfaz fazı: Genel final fazı ve fiili ölüm programından oluşur ve bu faz çoğunlukla proteazların kaspaz ailesi tarafından gerçekleştirilir.
4. Fagositoz fazı: Fagositoz ile ölü hücrelerin temizlenmesidir.

APOPTOTİK SÜREÇ



Şekil 2.6. Apoptotik sürecin gösterimi

2.2.3.1. Apoptozun Başlatılma Fazı

Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden (intrinsik) veya hücre dışından (ekstrinsik) gelebilir (10,69,73).

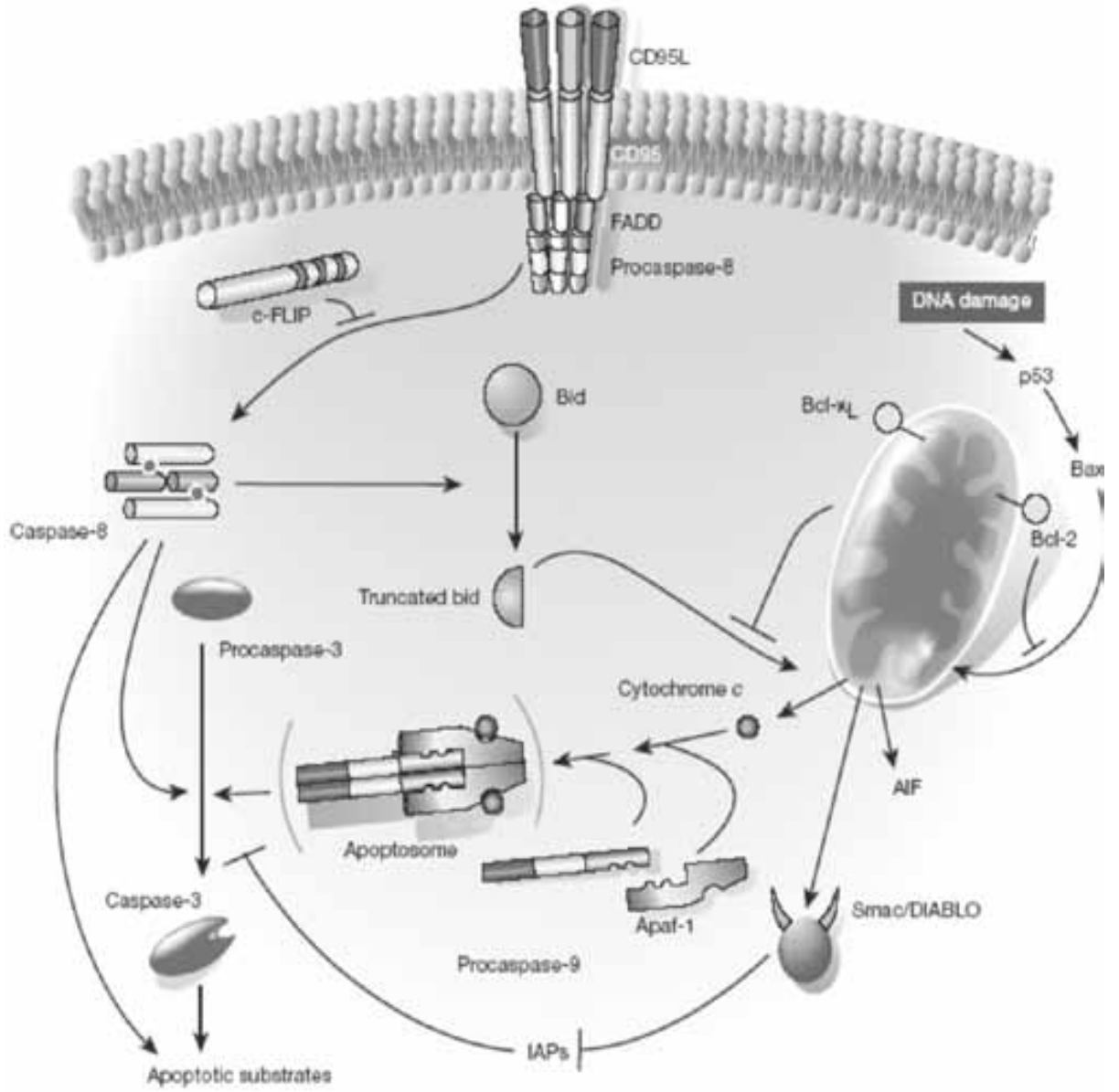
Hücre Dışı Sinyaller

- Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği
- Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu
- FAS – FAS Ligand aracılı apoptoz (77-79)
- TNF aracılı apoptoz

- Sitotoksik T lenfosit aracılı apoptoz
- Koloni uyarıcı faktörler (CSF)
- Nöron büyüme faktörü (NGF)
- İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) (80),
- IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması
- Glukokortikoidler
- Dış etmenler (İskemi, toksinler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler) dir (77-79,81,82) .

Hücre İçi Sinyaller

- Hücre içi Ca⁺⁺ düzeyi artışı
- Hücre içi pH azalışı
- Metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları (9,10,78,81).
- Sitokinler,
- Tümör Nekroz Faktör (TNF),
- DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması,
- Viral-bakteriyel enfeksiyonlar
- Onkojenler dir (83).



•Hengartner M.O. (2000): The Biochemistry Of Apoptosis Nature | Vol 407'den uyarlanmıştır.

Şekil 2.7. Apoptozun moleküler mekanizması (72).

Organizmada apoptozu uyarıcı ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (Çizelge 2.2) (83).

Çizelge 2.2: Apoptozu baskılayan ve apoptozu tetikleyen genler (83)

Apoptozu Baskılayan Genler	Apoptozu İndükleyen Genler
<ul style="list-style-type: none">➤ Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1➤ c-abl geni➤ ras onkogeni➤ çözünebilir fas➤ p35➤ A20	<ul style="list-style-type: none">➤ Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk1➤ c-myc➤ p53, p21➤ fas (CD95/APO1)➤ FADD/MORT, RIP, FAST➤ İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)➤ LOH (MTS1/CDK41)

DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH değişiklikleri ve hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptozla götüren hücre ölüm sinyallerini başlatır. Ölüm reseptörlerinin hücre yüzeyinde spesifik ligandlarına bağlanması sonucu hücre içi proteazlar yani kaspazlar aktive olur. Aktive olan kaspazlar hedef proteinleri yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olur. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apoptotik cisim” adı verilir. Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek yok edilir (56,81,84,85).

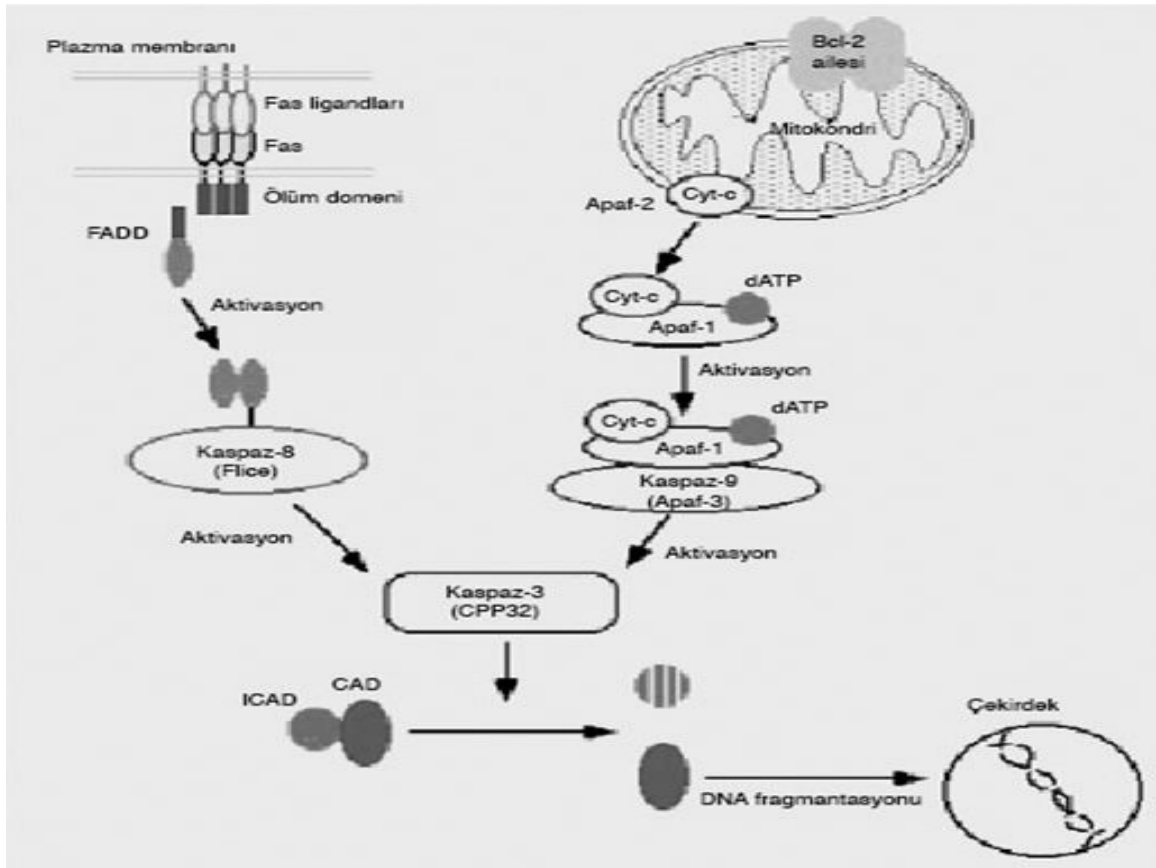
Apoptoz; hücre yüzey ve ölüm reseptörlerine gereksinim duyan ekstrinsik yolak (ölüm reseptörleri yolu) ve mitokondriyal kaynaklı intrinsik yolak (mitokondriyal yol) olmak üzere iki ana yolla gerçekleşmektedir (78,79,86,87).

2.2.3.1.1. Ekstrinsik Yolak (Ölüm Reseptörleri Yolu)

Bu yolda Fas (APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) görev almaktadır. Fas ve TNFR-1'in ilgili ligandları ile etkileşime girmeleri sonucu apoptoz indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyeleridir (85,87). Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup ‘tumor necrosis factor receptor (TNFR)’ ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Ancak en önemlileri Fas ve TNFR-1'dir. Fas'ın ilgili ligandına Fas ligandı (FasL) denir (80,88,91). TNFR-1'inde aynı şekilde isimlendirilen ligandı mevcuttur. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde ve akciğerlerde bulunur. FasL, tümör nekroz faktör

(TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve “natural killer” hücrelerinde bulunur (77,81,88).

Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm efektör domain (DED: “death domain”) bölgeleri adı verilen TRADD (“TNFR-1 associated death domain”) ve FADD (“Fas associated death domain”) ile interaksiyona girerler. Böylece ölüm indükleyici sinyal kompleksi DISC (Death İnducing Signalling Complex) oluşur (78,79,86,87,89). Bu kompleks ise kaspaz-8 ya da kaspaz-10’un doğrudan aktivasyonlarına öncülük eder (82,84). Kaspaz-8 hem doğrudan kaspaz yolunu aktive eder, hem de mitokondriyal geçirgenliği değiştiren ekstrinsik ve intrinsik yolları birbirine bağlayan Bid’in aktif formu olan tBid’e dönüşümünü sağlar. Prokaspaz 8’in aktif hali olan kaspaz 8 (ya da kaspaz-10) diğer kaspazları uyarır ve başta kaspaz 3 olmak üzere diğer kaspazları aktive ederek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar (89-91). Böylece apoptotik döngü başlatılmış olur ve hücre ölümü apoptotik hücrenin fagositozu ile sonlanır. (78,79,81,85).



Şekil 2.8. Ekstrinsik ve intrinsik yollar

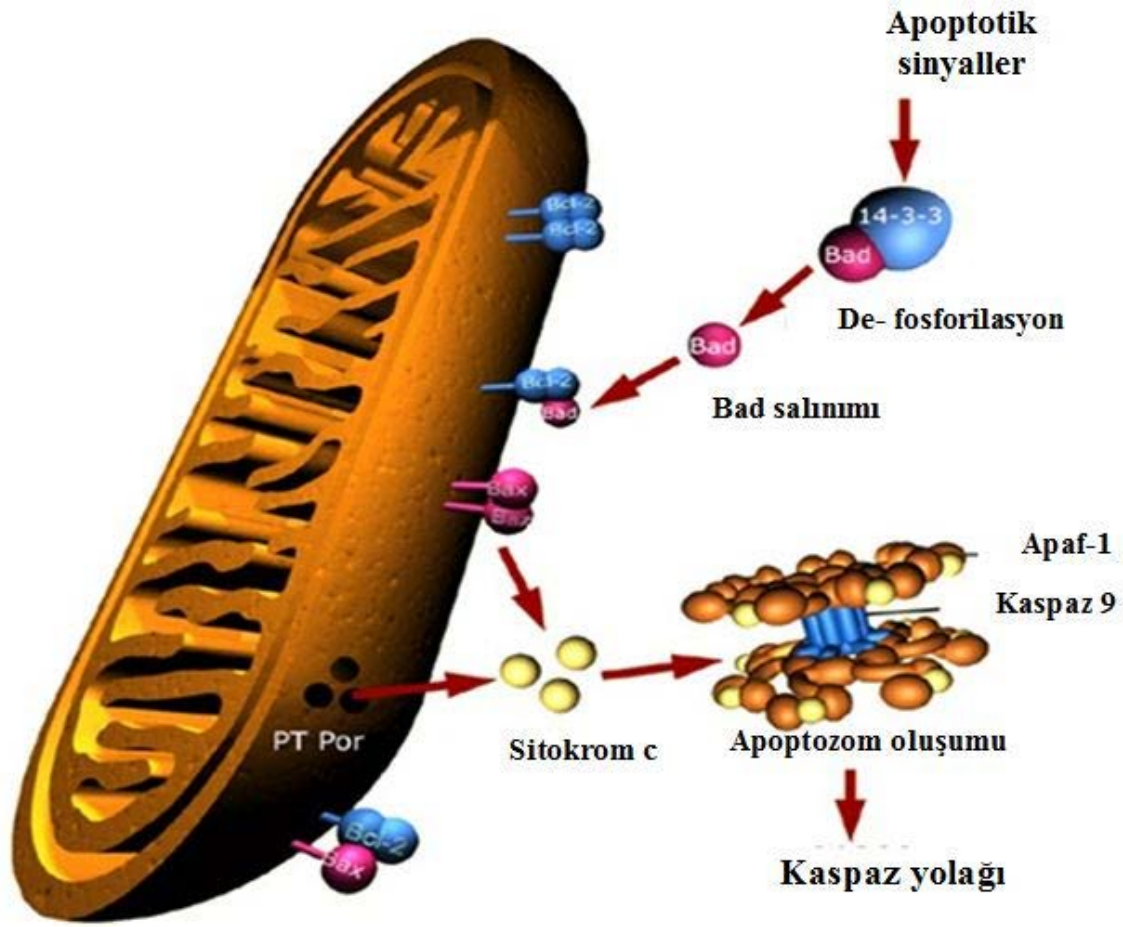
2.2.3.1.2. İntrensik Yolak (Mitokondriyal Yol)

Mitokondri, hücre içinde ATP üretiminin kaynağı olmasının yanı sıra, hücre içi ya da hücre dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Mitokondri iç ve dış zarla çevrili yapıdadır, bu zarlar tıpkı hücre zarında olduğu gibi bir zar potansiyeline sahiptir. Dış zar geçirgenliğindeki artış sonucu mitokondri zarı potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına yol açar (92,93).

Mitokondri; hücrenin enerji deposu olmasının yanında, sitoplazmaya geçerek ölüm programını aktive eden faktörleri salan, böylece apoptozda büyük rol oynayan bir organeldir. Bu faktörlerden en önemlisi sitokrom c dir. Apoptozu indükleyen mitokondride bulunan; AIF (Apoptoz Uyarıcı Faktör), Sma c / ENDO G adlı DNaz enzimi, Omi / HtrA2, IAPs Endonükleaz G ve çok sayıda kaspaz (prokaspaz 2, 3 ve 9) tanımlanmıştır (93).

Apoptozun regülasyonu Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları apoptoz inhibitörü yani antiapoptotik, bazıları ise apoptozu uyarıcı ve proapoptotik genler olarak tanımlanırlar (94). Bcl-2 ve Bax genleri mitokondri dış zar geçirgenliğini ayarlarlar (95). Hücrede antiapoptotik aile üyeleri olan Bcl-2 ve Bcl-x, yine aynı ailenin üyeleri olan Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 genleri gibi proapoptotik genler tarafından baskılanır. Ailenin proapoptotik üyeleri normal koşullarda inaktif durumdadır, bu nedenle mitokondriyal zar geçirgenliği Bcl-2 ve benzerlerinin etkisi sayesinde değişmez. Ancak çeşitli uyarılar proapoptotik grubun aktifleşmesine yol açarlar. Örneğin; büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ın, kalsiyum artışı Bim'in, UV ışını Bmf'nin aktifleşmesini sağlamaktadır. Sonuçta Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır. Bcl-2 tarafından inaktif durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında permeability transition porlarının oluşumuna ve zar potansiyelinin değişimine yol açar (95,96). Bu değişim dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptozom' olarak isimlendirilir (76,94,97).

Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozu neden olur (72,94,97-100). Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır (85,90).



Şekil 2.9. Apoptoz sırasında hücre içi sinyallerle aktifleşen mitokondriyal yol (65)

2.2.4. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

1972 yılında, apoptoz terimi ilk kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmiştir. Günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. aktif kaspaz 3 tayini) moleküler düzeyde belirlenebilmesiyle de apoptoz saptanabilmektedir.

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptoz, seksenli yılların sonlarına doğru DNA kırıklarının saptanmasına yönelik yöntemlerle saptanmaya başlamıştır. Doksanların ortasında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metotlarla saptanabilen apoptoz, doksanlı yılların

sonuna doğru fosfatilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlamıştır.

2.2.4.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

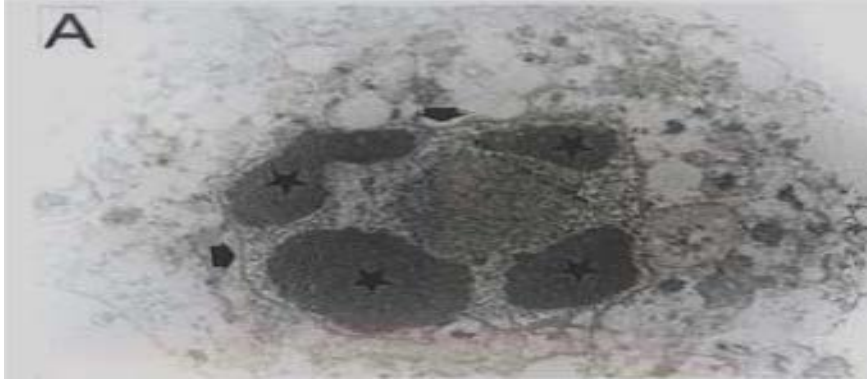
2.2.4.1.1. Işık Mikroskopisi

Bu yöntemde hematoxilen ve giemsa boyama yöntemleri kullanılır. Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoxilen ile boyamadır (HB). Hematoxilen boyası, kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Hücrede gözlenen değişiklikler; hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının kenarında toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi şeklindedir (101).

Giemsa ile boyamada hematoxilenle boyamada da olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoxilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoxilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (101).

2.2.4.1.2. Elektron Mikroskopisi

Apoptozda en değerli yöntem olarak kabul edilmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği yöntemdir. Üstelik subsellüler detaylar da (mitokondrinin durumu, hücre zarı ve nükleus zarının bütünlüğü) bu yöntemle incelenebilir (101).



Şekil 2.10. Elektron mikroskopisi ile nükleus fragmentasyonunun gözlenmesi

2.2.4.1.3. Faz Kontrast Mikroskopisi

Sadece hücrelerin kültür ortamında "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda kullanılmaktadır. Faz kontrast mikroskopu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler izlenebilir (101).



Şekil 2.11. Faz kontrast mikroskopisi görüntüleri

2.2.4.1.4. Floresan Mikroskopu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile cansız hücrenin ayırımına olanak tanırırlar. Oysa hematoksilen ya da Giemsa boyamanın

kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin prensibi gereği zaten ölmektedirler. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn: hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn: propidium iyodur) beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip şudur: Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının (hücre zarının) intakt olup olmadığıdır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodur gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskobu ile tanınabilirler. Kuşkusuz bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekrozla ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır (101).

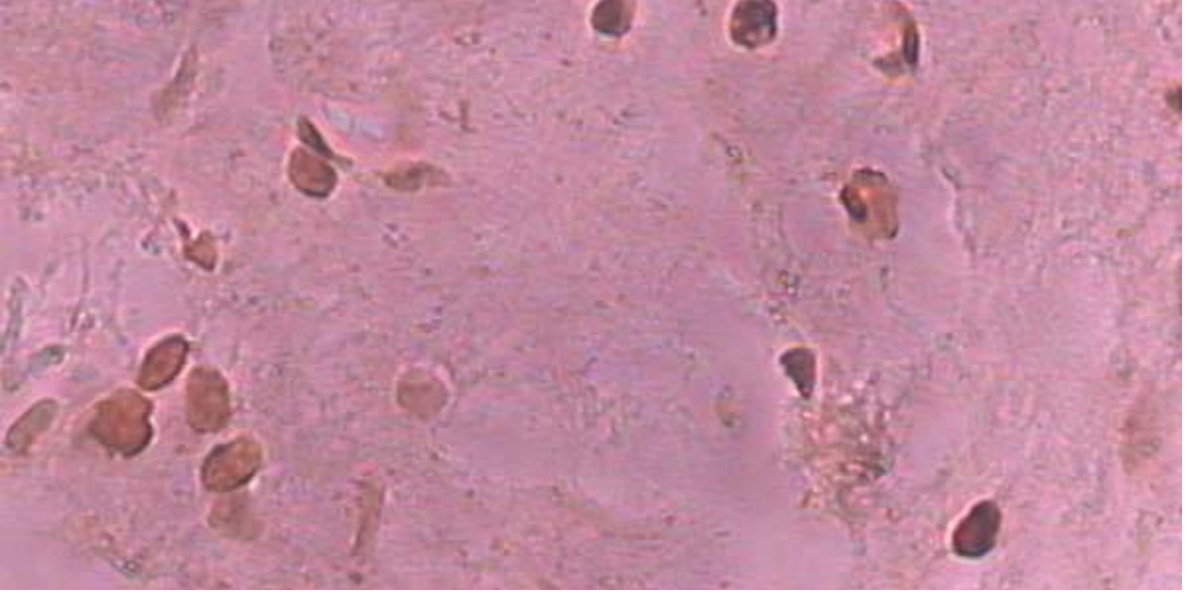
2.2.4.2. Histokimyasal Yöntemler

2.2.4.2.1. Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan fosfatidilserinin (PS) apoptotik hücrelerde, hücre zarının dış yüzüne transloke olmasından faydalanılmaktadır. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (102).

2.2.4.2.2. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase biotin – dUTP Nick End Labeling) Yöntemi

DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağladığı için hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir. Çalışmalarda testin duyarlılığı % 60–90 aralığındadır. Spesifitesi % 87 olarak belirtilmekte, nekrotik hücre ölümünün indüklenmesi ile spesifitenin % 70'lere düştüğü belirtilmektedir (103). Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozun varlığı bu metodla saptanabilir (101).



Şekil 2.12. TUNEL metodu uygulanmış spinal kord görüntümü

2.2.4.2.3. Kaspaz 3 Yöntemi

Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz 3 immunohistokimyasal metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz 3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz 3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metotla tespit edilebilirler (101).

2.2.4.2.4. M30 Yöntemi

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeralin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (101).

2.2.4.3. Biyokimyasal Yöntemler

2.2.4.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptozda DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgeler) kırıldığı için merdiven görüntüsü 'ladder pattern' oluşur. Bu bulgu apoptozun karakteristik özelliğidir ve nekrozda görülmez. O yüzden apoptozu nekrozdan ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (101).

2.2.4.3.2. Western Blotting Yöntemi

Bu yöntemle apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (kaspaz 3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriden çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metod ile saptanabilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır (101).

2.2.4.3.3. Flow Sitometri Yöntemi

Flow sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun saptanmasında kullanışlıdır. Özellikle iki şekilde apoptoz deteksiyonu yapılır.

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodur kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak.

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemlerinin kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptoz lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu tayin edilir (101).

2.2.4.4. İmmunolojik Yöntemler

2.2.4.4.1. ELISA Yöntemi

Bu yöntemle gerek kültürü yapılmış hücre gruplarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür (101).

2.2.4.4.2. Fluorimetrik Yöntem

Fluorimetrik yöntem kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lisatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur, sonrasında orijinal kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır.

2.2.4.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

2.2.4.5.1. DNA Microarray Teknolojisi

Henüz çok yeni ve pahalı bir yöntemdir. Kısa bir süre içerisinde binlerce genin ekspresyon derecelerinin ve apoptoza özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı sunmaktadır. M30 fare monoklonal antikorları

ile yapılan immün enzim köprü ile henüz DNA parçalanmadan apoptoza gidecek hüceyi erken evrede gösterebilmektedir (101).

2.2.5. Apoptozun Lösemi ve Diğer Hastalıklarla İlişki

Apoptoz birçok patolojik ve fizyolojik olayda etkin rol almaktadır. Fizyolojik olayların başında hücre yapım-yıkımı gelir. Deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yapım-yıkımının hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozla ortadan kaldırılarak yeni hücrelere yer açılır. Patolojik olarak sayılabilecek olaylarda ise; tümörlerde hem regresyon hem de büyüme aşamasında rol oynar. Yine dokularda hormona bağlı patolojik atrofi, bazı kalp hastalıkları, otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif bozukluklara bağlı hastalıklarda ve kanserde apoptoz mekanizması devreye girer (70,71,104,105).

Apoptoz vücutta artık ihtiyaç duyulmayan veya geri dönüşümsüz zedelenmiş hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Apoptoz basamaklarındaki düzenin bozulması kanser patogenezinin önemli bir bileşendir. Normalde apoptotik tetiği çeken özgün mekanizmaların bozulması ile kanser hücreleri apoptozu indükleyici genomik değişikliklere sahip olmasına rağmen yaşamaya devam eder ve çoğalır. Hematopoetik hücreler gibi hızlı bölünen dokularda homeostazi sağlamak için apoptotik mekanizmalara ihtiyaç duyulur. Bu mekanizmadaki bozukluklar miyelodisplazi, anemi, lösemi, lenfoma, myeloproliferatif hastalıklarına neden olur. Apoptoz ciddi derecede zedelenmiş veya genetik bozukluğa sahip uygunsuz çoğalan hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli role sahiptir (106).

Kanser ve otoimmün hastalıklar gibi durumlara yetersiz apoptoz neden olurken, kontrolsüz apoptoz iskemik hasarlara ve nörodejeneratif bozukluklara neden olabilir.

Kontrol altına alınmış hücre ölüm yolları hala tamamen belirlenememesine rağmen, biyokimyasal ve genetik yaklaşımlar sonucu, sistein proteazlar olan kaspazların apoptotik sürecin çeşitli evrelerinde önemli rol oynadığı fikri oluşmuştur (107).

Kaspazların rol oynadığı iki önemli yol yukarıda da açıklandığı gibi ekstrinsik ve intrinsik yollardır. Ekstrinsik yolun apikal proteazları kaspaz 8 ve 10 olup, hücre içerisine doğru sinyal gönderirler. İnstrinsik yol, hücresel hasar sonucu olarak ortaya çıkar ve mitokondrindeki sitokrom *c* tarafından başlatılır, kaspaz 3 ve 9 aktive edilir. Tüm bu yollar, sırasıyla kendi spesifik hücresel proteinleri ile inaktif ya da aktif durumunda olan ölümcül kaspazların aktivasyonuna neden olur (107,108).

Lösemik hücrelerde apoptozun indüksiyonunu etkileyen genetik ve mikro çevresel faktörlerle ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Sitotoksik ilaçlarla lösemik hücre dizilerinin tedavisinin sitokrom c salınımı ve kaspaz aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (106). Kaspazların aynı zamanda, taze izole edilmiş B kronik lenfositik lösemilerin sitotoksik tedavileri sonrasında aktive oldukları gösterilmiştir. Apoptozun regüle edilememesi, hücre ölümünü regüle edici proteinleri kodlayan genlerin translokasyonlarından dolayı meydana gelir (106, 109).

Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyelerinin fonksiyon yitirmesi ya da ekspresyonunun durmasının lösemi ve lenfomaya yol açtığı gösterilmiştir. Bcl-2 antiapoptotik proteinin aşırı ekspresyonu B hücreli lösemilerde ve bazı AML hastalarında gösterilmiştir. Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri lenfoma ve lösemi gelişiminde bu hastalıkların seyrinin ciddiyetinde ve tedaviye direncinde major rol oynar (106).

2.3. Kaspazlar

Kaspazlar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunur. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon zinciri başlar. Kaspazlar, (cysteine-dependent aspartate-spesific proteases) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar ve latent intrasellüler proenzimler olarak sentezlenmektedirler (8, 110,111).

Kaspazlar aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri ASP (aspartat, aspartik asit) bölgesinden keserler. Kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Sitokrom c'ler prokaspaz zimogenlerini aktive etmektedir (8,56). Kaspazlar apoptotik yolun cellatlarıdır ve apoptozdaki karakteristik değişikliklerin en önemli sebebidir (93). Kaspaz aktivasyonunun inhibitörleri, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını bloke etmez ancak ardışık kaspaz aktivasyonunu bloke ederek, hücre ölümünü önler. Sitokrom c gibi apoptozu indükleyen AIF'in de mitokondriden salınımı kaspazların aktivasyonuna sebep olur (112-114). Başlangıçta, kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturur ve bu olayların sonucunda; zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkar (8,56,93).

Günümüze kadar 14 memeli kaspazı tespit edilmiş olup hayvanlarda bulunan kaspaz 11 ve 12'nin insandaki karşılığı hala gösterilememiştir. Kaspaz 9, bcl-2 ailesi tarafından stimüle veya inhibe edilir. Kaspaz 2 ve kaspaz 8, TNF- α gibi sitokinler tarafından aktive

edilir. Kaspazlar apoptozu aktive eden sinyaller tarafından tetiklenip, apoptoz yolaklarında aktif olarak görev alırlar (111, 115).

Çizelge 2.3: Kaspaz Türleri

➤ Kaspaz 1 (ICE)	➤ Kaspaz 8 (FLICE, MACH, Mch 5)
➤ Kaspaz 2 (ICH-1)	➤ Kaspaz 9 (ICE-LAP 6, Mch 6)
➤ Kaspaz 3 (CPP32, Yama, Apopain)	➤ Kaspaz 10 (Mch 4, FLICE 2)
➤ Kaspaz 4 (ICErel-II, TX, ICH 2)	➤ Kaspaz 11 (ICH-3)
➤ Kaspaz 5 (ICErel-III, TY)	➤ Kaspaz 12
➤ Kaspaz 6 (Mch 2)	➤ Kaspaz 13 (ERICE)
➤ Kaspaz 7 (Mch 3, ICE-LAP 3, CMH-1)	➤ Kaspaz 14 (MICE)

2.3.1. Kaspazların Yapısı ve Kaspaz Türleri

Kaspazlar 3 subunit içeren prokaspazlar (30-50 kD) olarak sentezlenir: Bunlar NH₂ terminal subunit, büyük subunit, (~ 20 kD veya p20) ve küçük bir subunit (~ 10 kD veya p10).

Büyük ve küçük alt birimler birbirleriyle etkileşime girerek enzimin aktif merkezini oluştururlar. Her prokaspaz çeşitli uzunluklarda bir ön bölge veya NH₂-terminal peptid bölgesi içermektedir ve bu ön bölgeler düzenleyici olarak görev yaparlar.

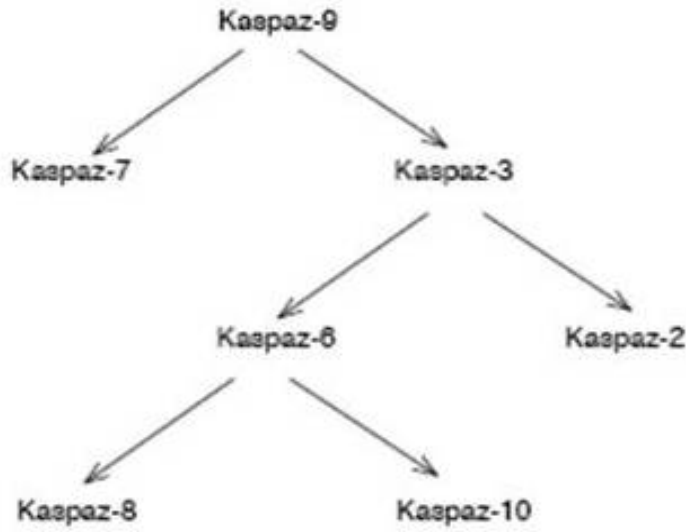
Kaspazların ön bölgeleri çeşitlilik gösterir. CARD (Caspase Recruitment Domain) ve DED kaspazların ön bölgelerinin özel motifleridir ve protein-protein etkileşiminde görev alırlar. Bu bölgeler prokaspazlar ve adaptörleri arasında homofilik etkileşime aracılık ederek prokaspaz aktivasyonunda önemli rol oynarlar. DED-DED etkileşiminde hidrofobik bir bağlantı kurulur, CARD-CARD bağlantısında yük etkileşimi gözlenir. Başlatıcı kaspazların kümelenmesi ve aktivasyonu için ölüm reseptörleri ile bağlantı kuran adaptör moleküller bulunur. Bunlardan DED kaspaz 8 ve 10 etkileşiminde, CARD ise kaspaz 9 ve Apaf-1 etkileşiminde görev alır (90,114-116).

Her bir kaspaz enziminin optimum kesme bölgesi vardır ve bu bölge aspartik kesim noktasının N-terminalinde bulunan dört aminoasitlik bir motiftir. Bu motifin görevi, kaspazın hedef proteininin seçimini belirlemektir. Ayrıca bu motif ilgili kaspazın peptid inhibitörlerle inaktive olmasına aracılık etmektedir (114).

Aktif kaspazların 3 boyutlu yapısı tespit edilmiş olup 2 heterodimer, 2 geniş subunit tarafından çevrelenmiş 2 komşu küçük subunitle karşı yönde bir tetramer oluşturur. Her bir

heterodimer substratın bağlanması ve katalizi için gerekli küçük ve geniş subunitler içerir (115).

Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu), ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, ya da kaspaz 9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir. Başlangıç kaspazları bir kez aktive olduğunda diğer prokaspazları aktive eder. Proteolitik olarak birbirlerini aktifleştiren kaspazlar bir kaskad şeklinde işlerler (117).



Şekil 2.13. Kaspaz Kaskadı

Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana grupta incelenmektedir (90,114,118,119).

2.3.1.1. Sitokin Aktivasyonu Yapan (Enflamatuvar) Kaspazlar

Sitokin sekresyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Bunlar lenfokin üretiminden de sorumludur. Lenfokin; özel bir akyuvar tipi olan lenfositlerin ürettiği bir maddedir. İmmün sistemdeki diğer hücreler üzerinde etkisi vardır. Bu gruba dahil olan kaspaz türleri; kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 tür. Ayrıca kaspaz 1, 4, 5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler (90, 120).

2.3.1.2. Başlatıcı Kaspazlar

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara yani ikincil kaspazlara ileten kaspaz türleridir. Kaspaz 2, 8, 9 ve 10 başlatıcı kaspazlar grubunda yer almaktadır.

Başlatıcı kaspazların üç önemli özelliği vardır; farklı şekillerde gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda bitirici kaspazın aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlarlar, ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak bulunurlar.

Apoptotik ölüm işlem sırasına göre kaspazlardan ilk görev alanlar başlatıcı ya da öncü kaspazlardır ve bunların uzun öncül bölgeleri bulunur.

2.3.1.3. Apoptozu Yürüten (Efektör) Kaspazlar

Efektör kaspazlar, ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Apoptozda sonlandırıcı kaspazlar olarak görev almaktadırlar. Kaspaz 3, 6 ve 7 bu gruba dahil olan kaspaz türleridir.

Kaspaz 3, 6 ve 7 başlatıcı kaspazlardan farklı olarak kısa bir N-terminal peptid (23-28 aminoasitlik) bulundurulur. Substrat ve inhibitör özgülüğünde kaspaz 3 ve 7 genellikle benzerdir. Kaspaz 6 ve 7, kaspaz 3 tarafından aktifleştirildiği için bitirici kaspazlar olarak sınıflandırılırlar.

2.3.2. Kaspazların Aktivasyonu

Kaspazların en az 3 yolla aktive edilebildiği gösterilmiştir: Otoaktivasyon, transaktivasyon ve non-kaspaz proteazları ile proteoliz (80,84). Prokaspazlar düşük fakat saptanabilir bir proteolitik aktiviteye ve belli koşullar altında otoaktivasyon potansiyeline sahiptir. Wild tip kaspazların aşırı salınımı ile prokaspaz 8 veya prokaspaz 9 uzun subunitleri arasındaki protein etkileşimi aracılığıyla oligomerler oluşturulur. Prokaspazların oligomerizasyonu otoaktivasyon için gereklidir. Başlangıç kaspazları bir kez aktive

olduğunda diğer prokaspazları transaktive eder. Kaspaz aktivasyonu için diğer bir mekanizmada non-kaspaz proteazları ile direk proteolizdir. Örnek olarak sitotoksik T hücre proteinazı, granzim-B, bir aspartat-spesifik serin proteinazı prokaspaz 3 ve 7'nin etkin bir aktivatörüdür. Granzim-B ayrıca prokaspaz 8, 9 ve 10'un aktivasyonunda da görev alır (8,82,90,116).

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu), ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, ya da kaspaz 9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir.

Kaspaz ailesinin ve kaspaz inhibitörlerinin keşfi apoptotik hastalıklara terapötik yaklaşımda bizleri cesaretlendirmektedir. Zira farklı kaspazlara spesifik farklı sentetik inhibitörlerin yanı sıra kaspaz aktivasyonunu ya da kaspaz aktivitesini önleyen doğal kaspaz inhibitörleri de bulunmuştur (116,121).

Kaspazların apoptozla ilk ilişkisi bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ın genetik analizi sırasında ortaya çıkmıştır (162). CED-3, CED-4 ve CED-9 genleri *Caenorhabditis Elegans*'taki apoptozu düzenlemekte olup memelilerde de bu genlerin homologlarının bulunduğu anlaşılmıştır. Bcl-2, Apaf-1 ve kaspaz proteaz ailesi, CED-3, CED-4 ve CED-9'un memelilerdeki analogları olarak tanımlanmışlardır (102,116,121).

Kaspaz ailesi CED-3'un, Bcl-2 ailesi ise CED-9'un homologudur. Kaspazlar proteolitik kaskadı aktive ederek apoptozu indüklerler. Gerek solucanlarda, gerekse de memelilerde temel apoptoz mekanizmaları birbirine benzer. Memelilerde apoptozun farklı formlarındaki ana kontrol noktası mitokondridir (122,123). Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte irreversible noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir (102,122,124). Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle, ya sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir (apoptozun başlaması) ya da sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması baskılanır (apoptozun inhibisyonu).

Kaspaz aktivasyonunun başlaması için mitokondrinin devreye girmesi gereklidir. Apaf-1 latent sitozolik bir protein olup mitokondri tarafından salınan sitokrom c ile

bağlanarak kompleks oluşturur. Bu da inaktif prekursor haldeki kaspaz 9'u aktive eder (121,125).

2.3.3. Apoptozda Kaspaz 3 ve Kaspaz 9'un Önemi

Diğer kaspazlar gibi kaspaz 3 ve kaspaz 9 da prokaspaz olarak sentez edilir. Kaspaz 3 ve kaspaz 9, kaspaz 8 ve kaspaz 10 ile birlikte aktive edilirler. Daha sonra kaspaz 3, kaspaz 6 ve 7'yi aktive etmektedir. Kaspaz 3 apoptozun efektör fazındaki en önemli kaspaz rolünü üstlenirken kaspaz 9 apoptozu başlatan kaspazlar grubunda yer almaktadır.

DNA fragmentasyonunda, DNAase aktivasyonuna sebep olan kaspaz 3'ün direk rolü olduğu düşünülmektedir. Kaspaz 3 geninin yeteri kadar açığa çıkmamış olmasıyla beraber kromozom 8 üzerinde lokalize olduğu bilinmektedir. Bu gen embriyonun 4. günden itibaren gelişimden sorumludur. Kaspaz-3'teki eksiklik 3 haftalık embriyoda ölüme neden olabilmektedir (107,126).

Apoptotik proseste kaspaz 3'ün en önemli rolü üstlendiği ve kaspaz 9'unda kaspaz-3'e benzer özellikler gösterdiği son çalışmalarla desteklenmektedir (90,127).

Başlatıcı kaspazlar (kaspaz 9) apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara (kaspaz 3) naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olur (117).

Kaspaz 9 diğer kaspazları aktive eder. Bir kaspazın diğerini aktive etmesi proteolitik aktivitenin geniş bir kaskadını yaratır (kan pıhtılaşması ve kompleman aktivasyonu gibi). Bu durum; Sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın yıkılımı, ve hücrenin fagositozunu başlatır. Bir kaspaz inhibitör ailesi olan IAP (inhibitors of apoptosis)'leri kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedir. IAP' ler ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozu durdurabilir (90,116).

Kaspazlardaki defektler, otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna neden olmaktadır (90,114,116).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Lösemi hastalarında kaspaz 3 ve kaspaz 9 gen polimorfizmleri ve enzim düzeylerinin araştırıldığı bu çalışmada; kaspaz 3 ve kaspaz 9 gen polimorfizmlerinin araştırılması için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji kliniğinde lösemi tanısı konmuş 100 hasta deney grubumuzu oluşturdu. Kontrol grubu ise lösemi hastalarıyla benzer yaş ve cinsiyet özellikleri göz önünde tutularak oluşturulan 100 sağlıklı bireyden oluşturuldu. Deney ve kontrol grubuna ait bireylerden alınan kan örneklerinin polimorfizm çalışmaları GEN Plaza Biyoteknoloji Merkezi'nde gerçekleştirildi.

Gen polimorfizmi çalışmamıza katılan deney ve kontrol grubuna ait kan örneklerinden elde edilen serumda kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim düzeyi ölçümleri Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmamızda hasta grubu oluşturulmadan önce Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı.

Çalışmamızda, hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylere bilgi verilerek çalışma öncesi yazılı ve sözlü onayları alındı. Yaş, cinsiyet ve diğer risk faktörleri ile ilgili bilgileri içeren bilgi formları dolduruldu. Hasta ve kontrol gruplarını oluşturan bireylerden DNA izolasyonu ve serum eldesi için 9-10 ml venöz kan 1 ml % 2'lik etilendimetiltetraasetik asit (EDTA) içeren, 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. Tüpe alınan venöz kanlar önce santrifüj edilerek serumlarına ayrıldı. Serumlar kaspaz aktivasyonun ölçümüne kadar -20 derecede, geriye kalan kanlar da DNA izolasyonuna kadar +4 derecede saklandı. Serumda kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivitelerinin ölçümü İnvitrogen marka ELISA kitleri ile gerçekleştirildi. DNA izolasyonu High Pure PCR Template Preparation Kit ile yapıldı. Elde edilen DNA'lardan kaspaz 3 G>T rs4647601, kaspaz 9 A>G rs 4645978 polimorfizmlerine ait gen bölgelerinin çoğaltılması, genotiplendirilmesi ve analizleri 'Bioneer marka ExiCycler™-96 model Realtime PCR' cihazı ve ExiData V3.54.8 yazılımı (Bioneer) ile gerçekleştirildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Bioneer marka ExiCycler™-96 model QPCR cihazı

- Santrifüj (Nüve NF-800)
- Mikrosantrifüj (Hermle, Z160M)
- Spektrofotometre (Analytikjena-SPECORD 50)
- ELISA Reader
- Vortex-Mikser (BIONEER Marka ExiSpin Model)
- Pipetleme Robotu (Arise Marka EzMate401 Model)
- Filtreli Pipet ucu (AXYGEN, Kat No: AXT-300)
- Ependorf tüpler (AXYGEN, Kat No: AXMCT-150-C)
- Otoklav (Nüve OT 4060 V)
- Etüv (Nüve EN-500)
- Vorteks (VELP)
- Elektromanyetik Karıştırıcı (Nüve MK-418)
- Mikropipet Seti (Eppendorf)
- Derin Dondurucu (Arçelik-2031D)
- Buzdolabı (Arçelik-8188 NF)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- DNA İzolasyon Kiti (Roche)
- ELISA Kiti (İnvitrogen)
- qPCR Master Miks primer setleri (GreenStar)
- qPCR Master Mix (Bioneer, içerdikleri: Taq DNA Polimeraz, 10X reaction buffer, Dye (Xylene Cyanole), Stabilizer (sorbitol), Tween 20, dNTP)
- Bidistile Su (Sigma W-3500)
- AccuPower GreenStar qPCR PreMix (Kat No: K-6210, Bioneer)
- Primer/Probe (Bioneer Kat No: S-1001)

3.1.3. Kan Serumunun Ayrılması

EDTA'lı tüpe alınan kanlar 3500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Ayrılan serum aktivite ölçümüne kadar -20°C 'de bekletildi.

3.2. Hasta ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmaya, polimorfizm çalışması ve serumdan enzim aktivitesi ölçümleri için hasta grubu olarak lösemi teşhisi konmuş 100 hasta birey ve kontrol grubu olarak 100 sağlıklı birey olmak üzere toplam 200 bireyden alınan kan rnemleri dahil edildi. Hem hasta hem de kontrol grubunu oluşturan bireylere ait bilgiler etik kurallar göz önünde bulundurularak hazırlanmış olan anket formları kullanılarak alındı. Çalışmaya dahil olmayı kabul eden her bireyin bilgilendirilmiş onamı alındıktan sonra bireylerden 9-10 ml periferik kan alınarak % 2'lik EDTA içeren 15 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu.

3.3. Kaspaz 3 G>T rs4647601 ve Kaspaz 9 A>G rs 4645978 Polimorfizmlerinin Real Time PCR Yöntemiyle Moleküler Genetik Analizi

3.3.1. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada hasta ve kontrol bireyelerine ait EDTA'lı tüplere alınmış venöz kandan DNA izolasyon kiti (High Pure PCR Template Preparation Kit; Roche) ile izolasyon yöntemi kullanıldı. Daha önce toplanmış olan hasta ve kontrol gruplarına ait ve +4'de saklanan venöz kanlardan, her birey için özel olarak numaralanmış 1,5ml'lik steril santrifüj tüplerine 200µl periferik kan rneği pipetlendi. DNA izolasyonu için gerekli olan bu ilk işlem gerçekleştirildikten sonra diğer basamaklar aşağıdaki sırayla gerçekleştirildi.

1. Steril santrifüj tüpü içerisine pipetlenen 200 µl periferik kan üzerine 400 µl Lysis Solüsyonu ve 20µl Proteinaz K Solüsyonu eklendi, dikkatlice vortekslenerek karışması sağlandı,
2. rnemler su banyosunda 56 oC'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı,
3. İnkübasyonu tamamlanan rnemlerin üzerine 200 µl % 96'lık etanol eklendi ve vortekslenerek karıştırıldı,
4. Hazırlanan karışım 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş kolona aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, toplama tüpü atılarak kolon yeni toplama tüpüne yerleştirildi,

5. Kolon üzerine 500 µl Wash Buffer I pipetlendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak kolon tekrar yerleştirildi,
6. Kolon üzerine 500 µl Wash Buffer II pipetlendi ve maksimum hızda (>12000rpm) 3 dakika santrifüj edildi, toplama tüpü atılarak kolon 1,5 ml'lik steril saklama tüpüne yerleştirildi,
7. Kolon üzerine 200 µl Elution Buffer pipetlendi 2 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1dk santrifüj edildi,
8. Kolon atıldı ve elde edilen DNA +4 oC'de saklandı.

3.3.2. Kalite ve Konsantrasyon Testi

Elde edilen hasta DNA'larının saflık ve miktar tayinleri ; Nanodrop Spektrofotometre ile yapıldı. DNA'ların saflık derecesinin uygunluğu ve konsantrasyonlarının yeterliliği olduğu kayıt altına alındı.

3.3.3. Primer ve Prob Sentezi

Kaspaz 3 G>T (GCG'nin TCG'ye dönüşümü) rs4647601 ve kaspaz 9 -1263A>G rs 4645978 genlerine ait hedef gen ekspresyonlarını tespit etmek amacıyla yapmış olduğumuz Q-PCR deneylerinde kullanmış olduğumuz Primer ve Prob setleri BIONEER firmasından temin edildi (S-1001), qPCR Master Miks'leri (Kat No: K-6210), FAM filtresi kullanılarak (Eksitasyon: 490nm Emisyon: 520nm) değerlendirildi.

Çizelge 3.1. Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Genlerine Ait Polimorfizmler

Genin Adı	Gen ID	SNP rs Numarası	Pozisyon	Polimorfik Bölge	Varyant (M>m)
Kaspaz 3	836	4647601	Intron 1	GCG→TCG	G>T
Kaspaz 9	842	4645978	Promotor	-1263A>G	A>G

Çizelge 3.2. Gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan kaspaz 3 ve kaspaz 9 primer dizileri

GEN		PRİMER DİZİSİ
KASPAZ 3	Forward	5'-GCGGTAGCGCCGTCCGTTGC-3'
	Reverse	5'-ACCGAGCTCCGAGGGCGGGAG-3'
KASPAZ 9	Forward	5'-GGGAATACTTTCCTGGCAGG-3'
	Reverse	5'-GTCTTCCATTCCCTCTCCG(C→G)TC-3'

Primer ve probalar, kullanmış olduğumuz Q-PCR cihazının özelliklerine uygun olarak dizayn edildi. Prob içeriğinin, %20-80 oranında Guanin (G) – Sitozin (C) içermesine, özellikle G ile benzer çalışan nükleotitlerden ve probun 5' ucuna G bazı gelmemesine, seçilen dizide G'den çok C bazı olmasına, melting temperature (T_m) sıcaklığının 65-85 °C arasında olmasına dikkat edildi. Buna göre Q-PCR deneylerimizde GreenStar qPCR Mastr Miks primer setleri kullanıldı. Primerin gen bölgelerini artırıp azaltması SYBER GREEN boyasının serbest halde DNA üzerine bağlanmasıyla oluşan sinyalin, FAM filtresi kullanılarak floresan miktarının ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Uygun PCR koşullarında primerin hedef bölge üzerine bağlanması ve uzamasının ardından yeni zincir oluşmaya başlar. DNA zincir sentezi uzadıkça ve her bir döngüde ürün miktarı arttıkça floresan ışımaya da ona bağlı olarak artmaya devam eder. Kullanılan primer dizileri uygun ve uyumlu olduğu sürece ilgili gen bölgesi çoğalır, tek bir baz değişikliği bile gen bölgesinin tamamının çoğalmasını engelleyeceği ve sonraki dizinin bölgeyi çoğaltmasına izin vermeyeceği için; aynı diziyeye sahip olmayan gen bölgelerinde farklı amplifikasyon eğrileri elde edildi.

3.3.4. Örnek Mikslerinin Hazırlanması

qPCR mikslerini hazırlamak için Arise Marka EzMate401 Model Tam Otomatik Pipetleme Robotu kullanıldı.

- Cihaz açıldı, Self Test (Kendi kendini kontrol sistemini) otomatik olarak yapıldı ve cihaz kullanıma hazır hale getirildi.
- Ekstraksiyonu yapılan örnekler, Master mix, primerler ve PCR suyu protokolda belirtilen oranlarda kullanılarak tüpler qPCR çalışmasına hazır hale getirildi.
- Hazırlanan qPCR tüplerin üzeri 'Sealing' ile kapatılıp Vortex-Spin yapıldıktan sonra qPCR

cihazına yüklendi.

- Hazırlanan mikslar, optik şeffaf filme kaplı 0,2ml'lik PCR tüpleri içerisinde (Vortex-Mixer cihazı ile homojenliği sağlandıktan sonra) Q-PCR cihazına yerleştirildi. Deneyleerin amplifikasyon koşulları, (SyberGreen Master Mix için gerekli sıcaklık, süre ve döngü sayıları) zaten BIONEER (Cihazları, Master Mix'leri ve Primer-Prob'ların üreticisi) tarafından optimize edildiği için ilk çalışmada sonuç alındı.

3.3.5. Real Time PCR Reaksiyon Ortamının Hazırlanması

Polimorfizmlerin belirlenmesi için önce Real Time PCR reaksiyon miksi 96 kuyucuklu saydam polipropilen tabağın (plate) kuyucuklarına dağıtılmıştır. Hazırlanan karışımın kontamine olup olmadığını belirlemek için her bir reaksiyon tabağında örnek DNA içermeyen negatif kontrol kuyucuğu kullanılmıştır. Reaksiyon karışımı kuyucuklara dağıtıldıktan sonra 96 kuyucuklu plate için Real Time PCR Film ile kuyucukların üzeri kaplanmıştır. Isı bloğuna yerleştirilen plate daha önceden hazırlanan yürütme metodu şablon dosyası açılarak reaksiyon başlatılmıştır. Yaklaşık iki buçuk saat süren deneyin ardından genotip tayini yapılmaya çalışılmıştır. Her bir polimorfizm için şablon dosyada kayıtlı aşağıdaki Real Time PCR şartları kullanılmıştır:

- 43,0 µl, PCR Grade Water
- 5,0 µl Örnek DNA'sı (Yaklaşık 50 ng/uL)
- 1,0 µl, Primer/Prob Seti (10 pmol/uL)
- µl, qPCR PreMix (İçeriği: Taq DNA Polimeraz, 10X reaction buffer, Dye (Xylene Cyanole), Stabilizer (sorbitol), Tween 20, dNTP)

Çizelge 3.3. Master Miks ile Hazırlanan Reaksiyon Hacmi ve Real Time PCR Protokolü

Q-PCR Reaksiyon Karışımı		Reaksiyon Hacmi
Örnek	Negatif Kontrol	5µl
	Örnek DNA	5 µl
Forward Primer		1 µl
Revers Primer		1 µl
PCR Grade Su		43 µl
Toplam		50 µl

Çizelge 3.3.'ün Devamı

Basamak	Sıcaklık	Çalışma Zamanı
Line1: ilk-denatürasyon	95	5 dakika
Line2: denatürasyon	95	5 saniye
Line3: ayrılma ve uzama	60	40 saniye
Scan	Hedef boya/filtre: FAM/TAMRA	

3.4. Kan Serumunda Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Düzeylerinin Ölçümü

Serumda kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim düzeylerinin belirlenmesi amacıyla güden bu çalışmada enzim aktivitesi düzeylerini belirlerken invitrogen marka ELISA kitleri kullanıldı.

3.4.1. Kaspaz 9 Enzim Düzeyinin Belirlenmesi

Enzim düzeyini belirleme çalışmamızı gerçekleştirirken ilk olarak hem kaspaz 3 hem de kaspaz 9 için aynı şekilde gerçekleştirilen standart hazırlandı. Aşağıdaki sıralamada standart hazırlanışı ve daha sonraki aşamalar sırasıyla açıklanmıştır.

Standart Hazırlanışı

- Standart proteine 500 µl distile su katıldı ve protein suyun içinde iyice çözdürüldü.
- 7 adet ependorf tüpe 225 µl sample diluent eklendi ve tüplere sırayla numara verildi.
- 1. tüpe 225 µl hazırlanan standart proteinden eklendi. İyice vortekslendi. Daha sonra aşamalar halinde 1. tüpten 2. tüpe 225 µl solüsyon aktarıldı. En son tüpten 225 µl dışarı atılarak standart seyritilerek hazırlandı.

Yıkama Solüsyonunun Hazırlanışı

- 20X lik yıkama solüsyonundan 1X lik yıkama solüsyonun elde edilmesi amaçlandı.
- 25 ml Wash Buffer'dan alındı ve 475 ml distile su konuldu.

Diğer Aşamalar

- Assay Buffer'dan 2,5 µl alındı ve üzerine 47,5 µl distile su katıldı. Bu şekilde Assay Buffer 1X şeklinde hazırlandı.
- Detection Antibody'den 18 µl alındı. Üzerine daha önce hazırladığımız 1X lik Assay Buffer'dan 1782 µl eklendi. Bu şekilde Detection Antibody hazırlandı.
- İlk 8'lik sıranın 7'sine 100 µl hazırlanan standartlardan eklendi. Sondaki iki kuyucuğa (kör) 100 µl sample diluent eklendi.
- Örneklerin koyulacağı kuyucuklara 50 µl sample diluent koyuldu. Sample diluentin üstüne serum örneklerinden 50 µl eklendi.
- Standart ve körler dahil bütün kuyucuklara hazırladığımız Detection Antibody'den (1X) 50 µl eklendi ve üzerleri cover plate ile kapatılarak ışık almayan bir ortamda 2 saat beklemeye alındı.
- 2 saat beklemeden sonra daha önce hazırlanan yıkama solüsyonuyla 3 defa yıkama yapıldı.
- 5,998 ml Assay Buffer'ın üzerine 2 µl HRP eklendi (toplamda 6 ml). Yıkamadan sonra bütün kuyucuklara 100 µl dilue edilmiş antirabbit-imminoglobulin G-HRP eklendi ve tekrar üzerleri tekrar cover plate ile kapatılarak ışık almayan ortamda 1 saat beklemeye alındı.
- 1 saat beklemeden sonra standart, kör ve örneklerin bulunduğu plate ters çevrilerek boşaltıldı ve 3 defa yıkama yapıldı.
- Tüm kuyucuklara 100 µl TMB subsrat solusyonu eklendi. 10 dk karanlık ortam ve oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüm kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu eklendi.
- Son olarak ELISA Reader'da 450nm de ölçüm yapıldı. Sonuçlar kaydedildi.

3.4.2. Kaspaz 3 Enzim Düzeyinin Belirlenmesi

Kaspaz 3 enzim düzeyi belirlenirken aşağıdaki aşamalar gerçekleştirildi.

- Kaspaz 9 için hazırlanan standart aynı şekilde kaspaz 3 içinde hazırlandı. 100 µl standart diluent buffer standart kuyularına koyuldu. 1 kuyu kromojen blank olarak bırakıldı.

- Standart kuyuları dışındaki diğer kuyulara 100 µl çalışılacak örnekler koyuldu ve hafif hareketle plate sallandı.
- Kuyuların üzeri cover plate ile kapatıldı ve 2 saat oda sıcaklığında bırakıldı.
- Kuyucukların içerisindeki içerikler ters çevrilerek kaspaz 9 çalışmasında hazırlanan yıkama solüsyonu aynı şekilde kaspaz 3 içinde hazırlandı ve 4 defa yıkama yapıldı.
- Caspase 3 (active) Detection Antibody'den kromojen kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara 100 µl eklendi.
- Kuyuların üst kısımları cover plate ile kapatıldı ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.
- 1 saat sonunda plate tekrar ters çevrildi ve 4 defa yıkama yapıldı.
- Blank (kromojen) kuyucuğu hariç bütün kuyucuklara protokole göre hazırlanan antirabbit imminoglobulin HRP working solusyonundan 100 µl eklendi.
- Kuyuların üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi.
- Tüm kuyulara 100 µl stabilize kromogen eklendi. Eklemeden sonra kuyucuklardaki renk mavileşti. Bu işlem blank kuyucuğuna da yapıldı. Daha sonra karanlık ortamda 30 dk beklemeye alındı ancak bu defa üzeri kapatılmadı.
- 30 dk sonunda blank dahil tüm kuyulara 100 µl stop solution eklendi ve kuyular hafifçe sallanarak karıştırıldı. Bu işlem sonucunda mavi renk sarı renge dönüştü.
- Son olarak ELISA Reader'da 450 nm de absorbans okundu. Sonuçlar kaydedildi.

3.5. İstatistiksel Analizler

Lösemi hastalarında kaspaz 3 ve kaspaz 9 gen polimorfizmleri ve enzim düzeyleri arasındaki istatistiksel ilişkinin belirlenmesi amacıyla uygulanan istatistiksel testler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim Anabilim Dalı'ndan danışmanlık alınarak yapıldı.

Hasta ve kontrol gruplarında verilerin dağılıma uygunluk kontrollerine 'Shapiro Wilk testi' ile bakıldı. Normal dağılıma uygun parametreler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma uymayan verilerde ise medyan ve yüzdellikler verildi. Hasta ve kontrol gruplarında normal dağılıma sahip parametreler için iki grup karşılaştırmasında 'Student t testi' uymayan parametreler için ise 'Mann Whitney U testi' kullanıldı. Gruplar ile kategorik değişkenler arasındaki ilişkilere ise 'ki kare' analizi ile test edildi. Oranlar arasında fark olup olmadığına 'z testi' ile bakıldı. Verilerin analizinde SPSS11.5 ve Medcal®v.10.3 paket programı kullanıldı, $p < 0,05$ için sonuçlar anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Lösemi hastalarında kaspaz 3 ve kaspaz 9 gen polimorfizmleri ve enzim düzeylerinin araştırıldığı bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Hematoloji kliniğinde lösemi tanısı konulmuş, yaşları 17-81 arasında değişen 69'u erkek ve 31'i kadın olmak üzere toplamda 100 lösemi hastası hasta grubumuzu oluşturdu. Hastalarla benzer yaş grubu ve cinsiyette hastalıkla ilişkisi olmayan yaşları 24-78 arasında değişen 31'i kadın, 69'u erkek olan toplam 100 sağlıklı birey de kontrol grubumuz olarak çalışmamıza katıldı. Kaspaz 3 ve kaspaz 9 genlerinin polimorfizmlerini araştırdığımız bu çalışmamızda, 100 lösemi hastası ve 100 sağlıklı birey olmak üzere toplam 200 kişiden oluşan örnek hacmi kullanıldı. Kontrol grubumuzun yaş ortalaması; 54.155, deney grubumuzun yaş ortalaması ise 56'dır. 200 kişiden oluşan gen polimorfizmi çalışmamızda her bir birey için genotiplendirme işlemi Bioneer marka ExiCycler™-96 model Real-Time PCR cihazı ile gerçekleştirildi.

Kaspaz 3 ve kaspaz 9'un enzim düzeylerinin araştırılması için yine gen polimorfizm çalışmamıza katılan lösemi hastaları ve sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubumuz çalışıldı. Polimorfizm çalışmasında da belirtildiği gibi kaspaz 3 ve kaspaz 9'un enzim düzeylerini belirleme çalışmamıza 100 lösemi hastası ve 100 kontrol grubu olmak üzere toplam 200 kişiden oluşan örnek hacmi kullanıldı. 200 bireyden oluşan örneklerimizin serumda enzim düzeyi ölçümlerinde invitrogen marka kaspaz 3 ve kaspaz 9 ELISA kitleri kullanıldı.

Lösemide etkili diğer risk faktörlerinden olan cinsiyetin lösemi ile ilişkisi değerlendirildiğinde; hastalarımızın %69'unun erkek ve %31'inin kadınlardan oluşmuş olduğu belirlendi. Bu durum lösemisinin erkek cinsiyette daha yaygın olduğunu göstermektedir ($p<0,0001$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kontrol Grubu ve Lösemi Hastalarının Cinsiyete Göre Dağılımı ve Yaş Ortalamaları

Cinsiyet	Kontrol Grubu (N)	\bar{X} Yaş	Lösemi Hastaları (N)	\bar{X} Yaş
Kadın	31	54.73±16.28	31	56.09±14,84
Erkek	69	53.28±16.97	69	55.95±15,57
Toplam	100	54.155±18.314	100	56.00±15,277

Lösemide etkili diğer risk faktörlerinden biri olan ileri yaşın lösemi ile ilişkisi değerlendirildiğinde; lösemi hastalarının yaş gruplarına göre dağılımının %19'unun 40 yaş altında, %15'inin 40-49 yaş aralığında, %31'inin 50-59 yaş aralığında, %15'inin 60-69 yaş aralığında ve %20'sinin 70 yaş ve üzerinde olduğu saptandı. Lösemi hastaları kendi içinde yaş gruplarına göre birbirleriyle karşılaştırıldığında 40 yaş altında hastalık oranının en düşük, 50-59 yaş aralığında ise maksimum sınırdaki olduğu belirlendi. 100 hastamızdan 41'i ortalama yaş olan $\bar{X} = 56$ 'nın altında, 59'u ise $\bar{X} = 56$ 'nın üzerindedir ($p < 0.001$) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2: Kontrol Grubu ve Lösemi Hastalarının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

			GRUP		P
			KONTROL	LÖSEMİ HASTALARI	
YAŞ	<40	Kişi Sayısı	15	15	P<0.001
	40-49	Kişi Sayısı	18	19	
	50-59	Kişi Sayısı	29	31	
	60-69	Kişi Sayısı	17	15	
	≥ 70	Kişi Sayısı	21	20	
YAŞ (ORTALAMA±SD)			54.155±18.314	56 ±15.277	
TOPLAM			100	100	

4.1. Real-Time PCR İle İlgili Bulgular

Çalışmamızda kaspaz 3 G>T (GCG → TCG) rs4647601 ve kaspaz 9 -1263A>G rs4645978 polimorfizmlerinin gen bölgelerine ait SNP taraması (Single Nucleotide Polymorphism: Tek Nokta Mutasyonu) Real-Time PCR cihazı ile gerçekleştirildi. Real-Time PCR reaksiyon miksi, 96 kuyucuklu saydam polipropilen tabağın (plate) kuyucuklarına yerleştirildi. Çalışma her aşamasında uygun donanımlarla kontrol edildi. Her bir örnek için ilgili allel kontrolü yapıldı; Kaspaz 3 ve kaspaz 9 için tanımlanan SNP protokolü tüm örnekler için uygulandı ve kayıt altına alındı. Elde edilen PCR amplifikasyon eğrileri ile her bir örneğin ayrı ayrı genotiplendirilmesi yapıldı.

4.1.1. Kontrol Grubu ve Lösemi Hastalarında Kaspaz 3 G>T rs4647601 ve Kaspaz 9 A>G rs4645978 Polimorfizmlerine Ait Allel ve Genotip Frekanslarının Değerlendirilmesi

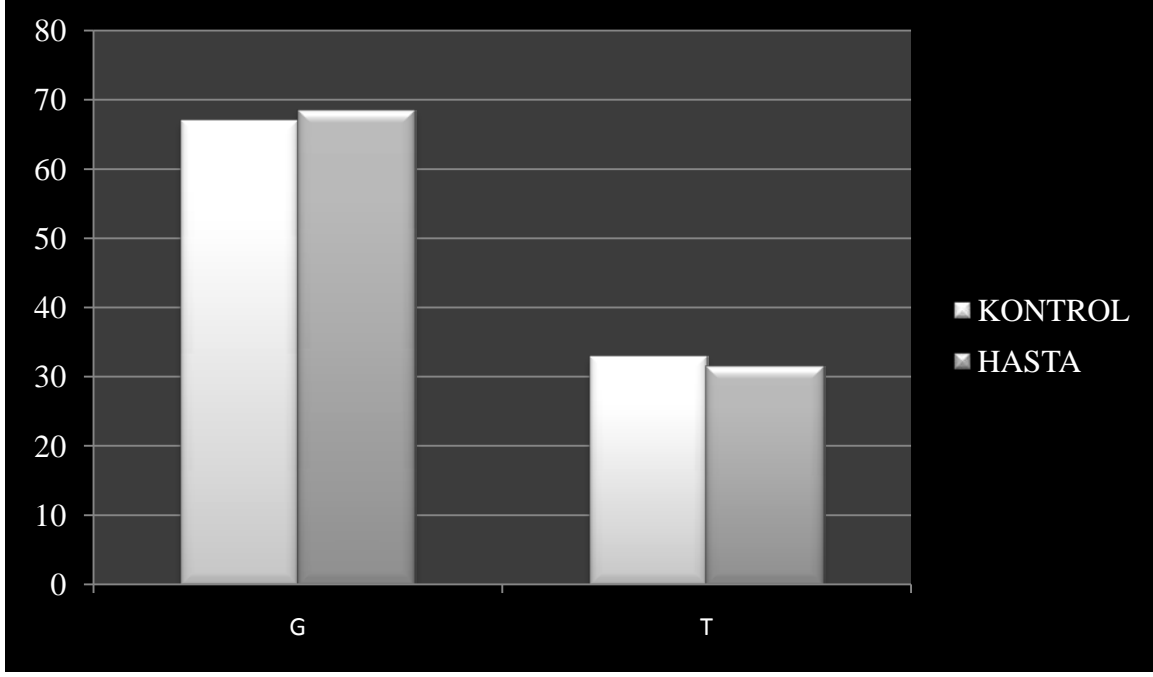
4.1.1.1. Kaspaz 3 G>T rs4647601 Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Frekansları

Kontrol ve hasta grubundaki Kaspaz 3 G>T polimorfizmine ait allel frekansları incelendiğinde; yabancı G allel frekansı kontrol grubunda %67 iken hasta grubunda %68,5'dir. Polimorfik T allel frekansı kontrol grubunda %33 iken hasta grubunda %31,5'dir (P=0,452).

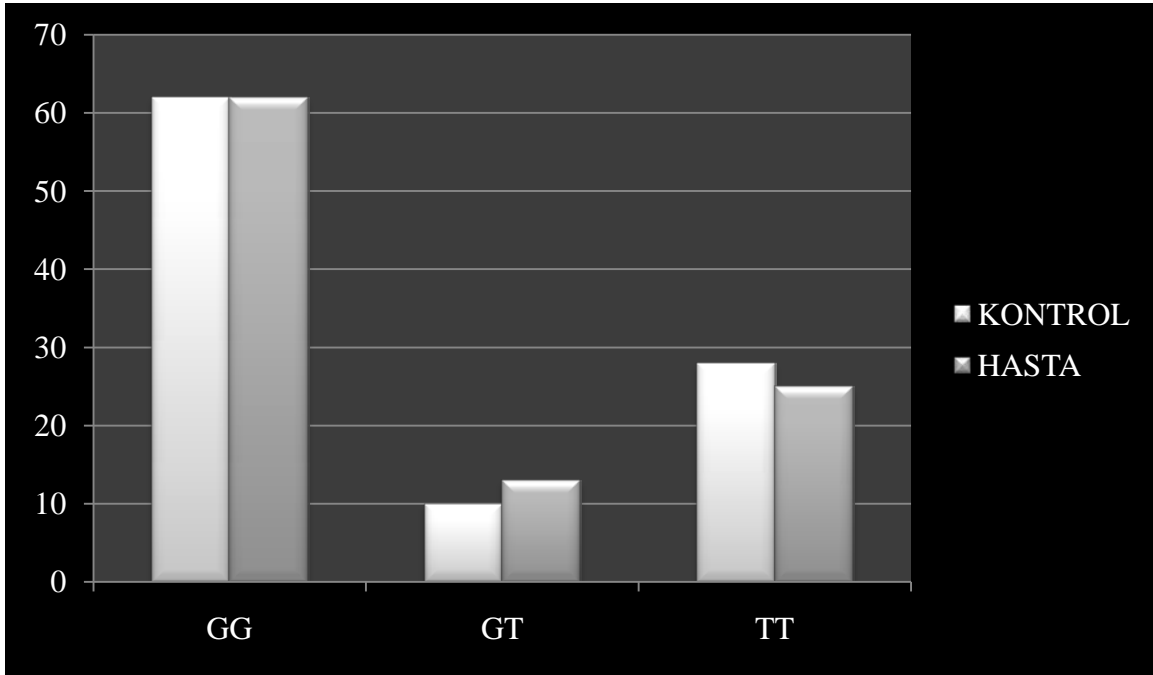
Kontrol ve hasta grubundaki Kaspaz 3 G>T polimorfizmine ait genotip frekansları ise; GG homozigot yabancı genotip frekansı kontrol grubunda ve lösemi hastalarında %62'dir. Heterozigot GT frekansı kontrol grubunda %10, lösemi hastalarında ise %13 'tür. Polimorfik TT genotip frekansı kontrol grubunda %28, lösemi hastalarında ise %25 olarak bulundu (P=0,755). İncelenen populasyonun kaspaz 3 geni polimorfizmi bakımından Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı sonucuna varıldı. Kaspaz 3 G>T rs4647601 gen polimorfizmi lösemiye yakalanma riskini etkilememektedir (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3. Kaspaz 3 G>T rs4647601 Polimorfizmi Genotip ve Allel Oranlarının Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı (N: Allel ve Genotip Sayısı)

Kaspaz 3 G>T		Kontrol Grubu		Lösemi Hastaları		P
		N	(%)	N	(%)	
Allel	G	134	67	137	68.5	P = 0.452
	T	66	33	63	31.5	
Genotip	GG	62	62	62	62	P = 0.755
	GT	10	10	13	13	
	TT	28	28	25	25	



Şekil 4.1. Kaspaz 3 G>T rs4647601 Polimorfizmi Allel Oranlarının Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı (%)



Şekil 4.2. Kaspaz 3 G>T rs4647601 Polimorfizmi Genotip Oranlarının Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı (%)

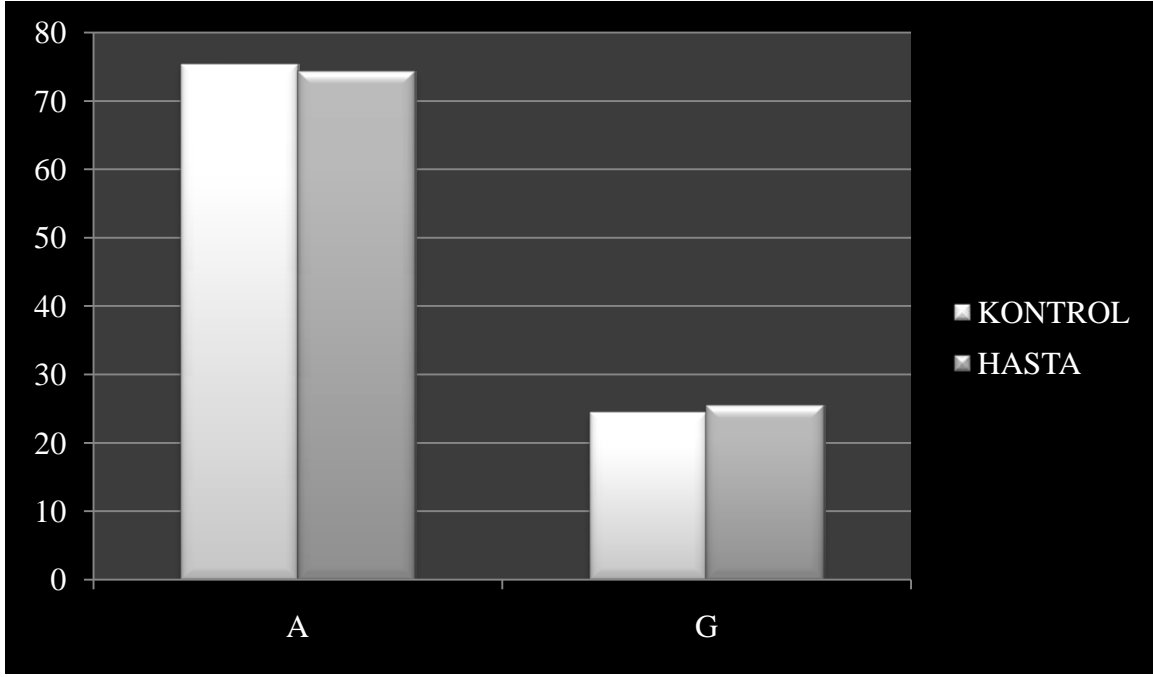
4.1.1.2. Kaspaz 9 A>G rs4645978 Polimorfizmine Ait Allel ve Genotip Frekansları

Kontrol ve hasta grubundaki Kaspaz 9 A>G polimorfizmine ait allel frekansları incelendiğinde; yabancı A allel frekansı kontrol grubunda %75,5 iken hasta grubunda %74,5'dir. Polimorfik G allel frekansı kontrol grubunda %24,5 iken hasta grubunda %25,5'dir (P= 0.684).

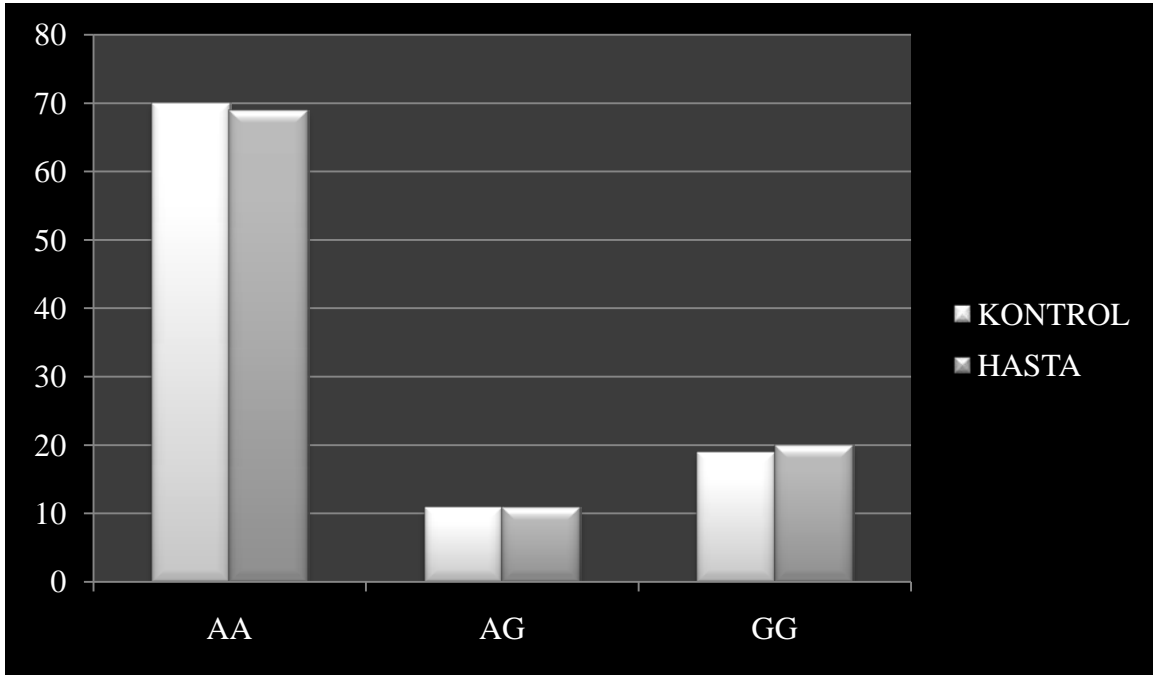
Kontrol ve hasta grubundaki Kaspaz 9 A>G polimorfizmine ait genotip frekansları ise; AA homozigot yabancı genotip frekansı kontrol grubunda %70, lösemi hastalarında %69'dur. Heterozigot AG frekansı kontrol grubunda ve lösemi hastalarında %11'dir. Polimorfik GG genotip frekansı kontrol grubunda %19, lösemi hastalarında ise %20 olarak bulundu (P=0,984). İncelenen populasyonun kaspaz 9 gen polimorfizmi bakımından Hardy-Weinberg dengesinde olmadığı sonucuna varıldı. Kaspaz 9 A>G rs4645978 gen polimorfizmi lösemiye yakalanma riskini etkilememektedir (Çizelge 4.4)

Çizelge 4.4. Kaspaz 9 A>G rs4645978 Polimorfizmi Genotip ve Allel Oranlarının Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı (N: alel ve genotip sayısı)

Kaspaz 9 A>G		Kontrol Grubu		Lösemi Hastaları		P
		N	(%)	N	(%)	
Allel	A	151	75.5	149	74.5	P = 0.684
	G	49	24.5	51	25.5	
Genotip	AA	70	70	69	69	P = 0.984
	AG	11	11	11	11	
	GG	19	19	20	20	



Şekil 4.3. Kaspaz 9 A>G rs4645978 Polimorfizmi Allel Oranlarının Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı (%)



Şekil 4.4. Kaspaz 9 A>G rs4645978 Polimorfizmi Genotip Oranlarının Hasta ve Kontrol Grubu Arasındaki Dağılımı (%)

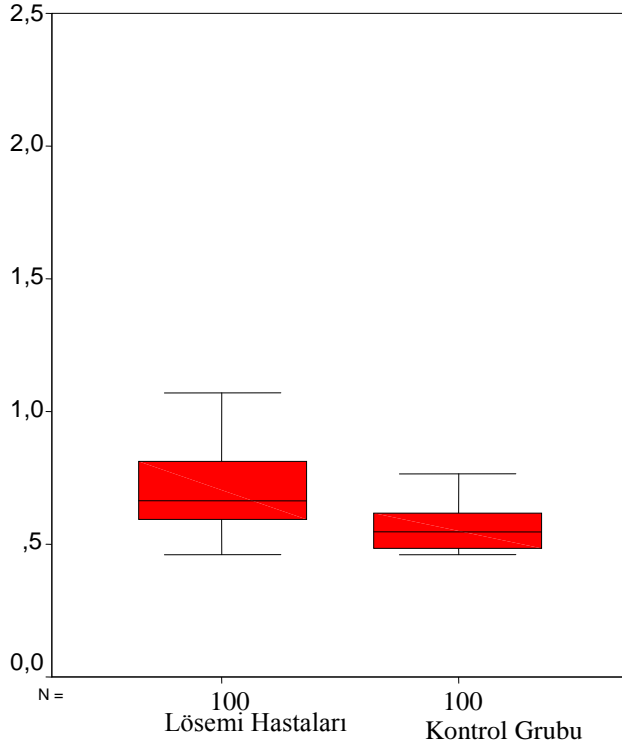
4.2. Kontrol Grubu ve Lösemi Hastalarında Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 Enzim Düzeylerinin Değerlendirilmesi

4.2.1. Kaspaz 3 Enzim Düzeyinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubu ile lösemi hastalarının kaspaz 3 enzim düzeylerini karşılaştırdığımızda; kaspaz 3 enzim düzeyi kontrol grubunda 0.55 ng/ml iken, lösemi hastalarında ise 0.67 ng/ml değerinde bulunmuştur ($p < 0.001$). İncelenen populasyonun kaspaz 3 enzim düzeyinin lösemi hastalarında daha yüksek olduğu ve bulguların Hardy-Weinberg dengesinde olduğu belirlendi. Kaspaz 3 enzim düzeyi lösemi ile ilişkilidir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Kaspaz 3 Enzim Düzeylerinin Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı

KASPAZ 3 ENZİM DÜZEYLERİ	
Kontrol Grubu (N=100)	Lösemi Hastaları (N=100)
Med [Q1-Q3]	Med [Q1-Q3]
0.55 [0.48-0.62]	0.67 [0.59-0.81]



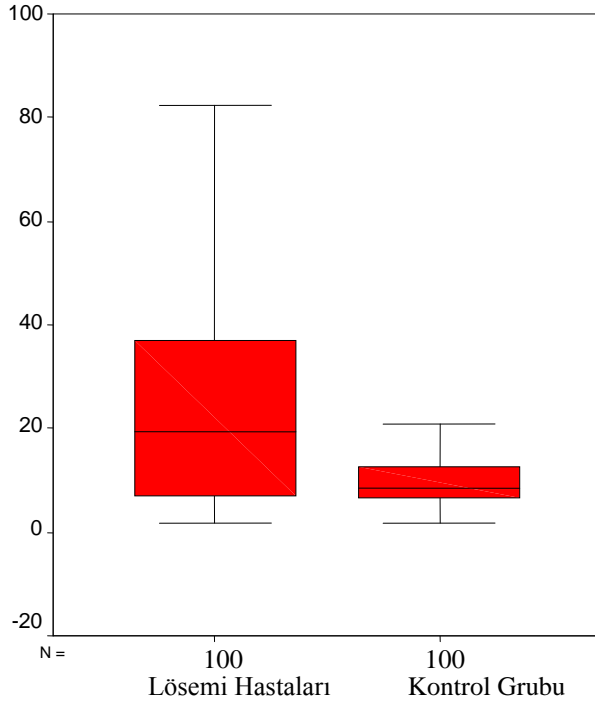
Şekil 4.5. Kaspaz 3 Enzim Düzeyinin Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı (ng/ml)

4.2.2. Kaspaz 9 Enzim Düzeyinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubu ile lösemi hastalarının kaspaz 9 enzim düzeylerini karşılaştırdığımızda; kaspaz 9 enzim düzeyi kontrol grubunda 8.60 ng/ml değerinde bulunurken, hasta grubunun enzim düzeyi 19.28 ng/ml değerinde bulunmuştur ($p < 0.001$). İncelenen populasyonun kaspaz 9 enzim düzeyi bakımından Hardy-Weinberg dengesinde olduğu sonucuna varıldı. Kaspaz 9 enzim düzeyi lösemiyle ilişkilidir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Kaspaz 9 Enzim Düzeylerinin Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı

KASPAZ 9 ENZİM DÜZEYLERİ	
Kontrol Grubu (N=100)	Lösemi Hastaları (N=100)
Med[Q1-Q3]	Med[Q1-Q3]
8.60[6.67-12.58]	19.28[6.87-37.29]



Şekil 4.6. Kaspaz 9 Enzim Düzeyinin Kontrol Grubu ve Lösemi Hastaları Arasındaki Dağılımı (ng/ml)

5. TARTIŞMA

Toplumda %1'den daha yüksek oranda bulunan gen seçenekleri polimorfizm olarak tanımlanır. Polimorfizmler tıpkı mutasyonlar gibi bazı DNA bölgelerinde eksilme, artma, rekombinasyonlar, gen duplikasyonu ve gen kaybı şeklinde görülse de genomda daha çok tek nükleotid polimorfizmleri olarak görülür. SNP'ler, DNA dizisindeki varyasyonlardır ve genomdaki tek nükleotid değişimleri sonucu meydana gelirler. İnsan genetik varyasyonlarının %90 kadarını SNP'ler oluşturmaktadır. Nükleotid değişimi genin kontrol, intron ve ekzon bölgesinde olabilir. Enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizm sonucu enzimlerin allellik varyantları ortaya çıkar (128).

Genetik polimorfizm çalışmaları, hastalıklar için risk altındaki kişilerin belirlenmesi ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin belirlenmesine fırsat verir. Eğer polimorfizm enzimi kodlayan bölgede oluşmuş ise vücuttaki enzim seviyesi populasyon içerisinde farklılıklar oluşturur. Enzimlerin bu polimorfik durumları çeşitli hastalıklara ve kansere yatkınlık sağlamaktadır. Bu nedenle, bu konu çalışmaların ilgi odağı haline gelmiştir (9,10,128).

Çalışmamızın temel amacı; kaspaz 3 G>T rs4647601 polimorfizmi ve kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizminin allel ve genotip oranlarını belirlemek ve bu genlerin ürünü olan enzim miktarlarının lösemiye yakalanma riskine olası etkilerini incelemektir. Diğer bir amacımız ise; yaş ve cinsiyet faktörlerinin lösemi ile ilişkisini değerlendirmektir.

100 bireyden oluşan lösemi hastası örneklemimizin 69'u erkek ve 31'i kadından oluşmaktadır. Bu durum lösemnin erkeklerde daha sık rastlanıldığını göstermektedir ($p<0.0001$). Ferlay ve ark. (129) 2008 yılında dünya çapında kanser oranları ile yapmış oldukları çalışmalarında; tahmini olarak lösemide yeni tanı konmuş 195 erkek hasta ve 155 kadın hasta olduğunu tespit etmişlerdir. 2008 yılında lösemi sonucu ölen hastaların ise 143'ünün erkek, 113'ünün de kadın olduğunu belirlemişlerdir. Siegel ve ark. (130) 2014 yılında yaptıkları Amerika'daki kanser istatistikleri araştırmalarında tahmini olarak yeni tanı almış lösemi vakalarının 30,100'ünün erkek (%4), 22,280'inin ise kadın (%3) olduğunu; ölen vakaların ise 14,040'ının erkek (%5), 10,050'sinin de kadın (%4) olduğunu tespit etmişlerdir. Lösemnin erkeklerde daha sık görüldüğü şeklindeki bulgumuz literatür bulgularıyla da örtüşmektedir.

Lösemiye yakalanmada bir diğer risk faktörü olan ileri yaşın etkisini değerlendirdiğimizde 100 kişilik lösemi grubumuzdan 41 kişi deney grubu yaş ortalamamız olan $\bar{X}=56$ 'nın altında; 59 kişi de $\bar{X}=56$ 'nın üzerindedir ($p<0.001$). Bu durum lösemnin ileri

yaş ile ilişkili olduğunun göstergesidir. Yaş ilerledikçe lösemiye yakalanma riski artmaktadır. Margolin ve ark. (35) yaptıkları çalışmada ALL'nin, en sık gözlenen çocukluk çağı kanseri olduğunu ve 15 yaş altındaki çocuklarda (özellikle 2-3 yaşlarda) gözlenen lösemilerin %80'inin ALL olduğunu belirtmişlerdir. Ancak lösemnin diğer alt gruplarının görülme sıklığı yaşla birlikte artar ve en sık olarak 60 yaş sonrasında gözlenir (35,36). Lösemnin ileri yaşta daha sık görüldüğü şeklindeki bulgumuz literatür bulgularıyla da örtüşmektedir.

Kaspaz 3 G>T rs4647601 polimorfizmine ait allel frekansları incelendiğinde; yabanıl G allelinin görülme sıklığı kontrol grubunda %67 iken lösemi hastalarında %68,5'dir. Polimorfik olan T allelinin görülme sıklığı kontrol grubunda %33 iken, lösemi hastalarında %31,5'tir (p=0,452). Kaspaz 3 G>T rs4647601 polimorfizmine ait genotip oranları incelendiğinde; yabanıl GG genotipinin görülme sıklığı kontrol grubu ve lösemi hastalarında %62'dir. Heterozigot GT genotipinin görülme sıklığı kontrol grubunda %10, lösemi hastalarında ise %13'tür. Polimorfik TT genotipinin görülme sıklığı kontrol grubunda %28, lösemi hastalarında ise %25 olarak belirlendi (p=0,755). Elde ettiğimiz bu sonuçlar kaspaz 3 G>T rs4647601 polimorfizmi allel ve genotip oranlarının lösemiye yakalanma riskini etkilemediğini göstermektedir.

Kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizmine ait allel frekansları incelendiğinde; yabanıl A allelinin görülme sıklığı kontrol grubunda %75,5 iken lösemi hastalarında %74,5'dir. Polimorfik G allelinin görülme sıklığı kontrol grubunda %24,5 iken lösemi hastalarında %25,5 olarak belirlendi (p= 0.684). Kaspaz 9 A>G polimorfizmine ait genotip frekansları ise; yabanıl AA genotipinin görülme sıklığı kontrol grubunda %70 iken lösemi hastalarında %69'dur. Heterozigot AG genotipinin görülme sıklığı kontrol grubunda ve lösemi hastalarında %11'dir. Polimorfik GG genotipinin görülme sıklığı kontrol grubunda %19 iken lösemi hastalarında %20 dir (p=0,984). Kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizmine ait allel ve genotip oranları lösemiye yakalanma riskini etkilememektedir.

Yapılan yayın taramalarında kaspaz 3'ün intron 1 bölgesinde yer alan G>T (GCG → TCG) rs4647601 polimorfizmi ile kaspaz 9'un promotör bölgesinde yer alan -1263A>G rs4645978 polimorfizminin çeşitli kanser türlerine yakalanmada olası etkilerine dair çalışmalar olduğu görüldü. Bu kanser türleri; kolorektal kanser, akciğer kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun kanseri, prostat kanseri ve meme kanseridir. Lösemi ve lösemi alt tipleriyle ilişkisine dair sadece bir çalışma vardır. Cingeetham ve ark. (131) Güney Hindistan'da yaş ortalaması 30 olan; 100 erkek ve 80 kadından oluşan 180 AML hastasında Kaspaz 9 A>G polimorfizmini araştırdıkları çalışmada polimorfik G alleli taşıyan bireylerin AML'ye yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu bulgu bizim

bulgumuzla örtüşmemektedir. Ancak bizim sonucumuz Kaspaz 9 -1263A>G rs4645978 polimorfizminin lösemi alt tiplerinde değil genel olarak lösemiye yakalanma riskine olası etkisine dairdir.

Kaspaz 3 ve kaspaz 9 polimorfizmlerinin daha çok diğer kanser türleriyle ilişkisine dair çeşitli çalışmalar mevcuttur. Abediankenari ve ark. (132) kaspaz 3 ve kaspaz 9'un söz konusu polimorfizmlerini İran'ın Mazenderan eyaletinde 143'ü erkek, 57'si kadın olan 100 mide kanserli hasta ve 100 kontrol grubuyla gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda kaspaz 3 G>T polimorfizminin mide kanserine yakalanma riskini etkilemediğini ancak kaspaz 9 -1263A>G polimorfizmi için kontrol grubunda daha yüksek oranda bulunan mutant G allelinin mide kanserine yakalanma riskini azalttığını saptamışlardır. Chen ve ark. (133) Çin'in Tianjin kentinde yaş ortalaması 50 olan; 724 erkek ve 206 kadından oluşan toplam 930 baş ve boyunda skuamöz hücre karsinomu (SCCHN) hastası ile yaptıkları çalışmada kaspaz 3 G>T rs4647601 polimorfizminde polimorfik TT genotipinin SCCHN riskini arttırdığını saptamışlardır. Xu ve ark. (134) Asya ve Kafkas ırklarında 2390 kanser hastasında kaspaz 9 polimorfizmlerinin kanser türleri ile ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında; kaspaz 9 rs4645978 polimorfizmi için Kafkaslar arasında AG ve AA genotiplerinde kansere yakalanma risklerinin düşük, GG genotipinde ise yüksek olduğunu saptamışlardır. Ayrıca AG ve AA genotipinin prostat kanserinden koruyucu etkisini göstermişlerdir. Kaspaz 9 A>G polimorfizminin akciğer kanseri ve diğer alt gruplarla önemli bir bağlantısının olmadığını saptamışlardır. Zhang ve ark. (135) kaspaz 9 gen polimorfizmlerinin kanser riskine etkilerini araştırdıkları 14 çalışmada 2733 neoplazm vakasını incelemişlerdir. Çalışmalarının meta analizinde; kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizminin kanser riskini etkilemediğini saptamışlardır. Park ve ark. (136) Kore popülasyonunda yaş ortalaması 61,6 olan 352 erkek ve 80 kadından oluşan toplam 432 hastada kaspaz 9 -1263 A>G polimorfizminin akciğer kanserine yakalanma riskini düşürdüğünü belirlemişlerdir. Yoo ve ark. (137) erken evreli küçük hücreli olmayan akciğer kanseri çalışmalarında yaşları 63 olan Koreli 327'si erkek, 84'ü kadın olan 411 akciğer kanseri hastası ile yapmış oldukları kaspaz gen polimorfizmleri çalışmalarında kaspaz 9 A>G polimorfizminin akciğer kanserine yakalanma riskini etkilemediğini saptamışlardır. Theodoropoulos ve ark. (138) 261 meme kanseri hastasında kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizmini araştırdıkları çalışmada; G alleli taşıyan bireylerin (AG, GG genotipli) G allelini bulundurmeyen bireylere (AA genotipli) göre meme kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Choi ve ark. (139) Koreli 397 kolorektal kanserli hastalarda kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizminin kolorektal kanserinde prognozu etkilemediğini saptamışlardır.

Kaspaz 3 G>T rs4647601 ve kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizmlerinin allel ve genotip oranlarının lösemiye yakalanma riskini etkilemediği şeklindeki bulgumuzu aynı polimorfizmlerin diğer kanser türlerine yakalanmada olası etkilerini inceleyen literatür bulgularıyla kıyasladığımızda elde ettiğimiz veriler; Abediankenari ve ark.'nın kaspaz 3 G>T polimorfizminin mide kanserine yakalanma riskini etkilemediğini ancak kaspaz 9 -1263 A>G polimorfizmi mide kanserine yakalanma riskini azalttığını saptadıkları yönündedir (132). Ayrıca kaspaz 9 rs4645978 polimorfizmi ile ilgili çalışmamızla benzer sonuca varan Zhang ve ark. yaptıkları 14 çalışmanın meta analizinde kanser riskini etkilemediğini, Yoo ve ark. erken evreli küçük hücreli olmayan akciğer kanserine yakalanma riskini etkilemediğini, benzer şekilde Choi ve ark. kaspaz 9 A>G polimorfizminin kolorektal kanserin prognozunu etkilemediğini saptamışlardır (135,137,139). Söz konusu literatürlerde belirtilen sonuçlar kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizminin lösemiye etkisini araştırdığımız çalışmamızın sonucu ile örtüşmektedir. Ayrıca Xu ve ark. kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizminin prostat kanseri riskini arttırdığını ancak akciğer kanseri ve diğer alt gruplarla önemli bir bağlantısının olmadığını saptamışlardır (134). Xu ve ark.'larının aksine Park ve ark. kaspaz 9 -1263 A>G polimorfizminin akciğer kanserine yakalanma riskini düşürdüğünü belirlemişlerdir (136). Theodoropoulos ve ark. kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizminin meme kanserine yakalanma riskini arttırdığını saptamışlardır (138). Chen ve ark. kaspaz 3 G>T rs4647601 polimorfizminin SCCHN riskini arttırdığını saptamışlardır (133). Literatür verileri ve kendi deney sonuçlarımız doğrultusunda kaspaz 3 G>T rs4647601 ve kaspaz 9 A>G rs4645978 polimorfizmlerinin allel ve genotiplerinin bazı kanser türleri için risk faktörü, bazı kanser türleri için koruyucu faktör oldukları, bazı kanser türlerinde ise etkilerinin olmadığı belirlendi.

Kaspaz 3 enzim düzeyi kontrol grubu ve lösemi hastalarında karşılaştırıldığında; kontrol grubunda 0.55 ng/ml iken, lösemi hastalarında 0.67 ng/ml olduğu saptandı ($p<0.001$). Lösemi hastalarında kaspaz 3 enzim düzeyinin kontrol grubuna oranla daha yüksek olması kaspaz 3 enzim düzeyinin lösemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Kaspaz 9 enzim düzeyinin kontrol grubunda 8.60 ng/ml oranında iken lösemi hastalarında 19.28 ng/ml olduğu saptandı ($p<0.001$). Aynı şekilde kaspaz 9 enzim düzeyinin deney grubumuzda yüksek olması lösemi ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Yapılan literatür taramalarında kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim düzeyleri ile lösemi ilişkisine dair herhangi bir çalışma örneğine rastlanmamıştır. Çalışmalar daha çok deney hayvanlarında bu enzimlerin etki mekanizmasını aydınlatmaya yöneliktir. Miyelodisplazi hastalarında, deneysel serebral iskemide, geçici global iskemisi sonrası nöronlarda ve travmatik spinal kord yaralanmalarında apoptozun artışı ve apoptozun artması sonucunda kaspaz

aktivasyonlarında arttığı yönündeki bilgiler ağırlıktadır. Bizim bulgularımız kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim düzeylerinin lösemi hastalarında yüksek olduğu şeklindedir.

Bouscary ve ark. (140) 30'u erken evre, 24'ü geç evre toplamda 54 miyelodisplazi hastalarında karakteristik olarak apoptozun ve kaspaz 3 aktivitesinin arttığını belirlemişlerdir. Namura ve ark. (141) kaspaz 3'ün beyindeki lokalizasyonu ile ilgili yetişkin farelerde yaptıkları incelemede kaspaz 3'ün oklüzyon periyodu boyunca aktive edildiğini saptamışlardır. Memeli beyinde iskemi sırasında apoptozun uyarıldığını ve kaspaz 3 aktivasyonunun önemli bir rolü olduğunu tespit etmişlerdir. Yakovlev ve ark (142) ratlarda travmatik beyin yaralanmalarından sonra kaspaz 3 enzim aktivitesinin arttığını tespit etmişlerdir. Bredesen (143), Koistinoho ve Hokfelt (144) iskemi üzerine yaptıkları çalışmalarında geçici global iskemi sonrası nöronlarda kaspaz 3'ün önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir. Krajewska ve ark. (145) geçici global iskemi sonrası hem kaspaz 3 mRNA'sının hem de proteininin belirgin bir şekilde arttığını saptamışlardır. Springer ve ark. (146) kaspaz 3 aktivasyonunun BAD translokasyonunu gösteren nöronlarda arttığını tespit etmişlerdir. Cai ve ark. (147) yüksek seviyede glukozla maruz bırakılan H9c2 kalp miyoblast hücreleri ve streptozotosin tarafından üretilen diyabetik farelerle yaptıkları çalışmalarında diyabetik farelerin miyokardiyumunda apoptoz yoluyla kaspaz 3 aktivasyonunun gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca yüksek seviyede glukozun apoptozu tetiklediğini saptamışlardır.

Mersin örnekleme temelinde yapmış olduğumuz bu çalışmada erkek cinsiyetin ve ileri yaşın lösemiye yakalanma riskini arttırdığını saptadık. Kaspaz 3 G>T (GCG'nin TCG'ye dönüşümü) 4647601 rs numaralı polimorfizmi ve kaspaz 9 -1263A>G 4645978 rs numaralı polimorfizminin lösemiye yakalanma riskini etkilemediğini, fakat ilgili genlerin ürünleri olan kaspaz 3 ile kaspaz 9 enzim düzeylerinin lösemi hastalarında daha yüksek olması sonucunda lösemiye yakalanma riskini arttırdığını saptadık.

Kaspaz 9'un hücrelerde apoptozu başlatma, kaspaz 3'ün ise apoptozu sonlandırma prosesinde görev yaptığı göz önüne alındığında kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim düzeylerinin lösemi hastalarında yüksek olmasına rağmen lösemi nedeniyle kontrolsüz şekilde çoğalan lenfositlerin apoptozu girmemesinin, lösemi sonucu organizmada biyolojik dengelerin sarsılması nedeniyle devreye girebilecek bazı inhibitörlerin etkisiyle olabileceğini söyleyebiliriz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda; apoptozun sonlandırma prosesinde görev alan kaspaz 3'ün intron 1 bölgesinde yer alan G>T (GCG→TCG) rs4647601 polimorfizmi ve apoptozun başlatılma prosesinde görev alan kaspaz 9'un promotor bölgesinde yer alan -1263A>G rs4645978 polimorfizminin yanı sıra kaspaz 3 ile kaspaz 9'un enzim düzeylerinin lösemiye yakalanma riskine olası etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Böylece söz konusu polimorfik genlerin düzeyleri ortaya konup lösemiye yakalanma riskine olası etkilerinin aydınlatılmasının yanında, ilgili enzimler için inhibitör ve aktivatör maddelerin ya da epigenetik faktörlerin olası etkilerinin aydınlatılması konusunda yapılacak başka çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmüştür. Ayrıca lösemiye yakalanmada risk faktörü olduğu düşünülen yaş ve cinsiyet faktörlerinin lösemiye olası etkileri araştırılmıştır.

Lösemi ile cinsiyet ve yaş ilişkisi değerlendirildiğinde Mersin ili örneklemindeki 100 lösemi hastasının 69'unun erkek, 31'inin kadın olmasından yola çıkarak lösemnin erkeklerde görülme riskinin daha yüksek olduğu saptandı. Lösemnin en sık görüldüğü yaş aralığının 50-59 yaşları civarında olduğu ve daha ileri ki yaşlarda da sık görüldüğü belirlendi.

Kaspaz 3 G>T (GCG → TCG) rs4647601 polimorfizmine ait G ve T allellerinin ve GG, GT ve TT genotip oranlarının kontrol grubu ve lösemi hastalarında benzer dağılımlar gösterdiği saptandı. Kaspaz 9 -1263A>G rs4645978 polimorfizmine ait A ve G allellerinin ve AA, AG ve GG genotip oranlarının kontrol grubu ve lösemi hastalarında benzer dağılımlar gösterdiği saptandı.

Kontrol grubu ile lösemi hastalarının kaspaz 3 enzim düzeyi karşılaştırıldığında; kaspaz 3 enzim seviyesinin lösemi hastalarında daha yüksek olduğu belirlendi (p<0.001). Kontrol grubu ile lösemi hastalarının kaspaz 9 enzim düzeyi karşılaştırıldığında da; kaspaz 9'un enzim düzeyinin lösemi hastalarında daha yüksek olduğu belirlendi (p<0.001).

Çalışmamız Mersin ili örneklemindeki Türk toplumunda kaspaz 3 ve kaspaz 9'un ilgili polimorfizmlerinin ve enzim düzeylerinin lösemi ile ilişkisini belirlemek amacıyla yapılan ilk çalışmadır. Bu çalışma ile örnekleminiz temelinde söz konusu polimorfik genlerin allel ve genotip oranları saptanmıştır. Ayrıca kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim düzeyleri ölçülerek lösemide risk faktörü oldukları belirlenmiştir. Farklı toplumlarda ve daha fazla sayıda bireyle bu çalışma gerçekleştirilebilir ve sonuç doğrulanabilir. Bu genlerin diğer SNP'leri çalışılarak ilgili genlerin serumda enzim düzeyleri ile karşılaştırılabilir. Apoptotik yollarda yer alan diğer moleküler değişimler ve bunlara ek olarak kaspaz inhibitörleri araştırılabilir. Yapılan

araştırmaların lösemi ile ilişkisinin belirlenmesi halinde lösemi de erken tanı kolaylığının sağlanması ve tedavinin kolaylaşmasının yanı sıra multifaktöryel olan bu hastalığın genetik yatkınlığının belirlenmesi açısından da önemli olacağını düşünmekteyiz. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda söz konusu polimorfizmlerin ve enzim düzeylerinin diğer hastalıklara yatkınlık oluşturmada risk faktörü olması durumunda, çalışmamızın Mersin örneklemini temelinde ülkemizin risk haritasının oluşumuna katkısı olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. **Fialkow PJ, Demmon AM, Jacobson RJ.** Chronic myelocytic leukemia. *Journal of clinical investigation*, **1978**; 62:823-825.
2. **Akdemir N, Birol L.** İç Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı. *Ankara: Sistem Ofset*, **2005**
3. **Westbrook CA.** The role of molecular techniques in the clinical management of leukemia. *Cancer Supplement*, **1992**; 70(6):1695-1700.
4. **Robinson LL.** Environmental exposures as risk factor for childhood ALL. *Cancer RES*, **1987**; 28: 249-255.
5. **Özknay C.** Kromozomlarda KKD. *Ege Üni. Tıp Fak. Dergisi*, **1982**; 21:1-4.
6. **Thompson CB.** Apoptosis is the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **1995**; 267:1456–1462.
7. **Thiele CJ, Kastan MB.** Biology of childhood cancer. In:Margolin JF, Steuber CP, and Pohlack DG,Eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology, 4th ed. *Philadelphia:Lippincott Williams &Wilkins*, **2002**; 89-119.
8. **Nicholson, DW, Thornberry, N.A.** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci*, **1997**; 22:299–306.
9. **Cotran RS, Kumar V, Collins T.** Cell Injury and Cell Death. In:Robbins Pathologic Basis of Disease. *Philadelphia: WB Saunders*, **1999**; 18-25.
10. **Golub TR.** The molecular basis of hematologic malignancy. In:Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D,Look TA, Eds. Hematology of infancy and childhood, 6th ed, Philadelphia, *WB Saunders Co*, **2003**; 1219-1258.
11. **Ulutin ON.** Hematoloji. In: Unat EK, editor. Dünya’da ve Türkiye’de 1850 yılından sonra tıp dallarındaki ilerlemelerin tarihi. *İstanbul Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Vakfı Yayınları*, **1988**; 4:191-197.
12. **Albayrak A.** Hematopoetik sistemin neoplastik hastalıkları, *Atatürk Üniversitesi Yayınları*, Erzurum, **1983**.
13. **Geary CG.** The story of chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, **2000**; 110(1):2-11.
14. **Piller G.** Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol*, **2001**; 112(2):282-292.
15. **Hamblin T.** Historical aspects of chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, **2000**; 111(4):1023-1034.

16. **Willams WS, Beutler E, Litchman MA, Coler BS, Kippt S, Mauner AM.** Willam's Hematology, 5. Edition, *McGraw Hill Company, New York*, **1991**; 2209-2349.
17. **Holyoake DT.** Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: lessons to be learned from the laboratory. *Br J Haematol*, **2001**; 113(1):11-13.
18. **Müftüoğlu E.** Klinik Hematoloji. *Şahin Basım, Diyarbakır*, **1995**; 13:363-376.
19. **McKenna RW.** Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clin Chem*, **2000**; 46(8): 1252-9.
20. **Rowe JM.** 'Epidemiology and Etioloji', In: Rowe J.M, Liesveld J.L, Diagnosis and Therapy of Acute Leukemia in Adults, Harward Academic Publishers, *New York*, **2005**; 1-25.
21. **Fırat D, Akdaş A, Atakan IA, Baltalı E, Berk Ö, Berkardo B, Bilge N, Büyükpamukcu M, Çevik N.** (Çeviri): Klinik Onkoloji, Dördüncü baskı, Sağlık Bakanlığı Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Ortak Yayımı, **1990**.
22. **Oski FA, Nathan DG.** Hematology of infancy and childhood. *W.B. Saunders company, Philadelphia*, **1987**.
23. **Estey EH.** Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer*, **2001**; 92(5): 1059-73.
24. **Lanskowsky P.** Leukemias. In: P. Lanzkowsky (ed). Manual of Peadiatric Hematol and Oncol 3rded. *Churchill Livinstone, New York*, **2000**; 14:359-411.
25. **Margolin J.F, Steuber C.P, Poplack D.G.** Acute Lymphoblastic Leukemia. In:Margolin JF, Steuber CP, and Poplack DG, Eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology, 4th ed. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*, **2002**; 2:489-544.
26. **Rowe J.M, Buck G, Burnett A.K, Chopra R, Wiernik P.H, Richards S.M, Lazarus H.M, Franklin I.M, Litzow M.R, Ciobanu N, Prentice H.G, Durrant J, Tallman M.S, Goldstone A.H.** Induction therapy for adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **2005**; 106:3760-3767.
27. **Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, Look T, Melvin SL, Brwman EP, Kalwinsky DK, Rivera G, Dahl GV.** Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **1982**; 60:864-871.
28. **Silverman BL, Sallan SE.** Acute lymphoblastic leukemia. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, Eds. Hematology of infancy and childhood, 6th ed. *Philadelphia, WB Saunders Co.* **2003**;1135-1166.
29. **Carella AM, Melo JV, Goldman JM.** Portofino International Conference on Chronic Myeloid Leukemia. *Exp Hematol*, **2009**; 29:1147-1156.
30. **Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, Bassing CH, Dai Z, Li N et al.** BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domainof the GRB-2 adaptor protein. *Cell*, **1993**; 75:175-185.

31. CML information. Erisim: <http://www.hai-bin.net/CMLinfomation.htm>. Erisim tarihi: 25.09.2009.
32. **Kantarjian HM, Talpaz M, Giles F, O'Brien S, Cortes J.** New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance. *Ann Intern Med.* **2006**; 145(12): 913-23.
33. **Rabinowitz I, Larson RS.** Chronic Myeloid Leukemia. Wintrobe's Clinical Hematology (Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, ed) Eleventh Edition. *Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004*; 2:2235-2258.
34. **Gale RP, Kanti RR.** New insight into a chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia, 1997*; 1:667-679.
35. **Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG.** Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Margolin JF, Steuber CP, and Poplack DG, Eds. Principles and Practice of Pediatric Oncology, 4th ed. *Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002*; 489-544.
36. **Silverman BL, Sallan SE.** Acute lymphoblastic leukemia. In: Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look TA, Eds. Hematology of infancy and childhood, 6th ed. *Philadelphia, WB Saunders Co, 2003*; 1135-1166.
37. **Arrighi F, Rao PN.** Genes, Chromosomes and Neoplasia. *Raven Pres. New York, 1980.*
38. **Kirsh IR.** Molecular biology of leukemias. *Peadiatr Clin North Am, 1988*; 35(49): 693-727.
39. **Uckun FM, Nachman BJ, Sather NH, Sensel GM, Kraft P, Steinherz GP, Lange B, Hutchinson R, Reagman HG, Gaynon SP, Heerama AN.** Clinical significance of Philadelphia chromosome positive pediatric ALL in context of contemporary intensive therapies. A report from the Children's Cancer Group. *American Cancer Society, 1998*; 83(9):2030-2039.
40. **Cohen FL.** Clinical genetics in nursing practise. *J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1984*; 17:285-302.
41. **Tunalı A.** Kan hastalıkları: Lösemiler. *Bursa Güneş Kitapevi, 1990*;773.
42. **Hecht F, McCaw BK, Koler RD.** Ataxia - telangiectasia clonal growth of translocation lymphocytes. *N Eng J. Med, 1988*; 289:299-307.
43. **Boaz D, Mace JW, Gotlin RW.** Poland's syndrome and leukemia. *Lancet, 1971*; 1:349-350.
44. **Bader JL, Miller RW.** Neurofibromatosis and childhood leukemia. *J Pediatr, 1978*; 92:925-929.
45. **Strevens MJ, Lilleyman JS, Williams RB.** Schwachman's syndrome and acute leukemia. *Br J Med, 1978*; 2:18.
46. **Pavelic ZP, Pavelic L, Gluckman JL, et al.** Ekspresion of multidrug resistance (MDR1) gene in human normal tissues and head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Anticancer Drugs 5, 1994*; 12.

47. **Gedikoğlu G, Koç L.** Neoplastik hastalıklar. In: ‘O. Neyzi, L. Koç (eds). *Çocuk sağlığı ve hastalıkları cilt III” Bayda yayınları, İST. 1983*: 311-365.
48. **Robinson LL.** Environmental exposures as risk factor for childhood ALL. *Cancer RES, 1987*; 28: 249-255
49. **Ross JA, Davies SM, Potter JD.** Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. *Epidemiologic, 1994*; 16:243-272.
50. **Greaves MF, Colma SM, Beard MEJ.** Geographical distribution of acute lymphoblastic leukemia subtypes: Second Report of the Collaborative Group Study. *Leukemia, 1983*; 7:27-34.
51. **Henderson ES.** Acute Leukemia: General considerations, in Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Hichtman MA editors. Hematology 4 ed. *McGraw Hill Puplicing Company, 1991*; 236-251.
52. **Aksoy M.** Akut Lösemileri de içeren malignitelerin oluşumunda bazı kimyasal maddelerin rolleri. *Doğa Tıp ve Eczacılık, TÜBİTAK, 1983*; 3:190-197.
53. **Kayaalp SO.** Tıbbi Farmakoloji 3. Baskı, Ankara, **1984**; 657:166-192.
54. **Aksoy M, Erdem Ş, Dinçol G.** Leukemia in showerkers exposed chronicaly to benzen. *Blood, 1974*; 44:837-43.
55. **Niemeyer MC, Sallan SE.** Acute lymphoblastic leukemia. Hematology Infancy& Childhood, 4. edition. *W.B. Saunders Co. 1993*; 4:1249-1268.
56. **Öztürk F.** Apoptoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 2002*; 9(2):143-148.
57. **Thompson CB.** Apoptosis. In: Paul WE, ed. Fundamental Immunology. *Lippincott-Raven Publishers, 1999*.
58. **Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF, Van A.** Molecular biology in reproductive medicine. *Parthenon Publishing Group Inc. New York. 1th Edition, 1999*; 80-87.
59. **Kerr JFR.** History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology, 2002*; 181-182: 471-74.
60. **Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology, 1995*; 146:3-15.
61. **Cohen JJ.** Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract, 1993*; 15:35-43.
62. **Çalışkan M.** Apoptosis: Programlanmış Hücre ölümleri. *Turk J Zool. Tübitak, 2000*; 24:31-35.
63. **Andreas G.** Introduction to Apoptosis. *ApoReview, 2003*; 4-26.

64. **Ameisen JS.** The origin of programmed cell death. *Science*, **1996**; 272:1278.
65. **Thompson CB.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **1995**; 267:1456-1462.
66. **Samali A, Orrenius S.** Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress and Chaperones*. *Nature*, **1998**; 3:228-236.
67. **Sreedhar AS, Csermely P.** Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, **2004**; 101:227-257.
68. **Akşit H, Bildik A.** Apoptozis. *YYÜ Vet. Fak. Derg.* **2008**; 19(1):55-63.
69. **Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M.** Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Enzymology*, **1999**; 17:329-338.
70. **Vaux DL, Korsmeyer SJ.** Cell death in development. *Cell*, **1999**; 96:245-254.
71. **Mountz JD, Zhou T.** Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. *Lippincott Williams & Wilkins*, **2001**.
72. **Hengartner MO.** The Biochemistry of apoptosis. *Nature*, **2000**; 407.
73. **Herrmann M, Kalden JR.** Apoptosis and autoimmunity, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, University of Erlangen-Nuremberg, Institute for Clinical Immunology, Weinheim, Germany. **2003**.
74. **Piret JP, Arnould T, Fuks B, Chatelain P, Remacle J, Michiels C.** Caspase activation precedes PTP opening in TNF- α -induced apoptosis in L929 cells. *Mitochondrion*, **2004**; 3:261-278.
75. **Mcphie DL, Coopersmith R, Peralta AH, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, Kozlowski MR, Neve KA, Neve RL.** DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *The Journal of Neuroscience*, **2003**; 23(17):6914–6927.
76. **Tomatır AG.** Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T. Klin. J. Med. Sci.* **2003**; 23:499-508.
77. **Inna NL.** Systems biology of apoptosis signaling Networks. *Current Opinionin Biotechnology*, **2010**; 21:1-5.
78. **Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ.** Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Differentiation*, **2012**; 19:42-50.
79. **Ssang-Goo C, Eui-Ju C.** Apoptotic Signaling Pathways Caspases and Stress-Activated Protein Kinases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **2002**; 35(1):24-27.

80. **Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C.** Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, **2004**; 29(3):237-242.
81. **Munoz PC.** Signalling Pathways That Regulate Life And Cell Death. Evolution of Apoptosis in the Context of Self Defense. *Landes Bioscience and Springer Science*, **2011**; 1-20.
82. **Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF.** Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, **1998**; 36:683-690.
83. **Öktem S, Özhan MH, Özol D.** Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, **2001**; 2 (1): 91-95.
84. **Bijl M, Limburg PC, Kallenberg CGM.** New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis Erişim: [www:dissertations.ub.rug.nl /FILES/ faculties/ medicine /2001/ m.bijl /c10 on.pdf](http://www.dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/medicine/2001/m.bijl/c10_on.pdf) Erişim tarihi:20.06.2008.
85. **Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P.** Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*, **2000**; 25:1859-1866.
86. **Elmore S.** Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, **2007**; 35:495–516.
87. **Tang D, Lotze MT, Kang R, Zeh HJ.** Apoptosis promotes early tumorigenesis. *Oncogene*, **2011**; 30:1851–1854.
88. **Avi A.** Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **2008**; 325–331.
89. **Banasiak KJ, Haddad GG:** Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res*, **1998**; 797:295-304.
90. **Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD.** Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, **2001**; 60:422-429.
91. **Kromer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B.** The biochemistry of programmed cell death. *Fedn Am. Soc. exp. Biol. J.* **1995**; 9:1277-1287.
92. **Ow YL P, Green RD, Hao Z, Mak TW.** Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2008**; 9:532-542.
93. **Hengartner MO.** The Biochemistry of apoptosis. *Nature*, **2000**; 407.
94. **Nagata S.** Apoptosis by death factor. *Cell*, **1997**; 88:355-365.
95. **Shi YA.** Structural view of mitochondria mediated apoptosis. *Nos Struct Biol*, **2001**; 8:394-401.

96. **Xu C, Bailly MB, Reed JC.** Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*, **2005**; 115(10): 2656.
97. **Tsujimoto Y.** Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis. *Apoptosomes or mitochondria Genes Cell*, **1998**; 3:697-707.
98. **Rodenburg RJT, Raats JMH, Pruijn GJM, Venrooij WJ.** Cell death. A trigger of autoimmunity *Bioessays*, **2000**; 22:627-636.
99. **Gobe G, Zhang XJ, Cuttle L et al.** Bcl-2 genes and growth factors in the pathology of ischemic acute renal failure. *Immunol Cell Biol*, **1999**; 77(3): 279-86.
100. **Taneja N, Tjalkens R, Philbert MA, Rehemtulla A.** Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system. *Oncogene*, **2001**; 20(2):167-177.
101. **Ulukaya E.** Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.
102. **Choi WS, Lee EH, Chung CW.** Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *J Neurochem*, **2001**; 77:1531-1541.
103. **Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC.** A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, **2003**; 284:1309-1318.
104. **Estaquier J, Idziorek T, Bels FD, Sinoussi FB, Hurtrel B, Aubertin AM.** Programmed cell death and AIDS; significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Immunology*, **1994**; 91:9431-9435.
105. **Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJW.** Apoptosis in testis germ cells; developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology*, **1995**; 136 (1):5-12.
106. **Ashkenazi A, Dixit VM.** Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, **1998**; 281(5381):1305-1308.
107. **Grutter MG.** Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol*. **2000**; 10:649-655.
108. **Puka SM, Valin C, Gilland E, Hallin U, Wang X, Sandberg M, Karlsson J, Blomgren K, Hagberg H.** Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury. *Brain Res Dev Brain Res*, **2000**; 125:43-50.
109. **Wickremasinghe RG, Hoffbrand AG.** Biochemical and genetic control of apoptosis: Relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood*, **1999**; 11(93): 3587-3600.

- 110. Mukae N, Enari M, Sakahira H, Fukuda Y, Inazawa J, Toh H, Nagata S.** Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc Natl Acad Sci USA* **1998**; 95:9123-9128.
- 111. Ozawa H, Keane RW, Marcillo AE, Diaz PH, Dietrich WD.** Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, **2002**; 177: 306-313.
- 112. Reed JC.** Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The J Cell Biology*, **1994**; 124: 1-6.
- 113. Golstein P.** Controlling cell death. *Science*, **1997**; 275: 1081-1082.
- 114. Li H, Colbourne F, Sun P.** Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. *Stroke*, **2000**; 31: 176-182.
- 115. Wang KK.** Calpain and caspase: can you tell the difference. *Trends Neurosci*, **2000**; 23(2):59.
- 116. Rudel T.** Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. *Herz*, **1999**; 24:236-241.
- 117. Chou KC, Tomasselli AG, Henrikson RL.** Prediction of the tertiary structure of a caspase-9/inhibitor complex. *FEBS Lett*, **2000**; 470:249-256.
- 118. Nuttall ME, Nadeau DP, Fisher PW et al.** Inhibition of caspase-3 like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in-vitro. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, **2000**; 18: 356-363.
- 119. Springer JE, Azbill RD, Knapp PE.** Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med*, **1999**; 5:943-946.
- 120. Kuida K, Zheng TS, Na SQ, Kuan CY.** Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in cyp32 deficient mice. *Nature*, **1996**; 384: 368-372.
- 121. Hu YM, Benedict MA, Ding LY.** Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo J*. **1999**; 18:3586- 3595.
- 122. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux Q L, Salvesen G S, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC.** Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci, USA* **1999**; 96:5752-5757.
- 123. Kromer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B.** The biochemistry of programmed cell death. *Fedn Am. Soc. exp. Biol. J.* **1995**; 9:1277-1287.
- 124. Takahashi K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA.** DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adult rats. *J Comp Neurol*, **1999**; 404:159-171.

125. Bao F, Liu D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. *Neuroscience*, **2003**;116: 59-70.
126. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*. **2003**; 15:725-31.
127. Li M, Ona VO, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X, Stieg PE, Lipton SA, Friedlander RM. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, **2000**; 99:333-342.
128. Vineis S. Relationship between polymorphism of xenobiotic metabolizing enzymes and susceptibility to cancer, *Toxicology*, **2007**; 24:457-462.
129. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008. *Int. J. Cancer*, **2010**; 127:2893–2917.
130. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer Statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, **2014**; 64:9–29
131. Cingeetham A, Vuree S, Dunna NR, Gorre M, Nanchari SR, Edathara PM, Mekkaw P, Annamaneni S, Digumarthi RR, Sinha S, Satti V. Association of caspase 9 promoter polymorphisms with the susceptibility of AML in South Indian subjects. *Tumor Biol*, **2014**; 35: 8813-8822.
132. Abediankenari S, Shokrzadeh M, Aminjan HH, Nasri N, Alizadeh A. Evaluation of caspase3 and 9 gene polymorphisms in gastric cancer patients in Mazandaran province: a brief report. *Tehran Univ Med J*, **2013**; 71(8): 536-540
133. Chen K, Zhao H, Hu Z, Wang LE, Zhang W, Sturgis EM, Wei Q. Casp3 polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*, **2008**; 14(19).
134. Xu W, Jiang S, Xu Y, Chen B, Li Y, Zong F, Zhao W, Wu J. A meta-analysis of caspase 9 polymorphisms in promoter and exon sequence on cancer susceptibility. *Plos one*, **2012**; 7:5.
135. Zhang ZY, Xuan Y, Jin XY, Tian X, Wu R. CASP-9 gene functional polymorphisms and cancer risk: a large-scale association study plus meta-analysis. *Genetics and Molecular Research*, **2013**; 12 (3): 3070-3078.
136. Park JY, Park JM, Jang JS, Choi JE, Kim KM, Cha SI, Kim CH, Kang YM, Lee WK, Kam S, Park RW, Kim IS, Lee JT, Jung TH. Caspase 9 promoter polymorphisms and risk of primary lung cancer. *Human Molecular Genetics*, **2006**; 15(12): 1963–1971.
137. Yoo SS, Choi JE, Lee WK, Choi YY, Kam S, Kim MJ, Jeon HS, Lee EB, Kim DS, Lee MH, Kim IS, Jheon S, Park JY. Polymorphisms in the *CASPASE* Genes and Survival in Patients With Early-Stage Non–Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol*, **2009**; 27:5823-5829.

- 138. Theodoropoulos GE, Michalopoulos NV, Pantou MP, Kontogianni P, Gazouli M, Karantanos T, Lymperi M, Zografos GC.** Caspase 9 promoter polymorphisms confer increased susceptibility to breast cancer. *Cancer Genet*, **2012**; 205(10):508-512.
- 139. Choi JY, Kim JG, Lee YJ, Chae YS, Sohn SK, Moon JH, Kang BW, Jung MK, Jeon SW, Park JS, Choi GS.** Prognostic impact of polymorphisms in the *caspase* genes on survival of patients with colorectal cancer. *Cancer Res Treat*, **2012**; 44(1):32-36.
- 140. Bouscary D, Chen YL, Guesnu M, Picard F, Viguier F, Lacombe C, Dreyfus F, Roupie MF.** Activity of the caspase-3/ CPP32 enzyme is increased in “early stage” myelodysplastic syndromes with excessive apoptosis, but caspase inhibition does not enhance colony formation in vitro. **2000**; 28(7): 784-791.
- 141. Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA.** Activation and Cleavage of Caspase-3 in Apoptosis Induced by Experimental Cerebral Ischemia. *The Journal of Neuroscience*, **1998**; 18(10):3659–3668
- 142. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI.** Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci*, **1997**; 17:7415–7424.
- 143. Bredesen DE.** Neural apoptosis. *Ann Neurol*, **1995**; 38:839–851.
- 144. Koistinaho J, Hokfelt T.** Altered gene expression in brain ischemia. *NeuroReport*, **1997**; 8:1-8.
- 145. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata JM, Shabaik A, Gascoyne R, Reed JC.** Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*, **1997**; 57:1605–1613.
- 146. Springer JE, Azbill RD, Nottingham SA, Kennedy SE.** Calcineurin-mediated BAD dephosphorylation activates the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience*, **2000**; 20(19):7246–7251.
- 147. Cai L, Kang YJ.** Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol*, **2001**; 1:181–193.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Hatay'da doğdu. İlkokulu Akdeniz İlkokulu'nda, ortaokulu Samandağ Ortaokulu'nda ve lise eğitimini Yüksel Acun Anadolu Lisesi'nde tamamladı.

2010 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2010 yılının eylül ayında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.