

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bufo viridis*'in BAŞKALAŞIMINDA KUYRUKTAKİ APOPTOZİSİN
VE GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN (GAG) BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Mesut ŞAHİN

Anabilim Dalı : Biyoloji

Programı : Zooloji

MANİSA – 2005

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ * FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Bufo viridis*'in BAŞKALAŞIMINDA KUYRUKTAKİ APOPTOZİSİN
VE GLİKOZAMİNOGLİKANLARIN (GAG) BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Mesut ŞAHİN

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 7 Temmuz 2005

Tezin Savunulduğu Tarih : 26 Temmuz 2005

Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr. Erdal BALCAN

Diğer Jüri Üyeleri : Doç.Dr. Önder DEVECİ (EÜ)

Yrd.Doç.Dr. Kamil KOÇ

MANİSA – 2005

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	III
ÇİZELGE LİSTESİ.....	IV
KISALTMALAR LİSTESİ	V
TEŞEKKÜR	VI
ÖZET	VII
ABSTRACT	VIII
1.GİRİŞ.....	1
1.1. PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ TİPLERİ.....	1
1.2 APOPTOTİK MORFOLOJİ VE NEKROZLA FARKLARI	4
1.3. TİROİT HORMONUNUN ETKİ MEKANİZMASI	7
1.4. APOPTOZİSİ BAŞLATAN UYARILAR	10
1.4.1. Bcl-2 Ailesi	12
1.5. APOPTOTİK HÜCRE KALINTILARININ TANINMASI VE ORTADAN KALDIRILMASI.....	13
1.6. <i>Bufo viridis</i> 'in SİSTEMATİĞİ VE BİYOLOJİK-EKOLOJİK ÖZELLİKLERİ.....	14
1.7. GLİKOZAMİNOGLİKANLAR VE APOPTOZİS	17

İÇİNDEKİLER (DEVAM EDİYOR)	Sayfa No
2. MATERYAL VE METOT	18
2.1. HAYVANLARIN TOPLANMASI VE YETİŞTİRİLMESİ	18
2.2. KUYRUKLARIN ELDESİ, FİKSASYON, KESİT ALMA ve BOYAMA	18
2.3. MİKROFOTOGRAFİ	20
3. BULGULAR	21
3.1. <i>Bufo viridis</i> 'in GELİŞİMİ VE BAŞKALAŞIMI	21
3.2. KUYRUK HİSTOLOJİSİ	22
3.3. APOPTOZİS	24
3.4. ALCIAN BLUE BOYAMALARI	29
3.4.1. Epitel ve Bağ Dokusunda Alcian Blue Boyamaları	29
3.4.2. Kas Dokusunda Alcian Blue Boyamaları	29
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	36
5. KAYNAKLAR	39
ÖZGEÇMİŞ	44

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Apoptotik, otofajik ve nekrotik hücrenin morfolojik özellikleri	3
Şekil 1.2. Apoptozis ve nekroz arasındaki morfolojik farklar	4
Şekil 1.3. Kaspazların apoptozis dışındaki rollerinin şematik gösterimi.....	6
Şekil 1.4. Tiroit hormonunun çekirdekteki etki mekanizması	7
Şekil 1.5. İribaş büyüme ve gelişmesini kontrol eden hormon trafiği	8
Şekil 1.6. Kaspaz aktivasyonunun genel prensipleri.....	10
Şekil 1.7. Apoptozisin harici yolla aktivasyonu.	11
Şekil 1.8. Dahili yolda mitokondrinin rolü	12
Şekil 1.9. Apoptotik hücre ile yaşayan hücre arasındaki bazı farklı karakterler.....	13
Şekil 1.10. <i>Bufo viridis</i> 'in genel görünüşü	15
Şekil 1.11. <i>Bufo viridis</i> larvasının genel şekli, ağız yapısı ve <i>Bufo viridis</i> 'e özgü yumurta kordonu	16
Şekil 1.12. <i>Bufo viridis</i> 'in değişik larval aşamaları	16
Şekil 3.1. Kuyruğu kısalan <i>Bufo viridis</i>	21
Şekil 3.2. Kuyruğun sagittal kesiti (H-E).....	22
Şekil 3.3. Kuyruğun transvers kesiti (H-E)	23
Şekil 3.4. 10 mm kuyrukta epitel tabakada apoptotik hücreler (H-E).....	24
Şekil 3.5. 40 X objektifle 5 mm kuyrukta epitel tabakada apoptotik hücreler (TUNEL)	25
Şekil 3.6. 100 X objektifle 5 mm kuyrukta epitel tabakada apoptotik hücreler (TUNEL)	25
Şekil 3.7. 10 mm kuyrukta kas dokusunda apoptozis (H-E)	26
Şekil 3.8. 5 mm kuyrukta kas dokusunda apoptozis (TUNEL).....	26
Şekil 3.9. 5 mm kuyrukta kalınlaşan fibroblast tabakası ve notokorda (H-E).....	27
Şekil 3.10. 5 mm kuyrukta kalınlaşan fibroblast tabakası ve notokorda (TUNEL).....	28
Şekil 3.11. 5 mm kuyrukta notokordadaki TUNEL pozitif hücreler.....	28
Şekil 3.12. Farklı kuyruk boylarında epitel dokudaki AB boyamaların karşılaştırması	31
Şekil 3.13. Farklı kuyruk boylarında kas dokusundaki Alcian Blue boyamalarının karşılaştırması.	32
Şekil 3.14. 15 mm kuyruk boyunda boyama sonuçlarının genel görüntüleri	33
Şekil 3.15. 10 mm kuyruk boyunda boyama sonuçlarının genel görüntüleri	34
Şekil 3.16. 5 mm kuyruk boyunda boyama sonuçlarının genel görüntüleri	35

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1. Amfibi başkalaşımı sırasında tiroit hormonuna morfolojik ve biyokimyasal yanıt çeşitleri	9
Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan histokimyasal yöntemler ve kullanım amaçları	19
Çizelge 2.2. Alcian blue'nun değişik pH ve MgCl ₂ konsantrasyonlarında boyama özellikleri	20
Çizelge 3.1. Epitel, bağ ve kas dokusundaki AB boyamalarının kuyruk boyuna göre karşılaştırılması	30

KISALTMALAR LİSTESİ

- AB** : Alcian Blue
- ACTH** : Adenokortikotropik Hormon ya da Kortikotropin
- AIDS** : Acquired Immunodeficiency Syndrome
- AIF** : Apoptozis Tetikleyici Faktör
- Apaf-1** : Apoptozis Aktifleştirici faktör
- Bax** : Bcl-2 ile associated X Proteini
- Bcl-2** : B Hücreli Lenfoma Ailesi 2
- BH** : Bcl-2 Homolog
- CED-3** : *Caenorhabditis elegans* Death 3
- CORT** : Kortikosteron
- CRH** : Kortikotropin Salgılatıcı Hormon
- dATP** : Deoksiniukleozit Trifosfat Çeşitlerinden Biri
- GAG** : Glikozaminoglikan
- GH** : Büyüme Hormonu
- H-E** : Hematoksilin-Eozin Boyama
- ICE** : Interleukin 1 β -converting enzyme
- HIV** : Human Immunodeficiency Virus
- ICAM** : Intracellular Adhesion Molecule
- Kaspaz:** Sistein İçeren Aspartata Spesifik Proteazlar
- LPC** : Lizofosfatidilkolin
- PAB** : Alcian Blue pH 2.5–PAS boyamasının rutin adı
- PAS** : Periyodik asit-Schiff
- PCD** : Programmed cell death
- PHÖ** : Programlı hücre ölümü
- PRL** : Prolaktin
- PBS** : Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
- PTP** : Mitokondri Geçirgen Poru
- SMAC** : Kaspazların İkincil Mitokondriyel Aktivatoru
- T₃** : Triiodotironin
- T₄** : Tiroksin ya da Tetraiodotironin
- TSH** : Tiroit Uyarıcı Hormon
- TUNEL** : Terminal deoxynukleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bilgisi, becerisi ve açık gürüőlölüğüyle her aşamada desteğini gürdüğüm, bana bir öğreticiden çok bir ağabey samimiyetiyle yaklaőan değerli danıőmanım Yrd. Doç Dr. Erdal BALCAN'a teőekkürlerimi sunarım. Özellikle arazi çalıőmalarımda ve türün teőhisi konusunda yardımlarını gürdüğüm Araç. Gör. Murat AFSAR'a, histoloji bilgilerinden faydalandığım Öęr. Gör. Dr. Beyhan GÜRÜÜ'ye, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakóltesinin Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalında görev yapan Yrd. Doç Dr. M. İbrahim TUęLU'ya, Araç. Gör. Dr. Can KÖSE'ye, Araç. Gör. Serap CİLAKER'e teşekkür ederim. Yüksek lisans öğrenciliğim süresince laboratuvarları ve laboratuvar araç-gereçlerini gerektiğince kullanmama izin veren tüm Biyoloji bölümü çalıőanlarına minnetlerimi sunarım. Çalıőmalarım esnasında laboratuvar bilgileri ve becerilerinin yanı sıra tavsiyeleri ve hoősohbetleriyle yolumu aydınlatan dostlarım, Yük. Su Ürü. Müh. Bahadır Önsoy'a, Araç. Gör. Mustafa Oskay'a ve Biyolog Serkan Kükre'e teşekkür ederim. Bazı kaynakları hiçbir maddi ya da manevi çıkar beklemeden bana ulaőtıran usta bilim insanı Dr. Sigurd von Boletzky'ye teőekkürü bir borç bilirim. Çalıőmam süresince, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışmada kısalan *Bufo viridis* larvası kuyruğunun farklı boylarındaki programlı hücre ölümü iki farklı yöntemle araştırıldı. Öte yandan bu dönemlerde kuyruğun glikozaminoglikan içeriklerindeki değişiklikler histokimyasal olarak belirlenmeye çalışıldı.

İncelenen farklı boydaki kuyruklarda, epitel, kas dokusu ve notokordada apoptotik hücelere rastlanmıştır. Epitel dokusundaki apoptotik hücrelerin, kondense kromatinleri ve sitoplazmik görünüşleriyle tipik apoptotik morfoloji gösterdikleri gözlenirken, apoptozise giden çizgili kas dokusunda amorf yapılar ve düzensizlikler gözlenmiştir. Notokordada ise apoptotik kalıntılara rastlanmıştır. İncelenen farklı kuyruk boylarında GAG dağılımlarını belirlemek için yapılan Alcian blue boyamalarında birbirine benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, epitel, bağ ve kas dokusunda karboksillenmiş glikozaminoglikanların yoğun olarak bulunduğu belirlenmiştir. İncelenen çeşitli boylardaki kuyruklarda GAG boyanması açısından genel anlamda bir farklılık bulunmaması, *Bufo viridis* larvasının kuyruğunun kısalması sırasında kuyruğun GAG içeriğinde bir değişiklik olmadığını düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Başkalaşım, *Bufo viridis*, Glikozaminoglikanlar, TUNEL.

ABSTRACT

In this study, programmed cell death in different sizes of shortened *Bufo viridis* tadpole tail was investigated by using two different methods. On the other hand, changes of glycosaminoglycan structures in the tail were tried to identify by histochemically.

In the different length of tails, apoptotic cells were observed in epithelium, skeletal muscle tissues and in notochord. While the apoptotic cells of epithelial tissue show typical apoptotic morphology with condensed chromatins and cytoplasmic appearances, in the skeletal muscle tissue going to apoptosis, amorphous structures and disorganizations were observed. However, in the notochord, apoptotic residues are seen. By the Alcian blue stainings for the investigation of GAG distribution in the different tail lengths, same results were taken. As a result, carboxylated glycosaminoglycans were found intensely in epithelial, connective and skeletal muscle tissues. Generally, according to the GAG staining properties, there was not any difference among different tail lengths, therefore it is suggested that, there is not any differences in GAG content in the *Bufo viridis* tadpole tail during the tail resorption program.

Key words: Apoptosis, *Bufo viridis*, Glycosaminoglycans, Metamorphosis, TUNEL.

1. GİRİŞ

Hücre ölümü iki temel yolla gerçekleşir. Bunlardan biri programlı hücre ölümü, diğeri ise hasar sonucu meydana gelen nekrozdur. PHÖ, bir program tarafından başlatılması ya da yürütülmesiyle karakterizedir. Gelişimde; organ ve doku şekillenmesi, başkalaşımında; larval hayata özgü yapıların ortadan kaldırılması, doku dengesinin korunması, hasar görmüş ya da organizma için zararlı olabilecek, tümör hücreleri ve organizmanın kendi hücrelerine saldıran lenfositler gibi hücrelerin ortadan kaldırılması PHÖ ile gerçekleşir. PHÖ'nün başkalaşımında en iyi gözlenebileceği canlı gruplarından biri "Kuyruksuz Kurbağalar" (Amphibia, Anura) takımındır. Tiroit hormonları (özellikle T₃) etkisiyle kurbağaya dönüşen bir iribaşta meydana gelen kuyruk kısalması, barsak ve derinin yeniden yapılanması gibi değişiklikler çıplak gözle dahi izlenebilir (Nakajima et al, 2005).

Temin ve yetiştirilmelerinin kolay olması, yumurtalarının büyük olması ve suda döllmesi, gelişim sırasında anaya bağımlılığın olmaması gibi nedenlerden dolayı Anura mensupları, embriyoloji, hücre döngüsü ve gen ifadesi çalışmaları için de model organizma olarak kullanılmaktadır. Birçok Anur larvasında ergin hale gelmek ve karaya çıkmak için bir dizi morfolojik değişim gerçekleşir. Türkiye'de yayılış göstermeyen *Eleutherodactylus* cinsi üyeleri hariç bütün Anura'da suda geçen bir larva aşaması mevcuttur (Jennings ve Hanken, 1998). Başkalaşımında türlere göre değişiklik gösteren sürelerde, kuyruk ve solungaç gibi larvaya özgü bazı organların tamamıyla yok olması, bacaklar gibi bazı yeni organların gelişmesi ve deri, barsak gibi var olan organ sistemlerin değişikliğe uğraması gibi bazı değişiklikler meydana gelir (Berry et al, 1998). Bu çalışmanın materyalini oluşturan *Bufo viridis* için yaklaşık 3 gün süren kuyruk kısalması, epitel doku, bağ doku, kas doku, sinir doku gibi birçok doku tipinde, hücrelerin ölümünü ve hücreler arası matriksin yıkımını gerektirir.

Bunun yanında birçok hastalığın ortaya çıkmasında temel etken PHÖ mekanizmalarının bozulmasıdır. Örneğin kanserde, hücrelerin aşırı çoğalma eğiliminde olmalarının yanında ölümsüzlük kazanmaları da önemlidir (Evan ve Vousden, 2001). AIDS'te, HIV tarafından bağışıklık sistemi hücrelerinde programlı hücre ölümü tetiklenmektedir (Arnoult et al, 2004). Alzheimer ve Parkinson da programlı hücre ölümü mekanizmalarındaki bozulmaların neticesinde ortaya çıkar (Thompson, 1995).

1.1. PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ TİPLERİ

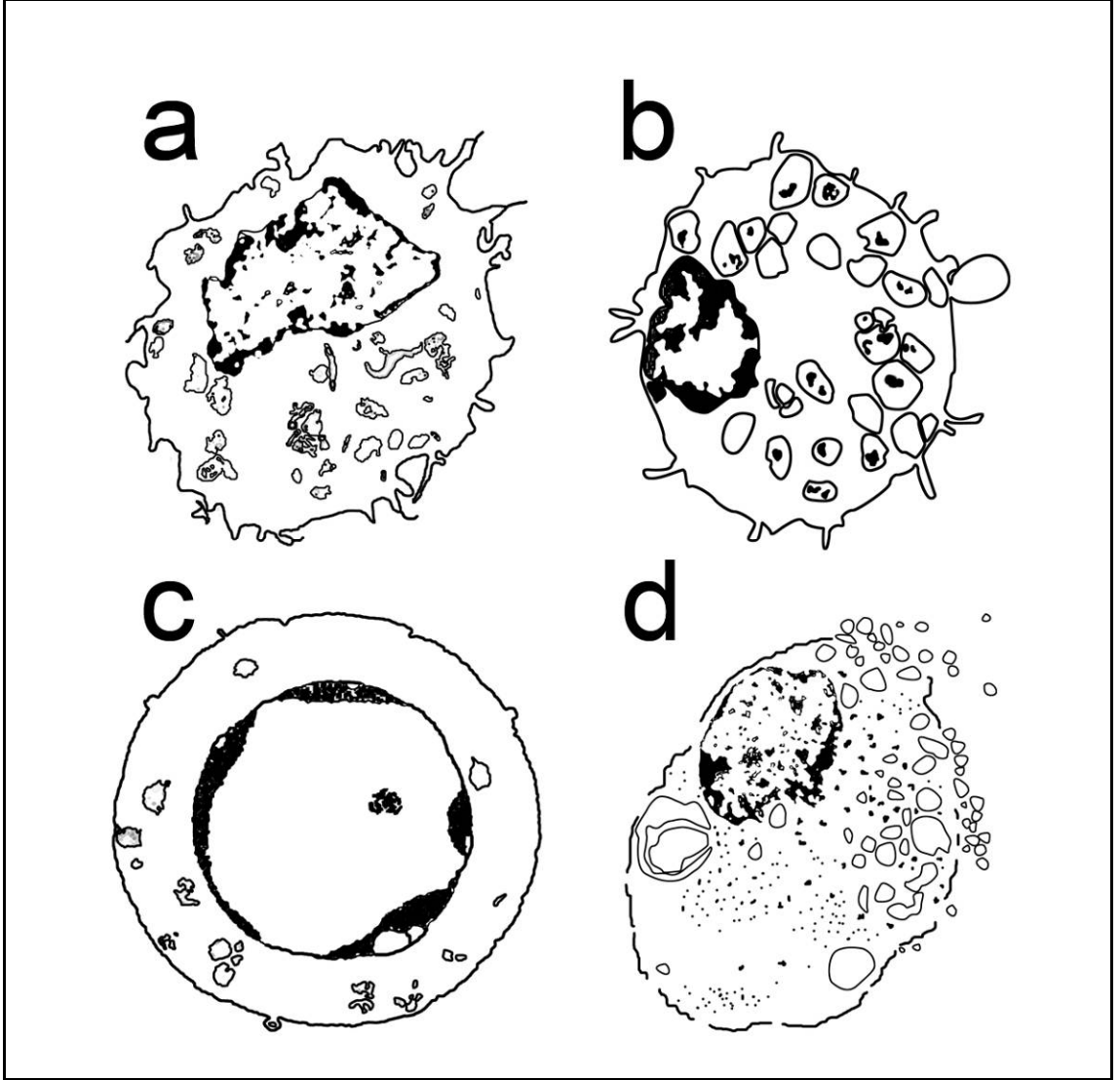
Kerr ve meslektaşları tarafından 1972 yılında bilimsel literatüre kazandırılan apoptozis terimi uzun yıllar PHÖ ile eşanlamlı olarak kullanılmış ve sadece Metazoa'ya özgü bir ölüm şekli olarak tanımlanmıştır. Yunanca iki kelimedden türetilen apoptozis (apo: ayrı, ptosis: düşmek) ifadesi mitolojide sonbahardaki yaprak dökümü için kullanılmıştır. Son yıllarda yapılan

çalışmalarda PHÖ'nün Metazoa'ya özgü olmadığı, aynı zamanda mayalarda, bitkilerde (Doorn ve Woltering, 2005) ve hatta bakterilerde de (Lewis, 2000) bulunduğu, bunun yanında PHÖ'nün apoptotik morfoloji göstermeyen biçimlerinin olduğu da gösterilmiştir. Böylece apoptozis, PHÖ'nün özel morfolojiye sahip bir formu olarak tanımlanmaktadır (Edinger ve Thompson, 2004). Apoptozis iç veya dış uyarılarla başlatılabilen, gen ürünleriyle kontrol edilen, sürdürülebilmesi için enerji gerektiren, kendine özgü bir morfoloji gösteren ve yangıya yol açmayan bir süreçtir. PHÖ günümüzde üç temel kategoriye ayrılmaktadır. Aralarında morfolojik ve biyokimyasal farklar olan bu yollar; apoptozis, otofaji ve lizozomal olmayan PHÖ'dür (Doorn ve Woltering, 2005) (Şekil 1.1).

Otofaji (kendini yeme) morfolojik olarak nekroza benzemesine rağmen, PHÖ'nün farklı bir şekli olarak tanımlanmıştır. Türler arasında korunmuş bu stratejide hücreler, kıtlık durumunda hücresel bileşenlerin enerji üretimi için yıkıldığı bir hayatta kalma mekanizması olan bu katabolik yola başvurur (Ogier-Denisy ve Codogno, 2003).

Hücre içi denge biyosentez ve katabolizma ile düzenlenir. Ökaryotik hücrelerde proteazomal ve lizozomal sistemler olmak üzere iki ana katabolik yol mevcuttur. Proteazomlar kısa ömürlü proteinlerin yıkımında rol alır, lizozomlar ise hücresel proteinlerin büyük bir bölümünü oluşturan uzun ömürlü proteinlerin yıkımından ve tümüne birden otofaji denen organel geri dönüşümünden sorumludur. Otofajide sitozolde çift zarlı, organel ve sitoplazmik hacim içeren bir vezikül oluşturulur. Daha sonra bu otofagozom içeriğın parçalanması ve geri dönüşümü için lizozomlarca parçalanır (Lockshin ve Zakeri, 2004). Bu yolun başlatılması hücrenin bir bölümünün sindirilerek geri dönüşümünü sağlayabildiği gibi, hücrenin sindirilmeye hazır hücre parçaları haline gelmesiyle de sonuçlanabilir (Edinger ve Thompson, 2004).

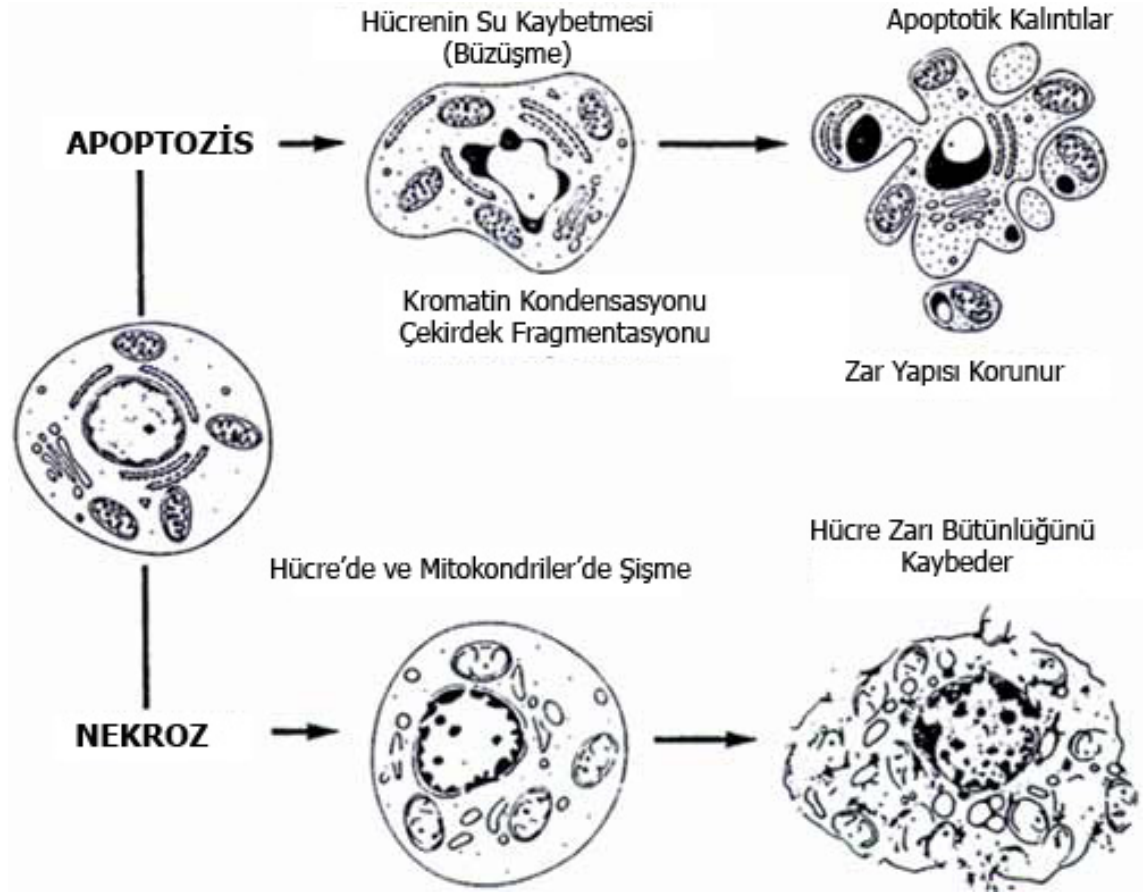
Lizozomal olmayan PHÖ ise; hakkında çok az şey bilinen, yeni tanımlanmış bir hücre ölüm tipidir. Bu ölüm tipi lizozomal sistemlerle ilişkisinin bulunmayışıyla diğer ölüm tiplerinden ayrılır. Nekrozda olduğu gibi organellerin şişmesiyle başlar. Hücre ölümü bazı hücresel yolların durdurulmasıyla sağlanır. Otofaji ve apoptozis özellikle Metazoa'da sık görülen hücre ölüm tipleri olmasına rağmen lizozomal olmayan PHÖ daha nadir görülmektedir (Doorn ve Woltering, 2005).



Şekil 1.1. Apoptotik, otofajik ve nekrotik hücrenin morfolojik özellikleri. a- normal b- otofajik c-apoptotik d- nekrotik. Apoptozisin morfolojik özellikleri iyi tanımlanmış olmasına rağmen nekrotik ve otofajik ölüm arasındaki fark daha az açıktır. Hüresel nekrozda doruğa ulaşan ve ayrıca otofajiyi de uyaran biyoenerjetik katastrofi yüzünden, otofaji ve programlı nekrozun aktifleştirildiği hücrede sitoplazmanın vakuolasyonu gözlenir. Buna karşın normal ve apoptotik hücrede ATP seviyesi sabit tutulur ve bu, sitoplazmalarındaki otofajik vakuollerin sınırlı sayıda olmasıyla tutarlıdır (Çizimin yapılmasında Abraham ve Shaham (2004)'den faydalanılmıştır).

1.2. APOPTOTİK MORFOLOJİ VE NEKROZLA FARKLARI

Kendine özgü morfolojiye sahip programlı hücre ölümü tipi olan apoptozis, ilk defa morfolojik kriterlere göre tanımlanmış ve nekrozdan ayrılmıştır (Kerr et al, 1972). Nekroz, ağır bir fiziksel veya kimyasal hasar sonucu meydana gelen hücre ölümü tipidir. Hücre içi enzimlerin faaliyeti sonucu hücredeki metabolik yollar bozulur ve düzensiz bir yıkım görülür. Hücre su alarak şişer, zar yapısı bozulur ve içerik hücreler arası alana dökülür ve genelde hücreler grup halinde ölürlür. Apoptotik hücrelerdeki morfolojik değişimler, elektron mikroskobu seviyesinde oldukça kesin kanıtlar sunar, ışık mikroskobu seviyesinde ise tecrübe kazanılarak belirlenebilir (Kerr et al, 1994). Bu morfolojik değişimler, hücre büzülmesi, membranla sarılmış hücre fragmentasyonu, DNA'nın nükleazlarca parçalara ayrılarak çekirdek periferinde yoğunlaşması ve ölen hücrenin komşu hücre ya da makrofajlar tarafından hızla sindirilmesi (Şekil.1.2) (Kerr et al, 1972).



Şekil 1.2. Apoptozis ve nekroz arasındaki morfolojik farklar (Cell Biology: A Laboratory Handbook'tan değiştirilerek).

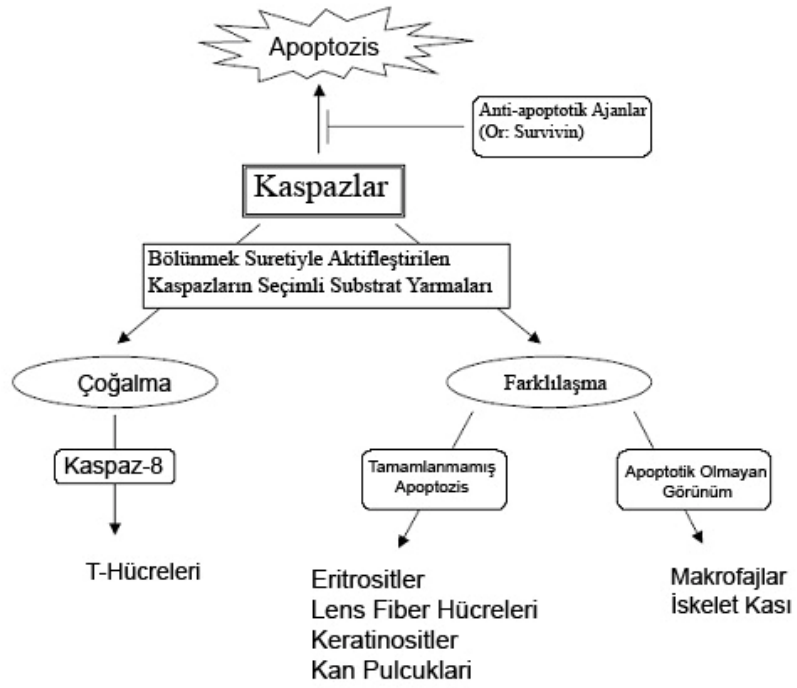
Apoptozise giden hücreler morfolojik olarak, hücre büzüşmesi, kromatin yoğunlaşması, sitoplazmik tomurcuklanma, apoptotik cisimcik oluşumu ve apoptotik hücre ya da cisimciklerin fagositozu ile karakterizedir (Granville et al, 1998; Konopleva et al, 1999; Nagata, 1997).

Apoptozis biyokimyasal ve morfolojik olarak üç evreye ayrılabilir; 1) başlatma evresi, 2) yürütme evresi, 3) dejenerasyon evresi (Sarastea ve Pulkki, 2000). Apoptozisin başlatılması harici ve dahili yollarla olabilir. Harici yolda hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörleri görev alırken, dahili yolda Bcl-2 protein ailesi ve mitokondri önemli role sahiptir (Alberts et al, 2002). Apoptotik morfolojinin ortaya çıkmasında anahtar rolü ise kaspazlar (sistein içeren aspartata spesifik proteazlar) olarak adlandırılan protein ailesi üstlenir. Kaspazlar hücre iskeletinin, birçok hücrel proteinin yıkılmasında ve apoptotik morfolojinin ortaya çıkmasında görevli diğer proteazların aktive edilmesinde rol alırlar. Aktif bölgelerinde sistein içerdikleri ve substratlarını aspartattan sonraki bölümlerinden parçaladıkları için bu isim verilmiştir. İlk kaspaz bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ta bulunmuş ve CED-3 olarak adlandırılmıştır. Kaspazlar *Hydra*'dan memelilere kadar evrimsel olarak iyi korunmuştur fakat programlı hücre ölümü görüldüğü halde mayalarda, *Dictyostellum*'da ya da bitkilerde bulunmaz. Mayalarda, (belki diğer organizmalarda da) kaspazlara benzeyen fakat fonksiyonları hakkında yeterli bilgi olmayan metakaspazlar vardır (Madeo et al, 2002). Bu organizmalardaki hücre ölümünün klasik apoptozise benzememesi de kaspazların apoptotik morfolojinin kaspaz şalesi neticesinde olduğu fikrini kuvvetlendirmektedir (Lockshin ve Zakeri, 2002).

Kaspaz üretmeyen nakavt (knock-out) canlılarla yapılan çalışmalarda ve kaspaz inhibitörlerinin bulunduğu durumlarda, apoptozisin indüklenmesi durumunda otofaji ya da programlı nekroz şeklinde farklı morfolojiye sahip bir ölüm tipi gözlenmektedir (Lockshin ve Zakeri, 2002). Bugüne kadar 14 tane kaspaz tanımlanmıştır. Bunlardan sekiz tanesi apoptozis sırasında önemli roller üstlenir. Tanımlanan ilk memeli kaspazı; kaspaz-1 ya da ICE'dir. Apoptozisle ilişkili kaspazlar iki temel bölümde incelenebilir: 1) Başlatıcı kaspazlar (kaspaz -2, -8, -9, -10) ve 2) Yürütücü (effector) kaspazlar (kaspaz -3, -6, -7) (Shi, 2002).

Kaspazların apoptotik rolleri önceden beri bilinmektedir, bunun yanında son yıllarda yapılan çalışmalar kaspazların aynı zamanda hücre döngüsünün düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında ve birçok hücrenin farklılaşmasında rol aldıklarını da göstermiştir (Şekil1.3.) (Schwerk ve Schulze-Osthoﬀ, 2003).

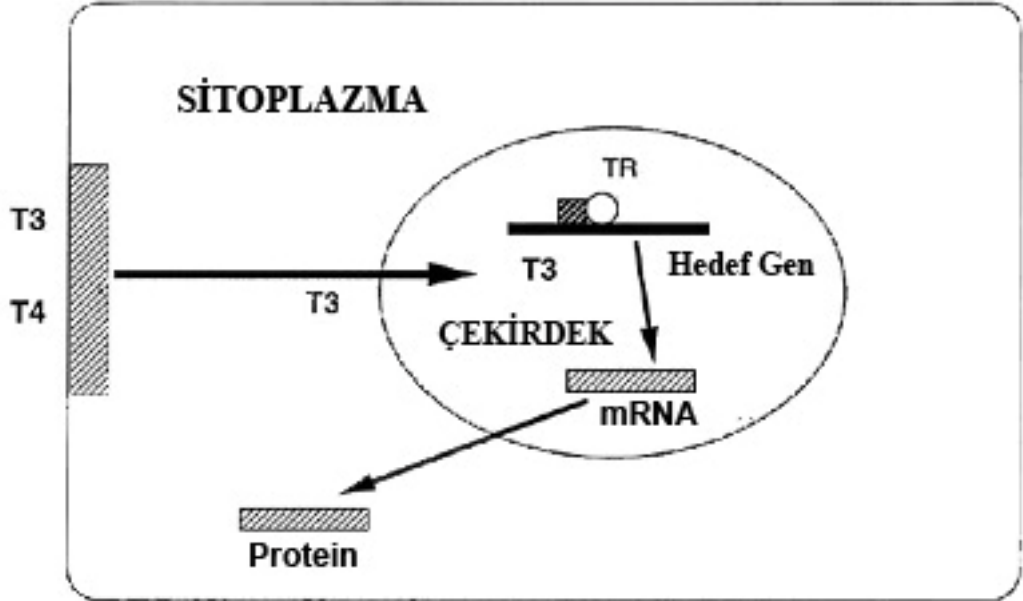
Apoptozisin son basamağı ise bozulan zar asimetrisi ve ortaya çıkan apoptotik sinyaller aracılığıyla tanınan hücrelerin, komşu hücreler veya makrofajlar tarafından sindirilerek ortadan kaldırılmasıdır (Grimsley ve Ravichandran, 2003). Sonuçta, apoptozis yangı yanıtının ortaya çıkmamasıyla, nekrozdaki kesin olarak ayrılır.



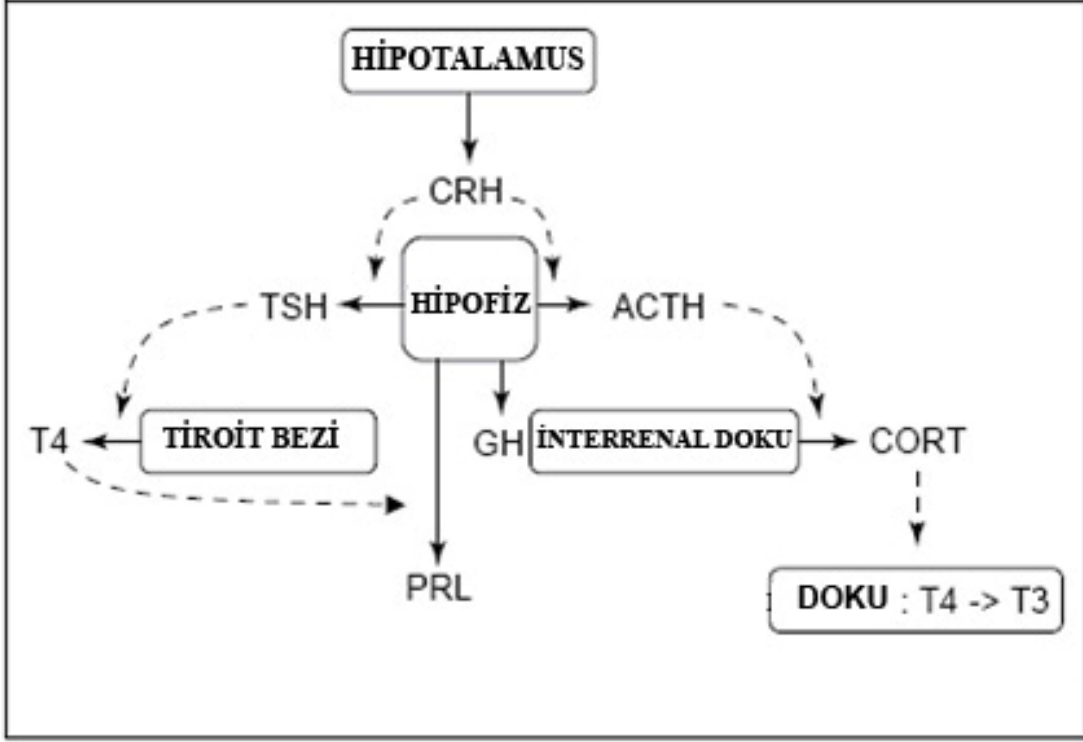
Şekil 1.3. Kaspazların apoptozis dışındaki rollerinin şematik gösterimi (Şemanın yapılmasında Schwerk ve Schulze-Osthoﬀ (2003)'den yararlanılmıştır.).

1.3. TİROİT HORMONUNUN ETKİ MEKANİZMASI

Lipofilik yapısından dolayı hücre ve çekirdek zarını kolaylıkla geçebilen tiroit hormonu, çekirdekte bulunan reseptörleri aracılığıyla işlev görür (Şekil 1.4) (Yen, 2001). Amfibi başkalaşımında bir çok adım tiroit hormonu etkisiyle gerçekleştirilir (Çizelge 1.1) (Tata, 1999). İribaş büyüme, gelişme ve başkalaşımı çeşitli hormonların etkileşimiyle gerçekleşir. T_4 olarak sentezlenen tiroit hormonu, hedef dokularda monoiodinaz enzimiyle daha aktif bir formu olan T_3 'e dönüştürülür (Şekil 1.5). Tiroit reseptörleri steroid reseptör süper ailesi üyesidirler ve ligand bağımlı transkripsiyon faktörleri olarak görev yaparlar. *Xenopus leavis*'te iki α ve iki β olmak üzere toplam 4 tane tiroit reseptörü bulunmaktadır (Denver et al, 1997). *Bufo viridis*'in tiroit reseptörlerinin yapısı ve sayısı hakkında bilgi bulunmamaktadır. Hormon bağlanan reseptörler, spesifik DNA dizilerine bağlanarak hedef çekirdek genlerinin sentezini aktive eder ya da baskırlarlar (Mihara et al, 1999). Tiroit hormonlarının apoptozisi başlatma mekanizması da gen ekspresyonunu etkilemesi aracılığıyla gerçekleşir (Zhou ve Brown, 1993; Brown et al, 1996).



Şekil 1.4. Tiroit hormonunun çekirdekteki etki mekanizması (Yen, 2001).



Şekil 1.5. İribaş büyüme ve gelişmesini kontrol eden hormon trafiği. Düz çizgiler hormon üretimi ve salgılanmasını, kesikli çizgiler ise başka bir hormonun üretimi ya da başka bir hormona dönüşümü üzerindeki uyarıcı etkisini gösterir. T₃: Temel olarak T₄'ün dokularda deiyodinizasyonu ile üretilir, genellikle tiroit hormonu olarak kastedilen hormon budur. T₄: Tiroit bezinde üretilir. Genel olarak T₃ öncülü olarak bahsedilir. PRL: Büyüme, çoğalma, osmoregülasyon ve deri gelişimini düzenleyen hipofiz hormonudur. GH: Büyümeyi düzenleyen hipofiz hormonudur. CORT: Kurbağalarda interrenal dokulardan salgılanan steroid yapıda bir hormondur. Stres yanıtı olarak metabolik cevapları düzenler. CRH: Omurgalılarda stres yanıtını ve bazı kurbağa larvalarında TSH üretimini uyarıcı hipotalamik bir nöropeptittir. ACTH: CORT üretimi ve salgılanmasını uyarıcı bir hipofiz hormonudur (Rose, 2005).

Çizelge 1.1. Amfibi başkalaşımı sırasında tiroit hormonuna morfolojik ve biyokimyasal yanıt çeşitleri (Tata, 1999)

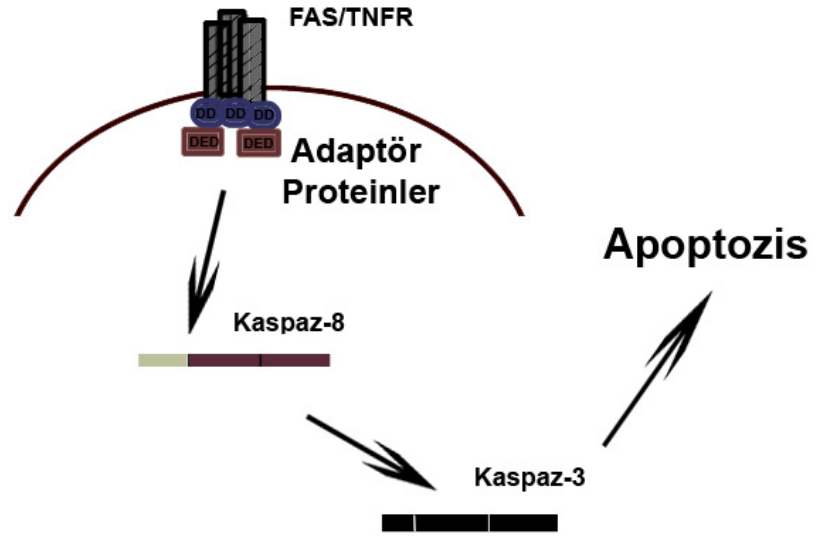
Doku	Morfolojik	Biyokimyasal
Beyin	Yeniden yapılanma; akson güdümü ve gelişmesi; hücre farklılaşması	Hücre bölünmesi; apoptozis; protein sentezi
Karaciğer	Yapısal farklılaşma; yeniden yapılanma	Albumin ve üre döngüsü enzimlerinin göreve başlaması; hemoglobin yapı değişimi
Göz	Yeniden yerleşim; yeni retina nöronları; lens farklılaşması	Görsel pigment gelişimi
Deri	Yeniden yapılanma; keratinizasyon; granüler bez oluşumu	Kollajen oluşumu; 63 kDa keratin
Bacak tomurcuğu, Akciğer	Yeni kemik, deri, kas, sinir vb. oluşumlar	Hücre çoğalması; gen ekspresyonu
Kuyruk, Solungaç	Toplu doku gerilemesi ve yok olması	Programlı hücre ölümü; litik enzimlerin faaliyeti
İnce bağırsak, Pankreas	Geniş ölçüde yeniden doku yapılanması	Yeni yapısal ve fonksiyonel öğeler
Bağışıklık Sistemi	Bağışıklık hücrelerinin yeniden yerleşimi	Yeni immunolojik yeteneklerin kazanılması
Kas	Büyüme; gelişme; apoptozis	Miyozin ağır zincir faaliyeti

1.4. APOPTOZİSİ BAŞLATAN UYARILAR

Apoptozis iki ana yolla başlatılır. Bunlar; hücre yüzeyi ölüm reseptörlerine bağlı harici yol (Şekil 1.7) ve Bcl-2/Bax (Şekil 1.8) oranına bağlı olarak mitokondriden ölüm aktiveleştirici proteinlerin salındığı dahili yoldur (Alberts et al, 2004). Harici yolda reseptöre ligandın bağlanması, adaptör proteinlerin, reseptörlerin hücre içindeki bölgelerine bağlanmalarına neden olur. Adaptör proteinlerin ölüm etkili alanları inaktif kaspaz-8 ile etkileşime girerek onu aktiveleştirir (Şekil 1.6). Kaspazlar, substratlarını özel aspartat bölgelerinden sonra yaran sistein proteazlardır. Hedef bölge spesifitesi, 4 aminoasit tanıma bölgesine ve hedef proteinin üç boyutlu yapısına bağlıdır. Kaspazlar diğer kaspazlar tarafından dahili aspartat bölgelerinden yanılarak aktiveleştirilebilen enzim öncülleri olarak sentezlenirler. Bununla birlikte, işlenmemiş formları da zayıf katalitik etki gösterebilir. Aktif kaspazlar beraberce enzimin aktif bölgesini oluşturan bir küçük ve bir büyük alt ünite dimeri içerirler (Abraham ve Shaham, 2004). Aktifleşen kaspaz-8 diğer bir başlatıcı kaspaz olan kaspaz-3'ü aktiveleştirir. Böylece hücreyi programlanmış olarak ölüme götüren kaspaz şelalesi başlatılmış olur. Bunun yanında harici yolla aktiveleştirilen kaspaz-8 bir proapoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bid'in aktiveleşmesini sağlayarak dahili yolu da başlatır. Böylece harici ve dahili yol birlikte aktiveleştirilerek ölüm sinyali kuvvetlendirilmiş olur (Thorburn, 2004).



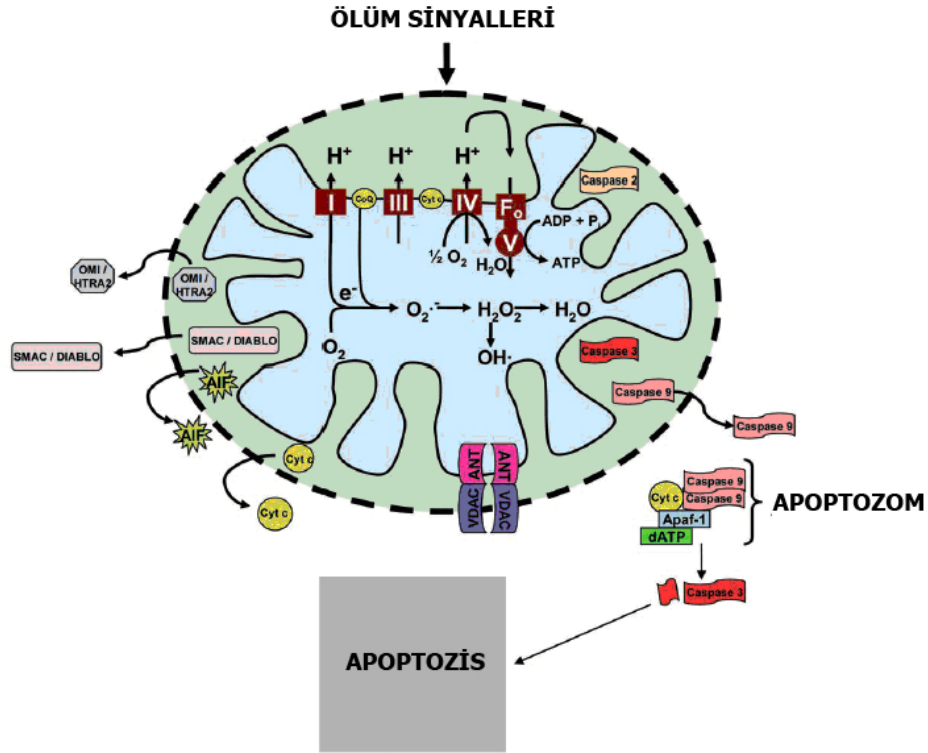
Şekil 1.6. Kaspaz aktivasyonunun genel prensipleri. İnaktif kaspazlar ön bölgelerinin kopartılması ile aktif hale geçerler (Abraham ve Shaham, 2004).



Şekil 1.7. Apoptozisin harici yolla aktivasyonu. FAS ve TNFR gibi ölüm reseptörlerine ligandın bağlanması, adaptör proteinlerin bağlanmasına ve kaspaz-8'in aktivasyonuna neden olur.

Dahili yolda, Bcl-2/Bax oranına bağlı olarak mitokondri zarında oluşan porlardan, oksidatif fosforilasyonda kompleks III ile kompleks IV arasında bir elektron taşıyıcı olan sitokrom c salınır. Sitokrom c, sitozolde Apaf-1, pro-kaspaz-9 ve dATP ya da ATP ile etkileşime girerek "apoptozom" adı verilen bir yapı oluşturur. Oluşan bu yapı pro-kaspaz-9'un dimerizasyonuna ve aktivasyonuna neden olur (Liu, et al, 1996).

Aktifleşen kaspaz-9 diğer başlatıcı kaspazları aktifleştirir ve kaspaz şelalesi başlatılır. Mitokondriden, apoptozomun bileşenlerinden biri olan sitokrom c'nin dışında, apoptozisi tetikleyen başka moleküller de salınır. Bunlardan bazıları; SMAC, AIF, endonukleaz G ve bir serin proteaz olan HtrA2'dir (Gurp et al, 2003).



Şekil 1.8. Dahili yolda mitokondrinin rolü (Regula et al, 2003).

1.4.1. Bcl-2 Ailesi

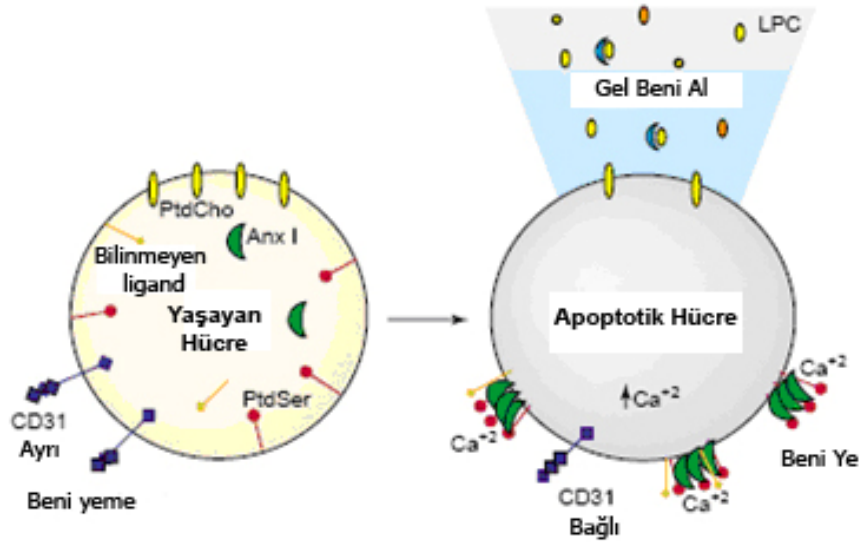
İsmi, ailenin prototipi sayılabilecek, bir protoonkogen olan Bcl-2'nin ilk defa gözlemlendiği lenfomalı B hücrelerinden almıştır. Bcl-2 ailesi, apoptozisi hem tetikleyebilen hem de baskılayabilen üyelere sahip, oldukça geniş bir protein ailesidir (Regula et al, 2003).

Apoptozisi baskılayan Bcl-2 üyelerine örnek olarak Bcl-2, BclxL, Bcl-W, Bfl-1, Mcl-1 ve A1, tetikleyenlere örnek olarak da Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, Bik, Bok, BNIP3, Nix ve Hrk verilebilir. Bu iki farklı grubun üyelerinin oranı hücrenin yaşamasını ya da ölmesini belirler. Bcl-2 ailesi üyeleri mitokondrideki iyon kanallarını (PTP) etkileyerek apoptozisi tetikler. Bcl-2 ailesi üyeleri değişik hücre içi zarlardan (mitokondri, endoplazmik retikulum, çekirdek zarı) sentezlenirler (Wride Et al, 1999).

Bu ailenin üyeleri, homoloji gösteren ve homolojileri aktivitelerini belirleyen, BH adı verilen alt birimlere sahiptir (Gurp et al, 2003). İribaş metamorfozunda T₃'ün bir pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bax'ın ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir (Hanada et al, 2003).

1.5. APOPTOTİK HÜCRE KALINTILARININ TANINMASI VE ORTADAN KALDIRILMASI

Apoptozisle ölen hücrelerde ortaya çıkan “beni ye” sinyalleri fagositlere, ölen hücrenin tanınması ve sindirilmesi için etiketler sunar (Şekil 1.9). Bu sinyaller; hücre yüzeyinde yeni moleküllerin görünmesi (fosfatidilserin ve Annexin I gibi), yüzeyde zaten var olan moleküllerde değişiklikler (ICAM-3 ve CD31) ve hücre yüzeyinin elektriksel yükünün değişmesidir. Dolaylı “beni ye” sinyalleri apoptotik hücre yüzeyi ile serum proteinlerinin özel etkileşimi yoluyla görülebilir. Apoptotik hücrenin yüzeyini kaplayıp onları fagositlere bağlayabilen bu hücreler arası köprü molekülleri, fagosit reseptörlerinin çoğu için tanıma bölgeleri sunarak, apoptotik hücreleri fagositoya uygun hale getirir (Grimsley ve Ravichandran, 2003).



Şekil 1.9. Apoptotik hücre ile yaşayan hücre arasındaki bazı farklı karakterler. Yaşayan hücreler beni yeme sinyalleri gösterirler (fagositlerin bağlanmasını ve uyarılmasını engelleyen CD31 gibi). Apoptotik hücre yüzeyinde ise fosfatidilserin ve annexin I (muhtemelen henüz tanımlanmamış başka ligandlar da) dış zarın dış yüzeyine çıkarak fagositlerin ölen hücreyi tanınmasını ve uyarılmasını sağlar. Ek olarak apoptotik hücre yüzeyinde değişime uğrayan CD31, fagositlerin bağlanmasını ve uyarılmasını sağlarken çözünebilir “gel beni al” sinyalleri (LPC: sarı elipsler ve diğer moleküller: turuncu elipsler) de salgılanır. Bazı serum faktörleri (mavi hilaller) veya LPC metabolitleri “gel beni al” sinyali olarak fonksiyon gösterebilir (Grimsley ve Ravichandran, 2003).

1.6. *Bufo viridis* Laurenti 1768'in SİSTEMATİĞİ VE BİYOLOJİK-EKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Alem : Animalia

Bölüm : Chordata

Sınıf : Amphibia

Takım : Anura

Cins : *Bufo*

Tür : *Bufo viridis*

Amphibia, omurgalı hayvanların bir sınıfını teşkil eder ve embriyolojik gelişimde amnion zarının bulunmayışı balıklarla ortak bir özelliktir. Bu nedenle balıklar ve amfibiler omurgalıların Anamnia grubunu meydana getirirler. Diğer taraftan dört ayaklı omurgalıların birinci sınıfını oluştururlar. Amphibia terimi Yunancadan kökenlenen bir kelime olup çift yaşamlı anlamına gelmektedir (amphi: çift, iki taraflı, bios: yaşam). Bunun nedeni de Amphibia sınıfının birçok mensubunun kısmen karada kısmen suda yaşamasıdır. Genel olarak larvalar suda geliştiği gibi larva evresi de suda geçer; ergin evrede karaya çıkanların çoğu da üreme zamanında suya gider.

Amphibia sınıfının üç takım vardır, bunlar: Apoda, Urodela ve Anura'dır.

Anura (kuyruksuz kurbağalar) takımının ülkemizde yayılım gösteren beş familyası vardır. Bu çalışmada kullanılan *Bufo viridis* türü bunlardan Bufonidae familyasına dahildir. Anura takımının familyaları değişik gelişim aşamalarında, sadece morfolojik karakterlere bakılarak tayin edilebilir. Bufonidae familyasının ergin formlarının belirleyici özellikleri çene ve damakta diş bulunmaması, parotoidlerin çok belirgin olması, derinin pürüklü olması ve arka bacaklarının çok uzun olmamasıdır. *Bufo viridis*'in belirleyici özellikleri ise;

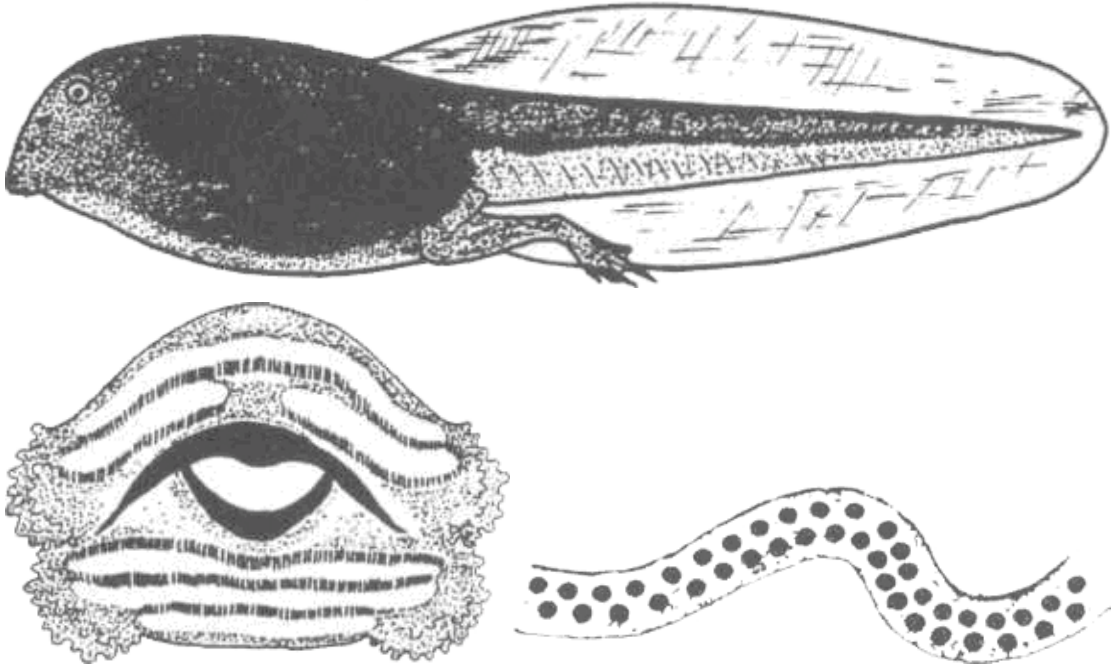
1. Parmaklarının altındaki tüberküllerin tek sıralı olması, arka ayaklardaki tarsus bölgesinin iç kısmında bir deri kıvrıntısının bulunması,
2. Genel olarak gri veya zeytin yeşili beyazımsı sırt rengi üzerinde daha koyu renkte yeşil lekelerin bulunması (bazı bireylerde, özellikle dişilerde, kırmızı lekeler de görülebilir) (Şekil 1.10),
3. Canlı örneklerde gözün iris tabakasının yeşil veya yeşilimsi sarı olması,
4. Kulak zarlarının nispeten belirgin olmasıdır.



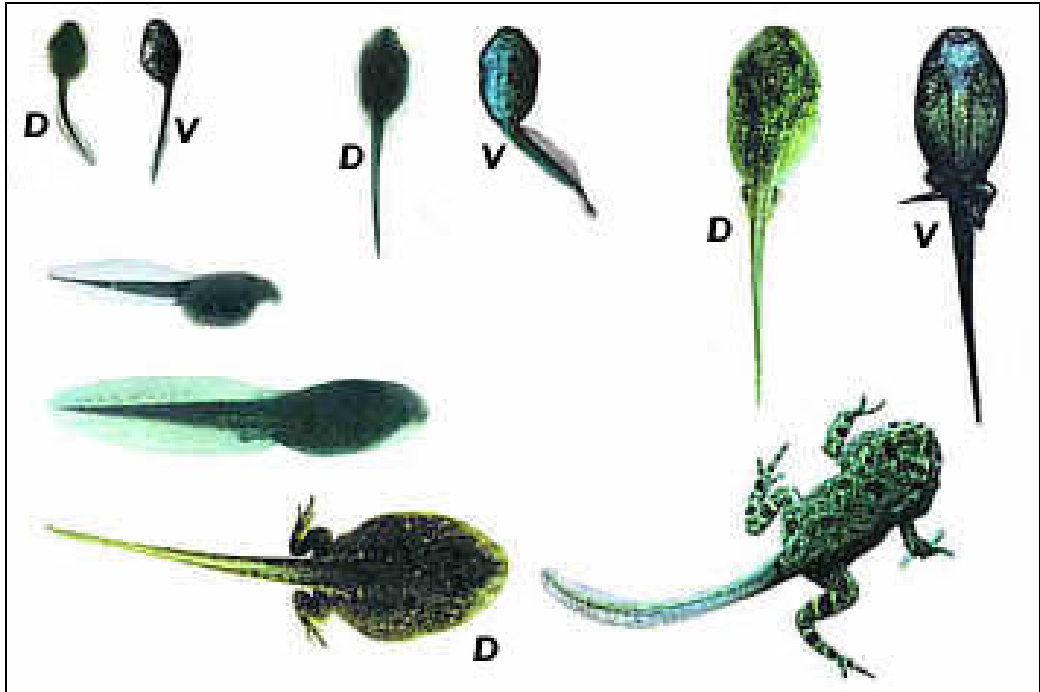
Şekil 1.10. *Bufo viridis*'in genel görünüşü (<http://www.whose-tadpole.net/key-to-adult-amphibia/B-viridis.htm>).

Familyalar yumurta bırakma şekillerine göre de tayin edilebilir: Bufonidae familyası üyeleri uzun ve iki sıralı kordon şeklinde yumurta bırakır. *Bufo viridis* yumurtalarının karakteristik özellikleri ise yaklaşık 3–4 m uzunluğunda, çift sıralı, 1–1,5 mm çapında 10–12 bin yumurtadan oluşan bir kordon şeklinde olmasıdır (Şekil 1.11).

Larval aşamada ise *Bufo* türleri, spirakulumun sol tarafta tam geriye dönük, anüsün medyan hat üzerinde ve kuyruğun arka tarafının yuvarlak olması ile belirlenebilir. *Bufo viridis* larvasının tipik özellikleri ise 40–45 mm boyunda olması (bunun yaklaşık 3/5'i kuyruktur), kuyruk ucunun oldukça yuvarlak olması ve kuyruk yüzgecinin az sayıda kahverengi leke içermesidir. Ayrıca larvaların ağız tipleri de türe özgüdür (Şekil 1.11, Şekil 1.12) (Özeti ve Yılmaz, 1994).



Şekil 1.11. *Bufo viridis* larvasının genel şekli, ağız yapısı ve *Bufo viridis*'e özgü yumurta kordonu (Özeti ve Yılmaz, 1994).



Şekil 1.12. *Bufo viridis*'in değişik larval aşamaları. V: ventral, D: dorsal (<http://www.whose-tadpole.net/key-to-tadpoles/B-viridis-LARVAE.htm>).

1.7. GLİKOZAMİNOGLİKANLAR VE APOPTOZİS

Hücre yüzeyi karbonhidrat bağlayan proteinlerinin (lektin) keşfi (Drickamer, 1988) ile hücre yüzey glikoprotein, glikolipid ve proteoglikanlarındaki karbonhidrat zincirlerinin, hücreler arası tanıma olaylarında ve bu olayların önemli olduğu fertilizasyon, gelişim, patojen-konak etkileşimleri gibi birçok sistemde tanıma molekülleri olarak rol aldığı ortaya konmuştur (Feizi, 1981; Tang et al, 1985; Sharon ve Lis, 1989; Brandley, 1991; Brandley et al, 1992; Varki, 1997). Apoptozis ile glikozilasyon arasındaki ilişki sialik asidin apoptozisin modülasyonunda rol alması ile ortaya konmuştur (Kim et al, 2004). Öte yandan Fas gibi özel hücre yüzey reseptörlerindeki sialik asidin azalmasının hücreleri apoptozise duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Suzuki et al, 2003; Keppler et al, 1999). Benzer şekilde apoptozis sırasında sialik asidin tüm hücresele düzeyleri azalmaktadır (Murrell et al, 2004). Bunun tersine, apoptozisin erken evresinde başka bir hücre yüzey glikoproteinindeki sialik asit düzeyinin arttığı gözlenmiştir (Eda et al, 2004). Bilinen tek bir sialik asit sentezi düzenleyicisi varken apoptotik hücre ölümünde, moleküllerdeki sialik asit düzeylerinin nasıl farklılık gösterdiği konusunda bilgi yoktur (Murrell et al, 2004).

Son yıllarda S-tip lektinlerden laminin (Zhou ve Cummings, 1990), fibronektin (Ozeki et al, 1995) ve lizozom ile ilişkili membran proteinleri (Do et al, 1990) gibi farklı glikoproteinlerdeki β -galaktoz yapılarına bağlanma yeteneği olan Galektin-1'in memelilerde T hücresi apoptozisinde düzenleyici bir rol üstlenmesi (Baum ve Pace, 1997; Perillo et al, 1997), TNF α 'nın glikozillenmiş ligandı (glikozilfosfatidil inozitol glikan) ile ilişkisinin kesilmesinin TNF α aracılığı ile apoptozisi ortadan kaldırdığının kanıtlanması (Yamashita ve Fukushima, 2004), hücreler arası matriksin ana glikozaminoglikanı olan hyaluronik asidin bir makrofaj hücre soyu olan U937 hücrelerinde (Kyle et al, 2004) ve dendritik hücrelerde (Yang et al, 2002) apoptozise neden olması, heparin-heparan sülfat ile etkileşen proteinin anti-apoptotik bir peptid olması ve anti-kanser ilaçları ile gerçekleşen apoptoziste düzenleyici bir rol içermesi (Liu et al, 2004), sentetik bazı glikozaminoglikanların kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edip apoptozislerini indüklemesi (Pumphrey et al, 2002) ve heparinin çeşitli hücre tiplerinde apoptozis inhibitörü olarak görev yapması (Ishikawa ve Kitamura, 1999) gibi bulgular da glukokonjugatların apoptoziste rol aldığını ortaya koymaktadır.

Bu yapılardan GAG'lar dallanma göstermeyen tekrarlayan disakkarit dizilerinden oluşan poliheterosakkaritlerdir. Hücre yüzeylerinde ve hücreler arası matrikste bulunan negatif yüklü bu yapılar çok sayıda proteinle etkileşerek matriks organizasyonunda, hücre göçünde, hücre adezyonunda, farklılaşmasında, gelişiminde ve apoptozisinde rol alırlar (Davies et al, 2001).

Bu çalışmada, girişte özetlenen bilgiler ışığında, kısalan *Bufo viridis* kuyruğunda apoptotik hücrelerin yerleşimleri, morfolojileri ve sağlam hücrelere oranı, ayrıca kuyruğun GAG içeriğindeki değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. HAYVANLARIN TOPLANMASI VE YETİŞTİRİLMESİ

Örnekler, Celal Bayar Üniversitesi Muradiye Kampusu civarındaki su birikintilerinden Mart 2003 ve Mart 2004 aylarında yumurta halinde toplanmıştır. Yaklaşık uzunluğu 3 m. olan yumurta kordonunun yaklaşık 1 m.si alınarak dip kısmına 5 cm yüksekliğinde yıkanmış dere kumu ve 10 cm yüksekliğinde birikinti suyu konulmuş plastik kaplara, sarsılmalarına özen gösterilerek yerleştirilmiş ve kaplar, güneş ışığı alması sağlanacak şekilde konumlandırılmıştır.

Yumurtaların müsilaj kılıfı yok oluncaya kadar suyun çalkalanmamasına özen gösterilmiştir. Larvaların boyutları arttıkça oksijen ve besin ihtiyacı da arttığı için, larva sayısının litre başına iki taneyi geçmemesi sağlanmıştır. Larvaların protein ihtiyaçlarını karşılamak için haşlanmış yumurta sarısının kurutulmuş un halinde su üzerine serpilmesi yeterli sonucu vermiştir. Larvaların oksijen ihtiyaçlarını karşılamak için kutu içindeki suyun yaklaşık 1/3'ü ortalama üç günde bir değiştirilmiştir. Şeffaf bir kaba alınmış havuz suyunun güneş alan bir yerde bekletilmesiyle alg kültürü hazırlanmış ve larvaların suları değiştirileceği zaman bu kültürden iki kısım alınıp, üzerine bir kısım havalandırılmış ve bir gün bekletilmiş çeşme suyu eklenerek kullanılmış veya yumurtaların alındığı su birikintisinden alınan su doğrudan kullanılmıştır. Alg kültürünün yanında kaynar suda birkaç dakika tutularak haşlanmış ıspanak, marul veya semizotu ufak parçalar halinde ezilerek larvalara verilmiştir. Larvaların hem oksijen ve besin gereksinimlerini karşılamaya yardımcı olması hem de tutunacak substrat oluşturması için kutu içindeki kuma su bitkileri ekilmiştir.

2.2. KUYRUKLARIN ELDESİ, FİKSASYON, KESİT ALMA ve BOYAMA

Örnekler, yetiştirilen larvaların kuyruk boyunun 15 mm, 10 mm ve 5 mm'ye kısılması beklenerek 3 grup şeklinde alınmıştır. Çalışılan türün soğukkanlı olması nedeniyle herhangi bir anestezi uygulanmamış, +4 °C'de birkaç dakika tutularak uyutulmuş ve kuyrukları jilette kesilerek fiske edilmiştir.

Fiksatif olarak fosfat tamponlu %10 formalin, Bouin's ve Saint Marie fiksatifleri kullanılmıştır. Tüm fiksatifler için, 1 gün fiksasyon yapılmış daha sonra tamponlu formalin ve Bouin's için %70'den, Saint Marie fiksatif için %95'den başlayarak artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarılmış, ksilol ile şeffaflaştırılmış ve parafine gömülmüştür. Elde edilen parafin bloklardan Microm HM325 marka mikrotomla 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler yumurta akı ve gliserin ile hazırlanan adezifle kaplanmış lamlar üzerine distile su içinde açılarak yerleştirilmiş, 45 °C'ye ayarlanmış ısıtıcı tabla üzerinde kurutulmuştur. Ardışık kesitler 5 farklı lam üzerine gruplar halinde (1. kesit 1. lama, 2. kesit 2. lama,..., 6. kesit 1. lama, 7. kesit 2.

lama şeklinde) alınarak aynı bölgelerin farklı lamlar üzerinde yakalanması amaçlanmıştır. Üzerine kesitlerin yapıştırıldığı lamlar standart histolojik yöntemler uygulanarak deparafinize edilmiş, inen alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilmiştir. Genel histolojik yapıyı görmek ve apoptotik hücreleri belirlemek için kesitler hematoksilin-eozin ile boyanmıştır. Farklı kuyruk boylarında ve apoptotik hücrelerde glikozaminoglikan değişimlerini belirlemek için glikozaminoglikanlara özgü katyonik bir boya olan Alcian blue'nun farklı pH ve farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları ve periyodik asit Schiff kompleksi kullanılmıştır. Alcian blue'nun farklı pH ve $MgCl_2$ konsantrasyonlarındaki boyama özellikleri çizelge 2.1'de belirtilmiştir. Kesitler Alcian blue pH 5,7 'de 0,025 M ve 0,3 M $MgCl_2$ konsantrasyonlarında 18 saat, pH 2,5'de 30 dakika boyanmıştır. Karşıt boya olarak PAS (Periyodik Asit, Schiff) kullanılmıştır. Apoptotik hücrelerin özel olarak belirtilmesi için TUNEL yöntemi kullanılmıştır. TUNEL boyama DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega Cat# G7130) kullanılarak, kit ile beraber verilen yöntemle uygun şekilde yapılmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan histokimyasal yöntemler ve kullanım amaçları

YÖNTEM	AMAÇ
H+E	Genel histolojik yapının belirlenmesi Apoptotik hücrelerin belirlenmesi
TUNEL	Apoptotik hücrelerin DNA kırıklarına göre belirlenmesi
%0.1 Alcian blue pH 5.7 0.025 M $MgCl_2$	Farklı boylarda kuyruktaki glikozaminoglikan yapısının belirlenmesi Apoptotik hücrelerdeki glikozaminoglikan değişikliklerinin belirlenmesi (Quintarelli et al, 1964; Scott et al,1964; Scott ve Dorling, 1965)
%0.1 Alcian blue pH 5.7 0.3 M $MgCl_2$	Farklı boylarda kuyruktaki glikozaminoglikan yapısının belirlenmesi Apoptotik hücrelerdeki glikozaminoglikan değişikliklerinin belirlenmesi (Quintarelli et al, 1964; Scott et al,1964; Scott ve Dorling, 1965)
%1 Alcian blue pH 2.5	Farklı boylarda kuyruktaki glikozaminoglikan yapısının belirlenmesi Apoptotik hücrelerdeki glikozaminoglikan değişikliklerinin belirlenmesi (Spicer ve Meyer, 1960)

Çizelge 2.2 Alcian blue'nun değişik pH ve MgCl₂ konsantrasyonlarında boyama özellikleri

YÖNTEM	Mavi Boyanan Glukokonjugat
AB pH 5.7 0,025 M MgCl₂	Sülfatlanmış Glikoproteinler Karboksillenmiş GAG'lar Hyaluronik asit Sülfatlanmış GAG'lar Kondroitin sülfat Dermatan sülfat Heparan sülfat Heparin Keratan sülfat
AB pH 5.7 0,3 M MgCl₂	Sülfatlanmış GAG'lar Kondroitin sülfat Dermatan sülfat Heparan sülfat Heparin Keratan sülfat
AB pH 2.5	Asit müninler

2.3. MİKROFOTOGRAFI

Boyamalardan sonra kesitler Olympus CX21 mikroskopta incelenmiş ve fotoğrafları Nikon CoolPix 4500 dijital fotoğraf makinesi ile çekilmiştir. Fotoğraf çekimleri okülerden yapılmış, 4x optik büyütme ve sonsuz odak kullanılmış, fotoğraf boyutu olarak 4.0 Mpixel ve Fine Quality ayarları kullanılmıştır. Kullanılan her objektif için fotoğraf makinesi ayarları sabit tutularak mikrometrik lam çekilmiş, Photoshop 8.0 bilgisayar programında (Adobe Systems Inc.) bu fotoğraflardan yararlanılarak uzunluğu bilinen çizgiler oluşturulmuş ve fotoğraflara eklenmiştir. Genel görünüş veren fotoğraflar parçalar halinde çekildikten sonra Photoshop 8.0 bilgisayar programında (Adobe Systems Inc.) birleştirilmiş ve bar eklenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. *Bufo viridis*'in GELİŞİMİ VE BAŞKALAŞIMI

Bufo viridis'in C.B.Ü. Muradiye Kampusu civarındaki çiftleşme dönemi hava şartlarına da bağlı olarak Şubat ortasından Mart ortasına kadar devam eder. Havaların ısınmasıyla birlikte erkeklerin çıkardığı polis düdüğüne benzeyen çiftleşme çağrıları duyulmaya başlamıştır. Özellikle geceleri amplexus halinde çiftlere rastlanmıştır. Larvaların yumurtadan çıkarak serbest hale gelmelerinin yaklaşık bir hafta sürdüğü gözlenmiştir. Haziran ayı ortasına kadar, kurumamış su birikintilerinde, larvaların olduğu görülmüştür.

Bütün larvalar aynı ebeveynlere sahip olmalarına ve aynı koşullarda yetiştirilmelerine rağmen, ön bacağın tam teşekkülü ve kuyruğun kısalmasının bireyler arasında farklılık gösterdiği gözlenmiştir. Bir bireyin ön ayakların tam teşekkülünden sonra kuyruğunun geri emiliminin yaklaşık üç gün sürdüğü gözlenmiştir. Ön ayaklarının oluşumuyla larvaların, başlarını sudan çıkararak kara solunumu yapmaya başladıkları görülmüştür (Şekil 3.1). Ön ayağı tam olarak oluşmuş larvalar altmış gün sonunda görülmeye başlamasına rağmen, yetmiş ikinci günde kuyruk kalıntısına sahip juveniller de görülmüştür. 42 milimetre olarak kaydedilen en uzun larvada kuyruk boyu 27 milimetre olarak ölçülmüştür. Başkalaşımı tamamlamış juvenillerin boyları ise 15–16 milimetre olarak ölçülmüştür.



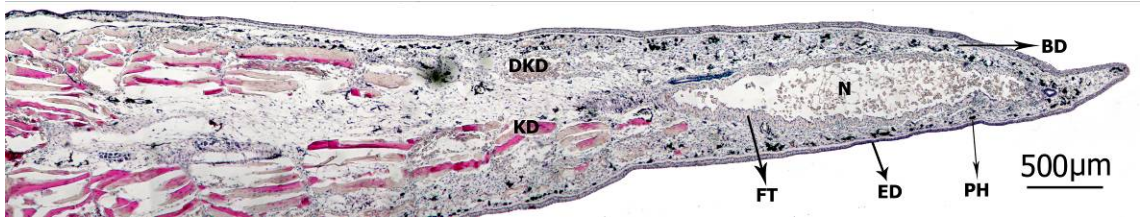
Şekil 3.1. Kuyruğu kısalan *Bufo viridis*. Izgaralar: 1 cm x 1 cm

Ön bacakların teşekkülünden hemen önce, derideki pigment değişimleri, gözlerin median hatta doğru kayması ve bağırsakların kısalması çıplak gözle izlenebilmektedir. 27 mm uzunluğa sahip kuyruğun tamamen geri emilmesine rağmen gövde boyutlarında dikkat çekici bir değişiklik görülmemiştir.

3.2. KUYRUK HİSTOLOJİSİ

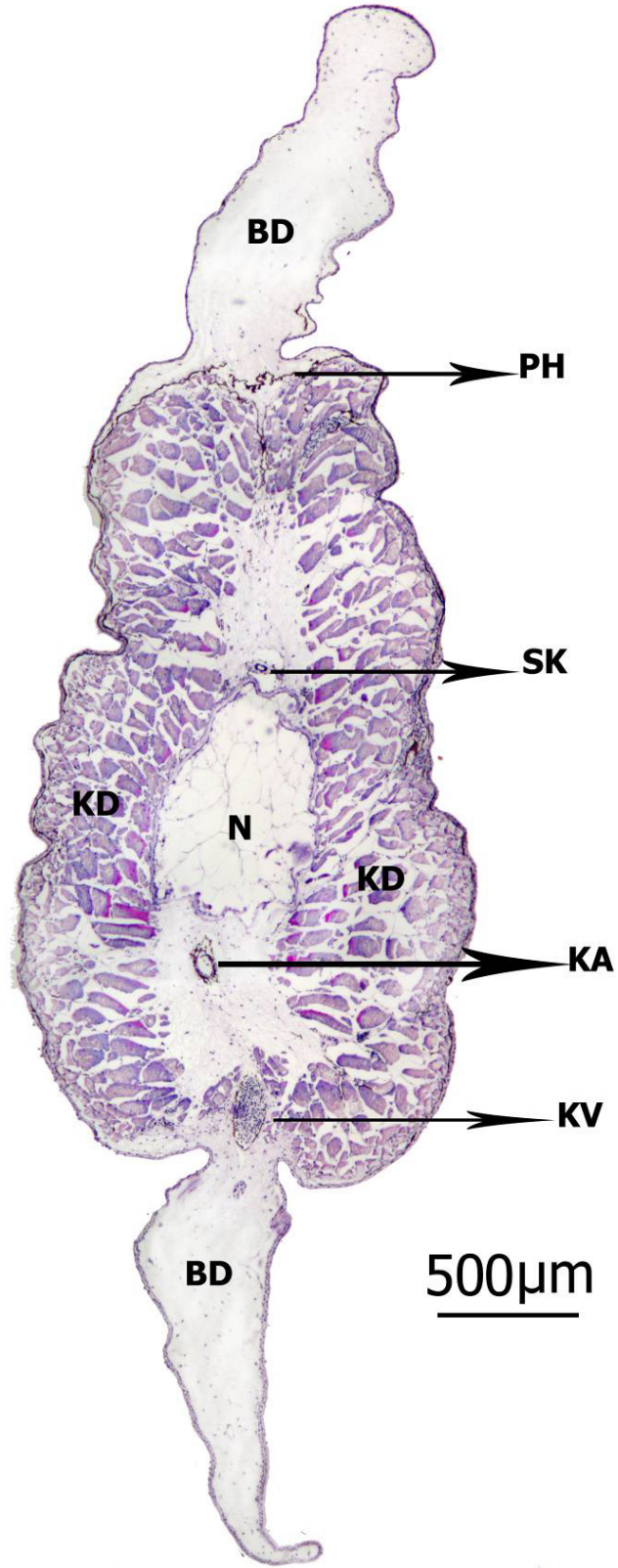
Kuyruğun frontal ve sagittal kesitlerinde en dışta tek sıralı bir epitel tabaka görülür. Bunun altında tek sıralı bir fibroblast tabakası yer alır. Bu tabakanın altında kuyruğun ortasına yakın geçen frontal kesitlerde doğrudan çizgili kas tabakasıyla karşılaşılır ve aynı kesitte hem notokordayı* hem de spinal kordayı görmek zordur. Notokordayı çevreleyen bir fibroblast tabakası vardır. Kuyruğun ortasına yakın geçen sagittal kesitlerde ise fibroblast tabakasının altında, oldukça geniş ve hücreler arası matris elemanlarınca zengin bir bağ dokusu yer alır (kuyruk yüzgeçleri). Çizgili kas tabakası segmentler halinde bu bağ dokusunun altında yer alır. Bunun altında ise ventralde notokorda, dorsalde de spinal korda yer alır. Hem epitel dokunun altında yer alan subepidermal fibroblast tabakasının, hem de notokordayı çevreleyen fibroblast tabakasının kuyruk kıaldıkça kalınlaştığı gözlenmiştir.

Kuyruğun transvers kesitlerinde ortaya yakın olarak notokorda ve bunun dorsalinde de spinal korda gözlenir. İki lateralde çizgili kas tabakası yerleşmiştir. Notokordanın ventralinde kuyruk atardamarı ve kuyruk atardamarının ventralinde de kuyruk toplardamarının bağ doku içine yerleşmiş olduğu görülür. En dışta tek sıralı bir epitel tabakası, bunun altında da tek sıralı bir fibroblast tabakası yer alır. Pigment hücreleri kan damarlarının ve kas dokusunun etrafında yoğunlaşmıştır. Pigment hücreleri bağ doku içinde, özellikle yüzgeçte, daha düzensiz ve seyrekler (Şekil 3.2, Şekil 3.3, Şekil 3.14a, Şekil 3.15a, Şekil 3.16a).



Şekil 3.2. Kuyruğun sagittal kesiti. N: Notokorda, BD: Bağ dokusu, FT: Fibroblast tabakası, ED: Epitel doku, PH: Pigment hücresi, DKD: Dejenere kas dokusu, KD: Kısmen sağlam kas dokusu (H-E)

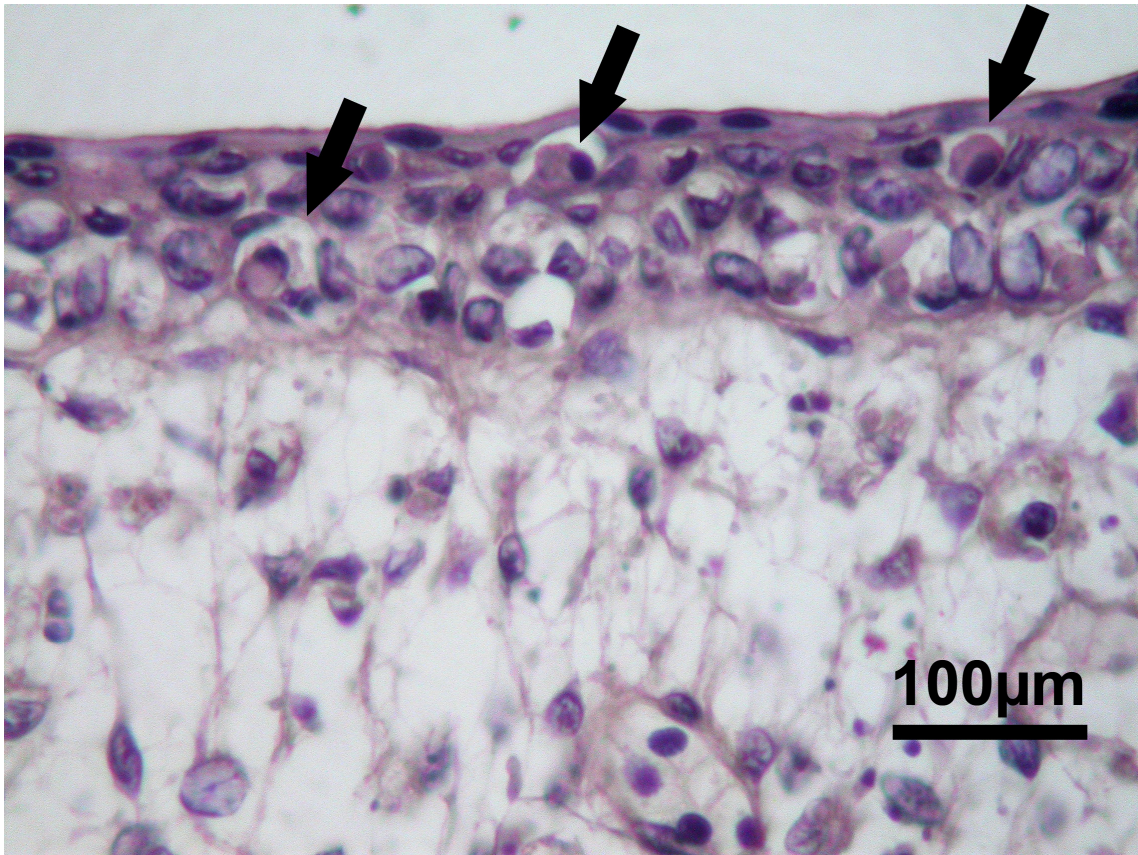
* **Notokorda;** bütün omurgalıların embriyolarında, dorsal olarak, boyuna uzanan, segmentsiz ve bükülebilir sopa şeklinde bir uzantıdır. Omurgalıların gelişiminde omurga, notokordanın yerini alır (Demirsoy, 1998).



Şekil 3.3. Kuyruğun transvers kesiti. (BD: Bağ Doku, KD: Kas Doku, KA: Kuyruk Atardamarı, KV: Kuyruk Toplardamarı, N: Notokorda, SK: Spinal Korda, PH: Pigment Hücresi)

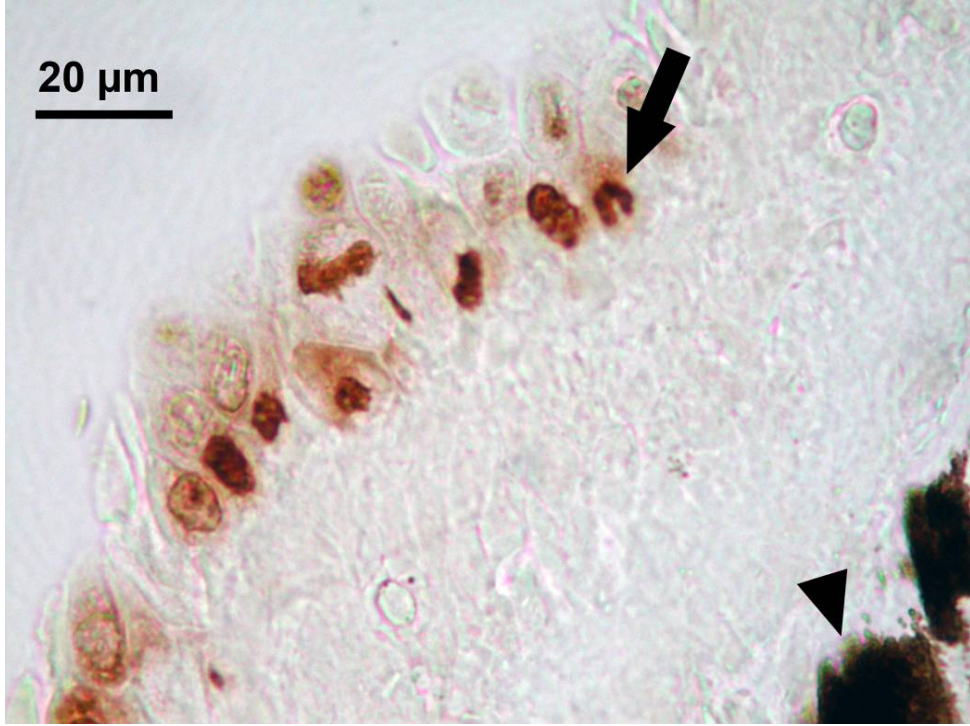
3.3. APOPTOZİS

Kuyruk kısalması esnasında dış epitel tabakasındaki hücre sayısında artış meydana gelir, tabaka çok sıralı bir görünüm kazanır. İncelenen her üç kuyruk boyunda da hücrelerin buldukları substratından koparak apoptozise gittikleri görülür (Şekil 3.4), bu sırada kuyruk tamamen emilinceye kadar bütünlük korunur, yerel kopmalar dahi görülmez. Epitel tabakadaki apoptotik hücrelerin, diğer hücrelerden ve hücreler arası matriksten kopmaları, kromatinlerinin yoğunlaşması ve zar yapısı dağılmadan apoptotik cisimler haline gelmeleri apoptotik morfolojinin tipik özellikleridir.



Şekil 3.4. 10 mm kuyrukta epitel tabakada apoptotik hücreler. Oklar apoptotik hücrelerden bazılarını gösteriyor. (H-E)

Apoptozise özgü DNA kırıklarını belirlemeye yönelik TUNEL uygulamasında da epitel tabakasında yoğun olarak apoptotik hücelere rastlanmıştır (Şekil 3.5 ve 3.6).

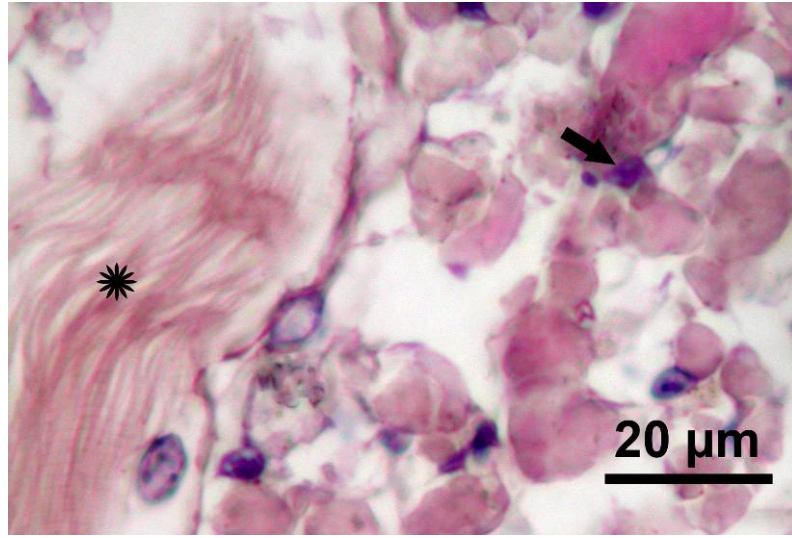


Şekil 3.5. 40 X objektifle 5 mm kuyrukta epitel tabakada apoptotik hücreler. Ok, epitel tabakadaki TUNEL pozitif hücrelerden birini, ok ucu ise bir pigment hücrelerini gösteriyor.

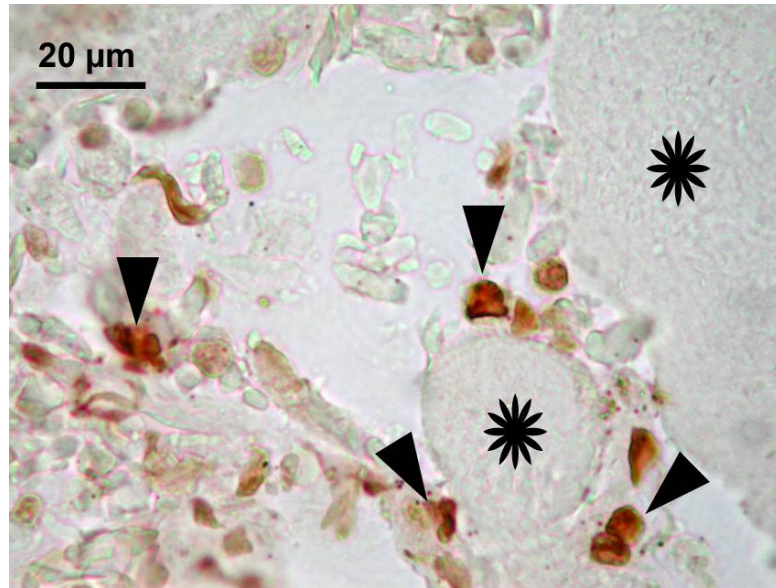


Şekil 3.6. 100 X objektifle 5 mm kuyrukta epitel tabakada apoptotik hücreler. Ok, epitel tabakadaki TUNEL pozitif hücrelerden birini gösteriyor.

İncelenen her üç kuyruk boyunda da frontal ve sagittal kesitlerde kas tabakasının fragmanlar halinde apoptozise gittikleri görülür (Şekil 3.7). Kas tabakasının apoptozisinin dıştan içe doğru gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16). Kısalan kuyruk hareket ettirilebiliyor olsa da işlevsel değildir. Kas dokusundaki apoptotik fragmanlarda, kasın kendine has fibriler yapısını kaybettiği ve kas bantlarının kaybolarak hücrelerin amorf bir hal aldıkları görülmüştür. Kuyruk boyu 5 milimetreye kadar kısalmıncaya değin kuyruk yüzgeçleri makroskobik olarak görülebilir.

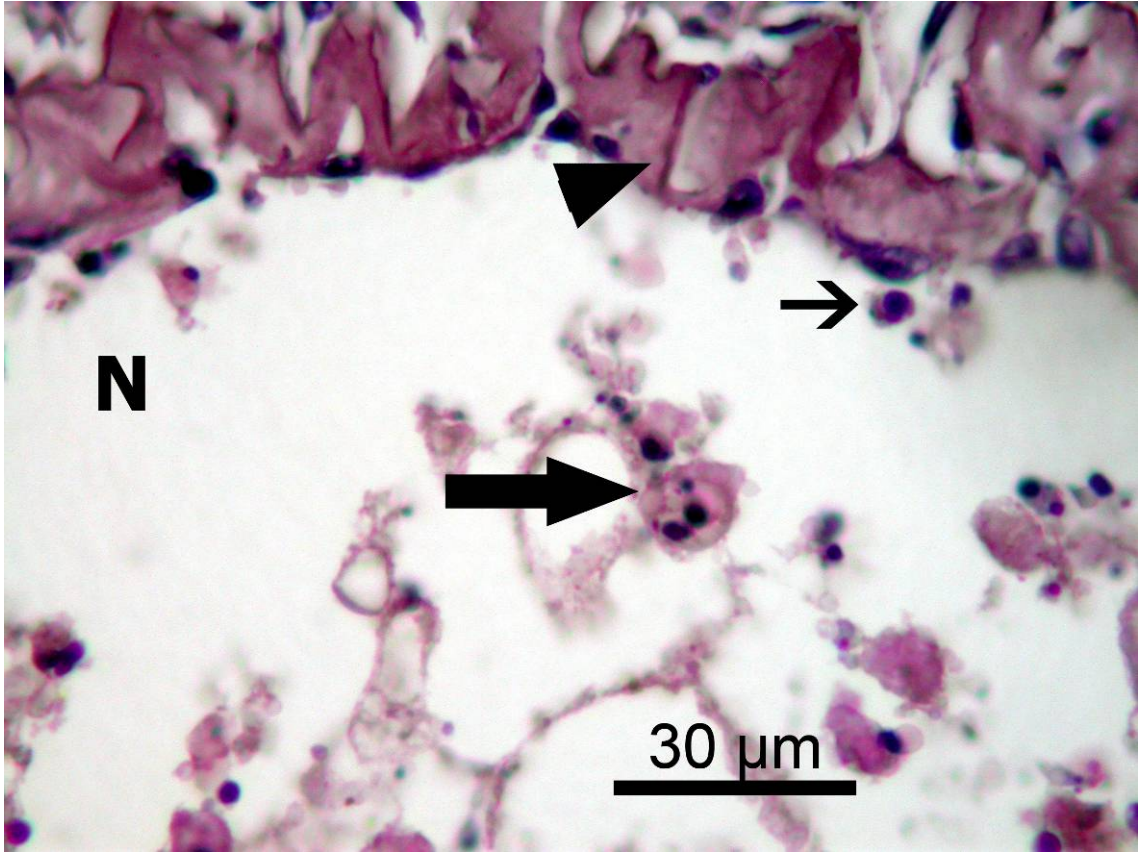


Şekil 3.7. 10 mm kuyrukta kas dokusunda apoptozis. Ok, apoptotik fragmanda, kromatini yoğunlaşmış bir apoptotik cismi, yıldız ise kısmen sağlam kas lifini gösteriyor. (H-E)

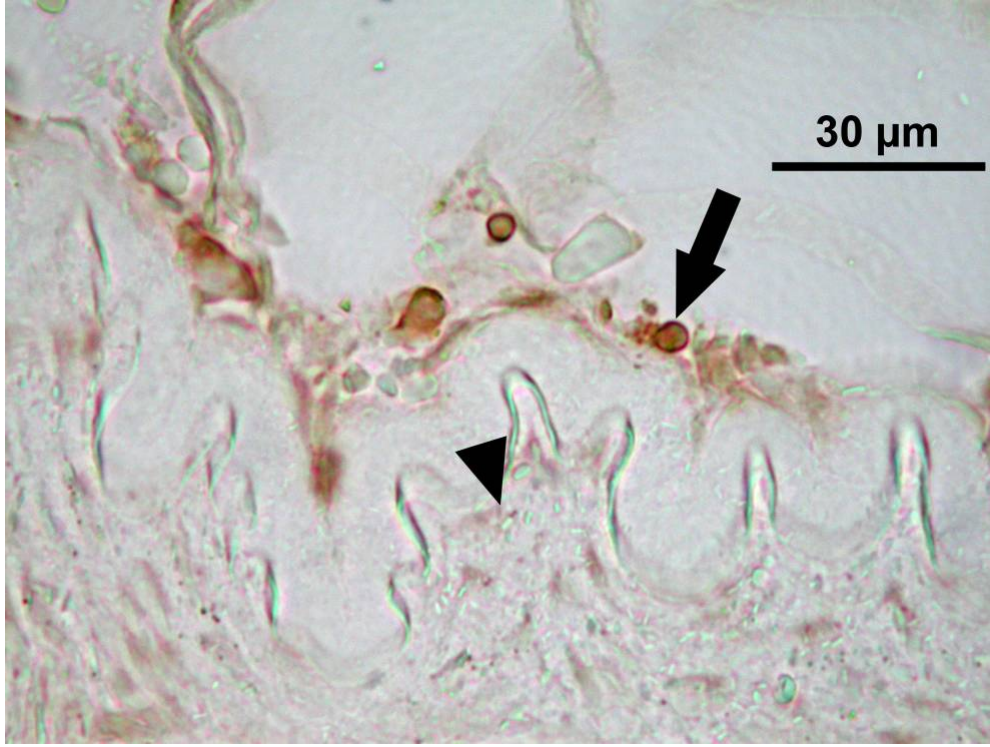


Şekil 3.8. 5 mm kuyrukta kas dokusunda apoptozis. Yıldızlar kısmen sağlam kas dokusunu, ok uçları ise TUNEL pozitif apoptotik kas hücrelerinden bazılarını gösteriyor.

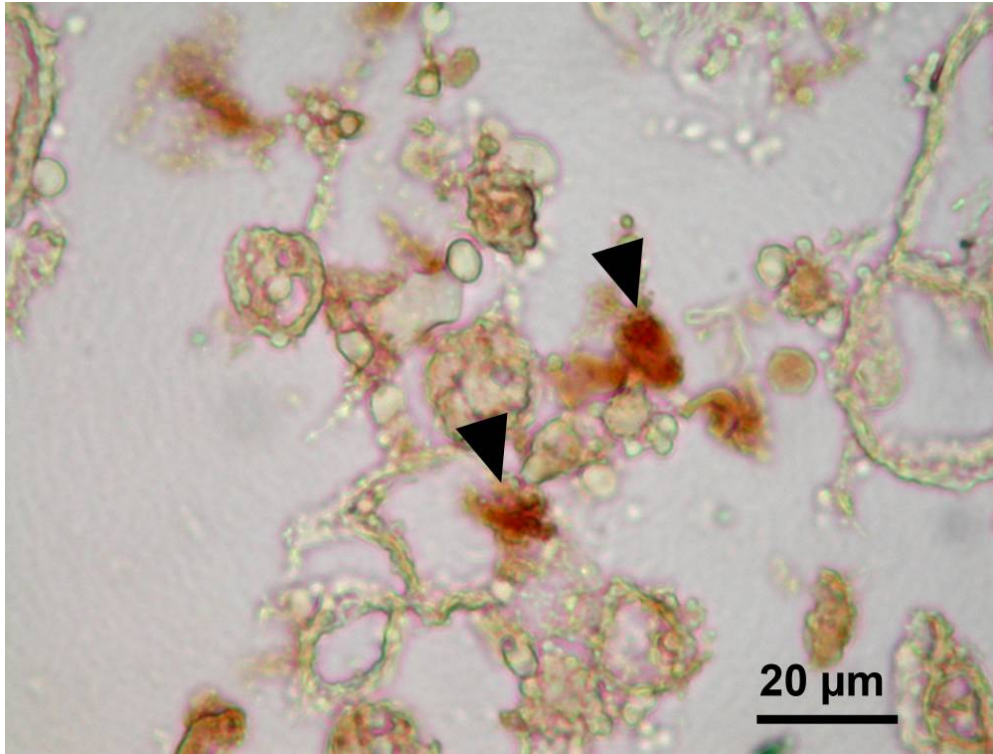
İncelenen her üç kuyruk boyunda da notokordanın geri emiliminin tüpün u kısmından başladığı gözlenmiştir, ayrıca notokordadaki apoptozisin notokorda kılıfını oluşturan fibroblast tabakasıyla temas eden hücrelerden başladığı gözlenmiştir (şekil 3.9 –şekil 3.10). Dejenere notokordada boyutlarının diğer hücelere göre büyük olması ve dallanmış uzantılarıyla makrofaja benzeyen hücelere rastlanmıştır.



şekil 3.9. 5 mm kuyrukta kalınlaşan fibroblast tabakası ve notokorda. N: Notokorda, Ok ucu; fibroblast tabakasını, kalın ok makrofaj benzeri bir hücreyi, ince ok ise fibroblast tabakası yakınındaki apoptotik cisimleri gösteriyor. (H-E)



Şekil 3.10. 5 mm kuyrukta kalınlaşan fibroblast tabakası ve notokorda. Ok ucu fibroblast tabakasını, ok ise TUNEL pozitif boyanan, apoptotik cisimleri gösteriyor.



Şekil 3.11. 5 mm kuyrukta notokordadaki TUNEL pozitif hücreler.

3.4. ALCIAN BLUE BOYAMALARI

Kuyruk boyuna bağlı olmaksızın 0,3 M MgCl₂ konsantrasyonunda pH 5,7 ve PAB boyamalar birbirine yakın sonuçlar vermiştir. Alcian Blue boyanması kemik dokusundaki kuvvetli boyanma ve bağ dokudaki zayıf boyanma ile sınırlıdır. PAS boyanması ise oldukça kuvvetli olarak her tabakada gözlenir. 0,025 M MgCl₂ konsantrasyonunda pH 5,7 karşıt boya olarak PAS'ta ise bağ dokudaki boyanma kuvvetlenir, kas dokusundaki fasialarda ve dejenere olmuş kas fragmanlarında da yoğun boyanma gözlenir. Her üç kuyruk boyu için, her üç AB boyaması ve hematoksilin-eozin boyaması sonuçları genel görüntü olarak verilmiştir (Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16).

3.4.1. Epitel ve Bağ Dokusunda Alcian Blue Boyamaları

Epitel ve bağ dokuda AB boyamaları her üç kuyruk boyu için benzer sonuçlar vermiştir (Şekil 3.12, Çizelge 3.1).

AB'nin sülfatlanmış glikoproteinler, çekirdek asitleri, karboksillenmiş ve sülfatlanmış GAG'ları boyadığı 0,025 M MgCl₂ konsantrasyonunda AB pH 5,7-PAS boyamada, kuyruk boyuna bağlı olmaksızın, apoptotik ve apoptotik olmayan tüm epitel hücrelerinin yüzeylerinde yoğun boyanma gözlenmektedir. Bağ doku ve subepidermal fibroblast tabakası da genel olarak yoğun boyanır. Epitel dokunun en dış tabakasında ve subepidermal fibroblast tabakasında ise boyanma görülmez (Şekil 3.12, Şekil 3.14b, Şekil 3.15b, Şekil 3.16b, Çizelge 3.1).

AB'nin zayıf ve kuvvetli olarak sülfatlanmış GAG'ları boyadığı 0,3 M MgCl₂ konsantrasyonunda AB pH 5,7-PAS boyamada, her üç kuyruk boyunda da, epitel dokuda, subepidermal fibroblast tabakasında ve bağ dokuda az yoğun bir boyanma görülür (Şekil 3.12, Şekil 3.14c, Şekil 3.15c, Şekil 3.16c, Çizelge 3.1).

AB'nin asit müsinleri boyadığı PAB boyamada, her üç kuyruk boyunda da, boyanma bağ dokudaki ve epitel hücrelerinin yüzeylerindeki var yok arası boyanmayla sınırlıdır (Şekil 3.12, Şekil 3.14d, Şekil 3.15d, Şekil 3.16d, Çizelge 3.1).

3.4.2. Kas Dokusunda Alcian Blue Boyamaları

Kas dokusunda da AB boyamaları her üç kuyruk boyu için benzer sonuçlar vermiştir (Şekil 3.13, Çizelge 3.1).

AB'nin sülfatlanmış glikoproteinler, çekirdek asitleri, karboksillenmiş ve sülfatlanmış GAG'ları boyadığı 0,025 M MgCl₂ konsantrasyonunda AB pH 5,7-PAS boyamada, apoptotik ve kısmen sağlam kas dokusunun her ikisinde birden yoğun bir boyanma görülür. Apoptotik kas hücrelerinde boyanmanın, kısmen sağlam kas dokusuna göre daha baskın olduğu gözlenir. Kas

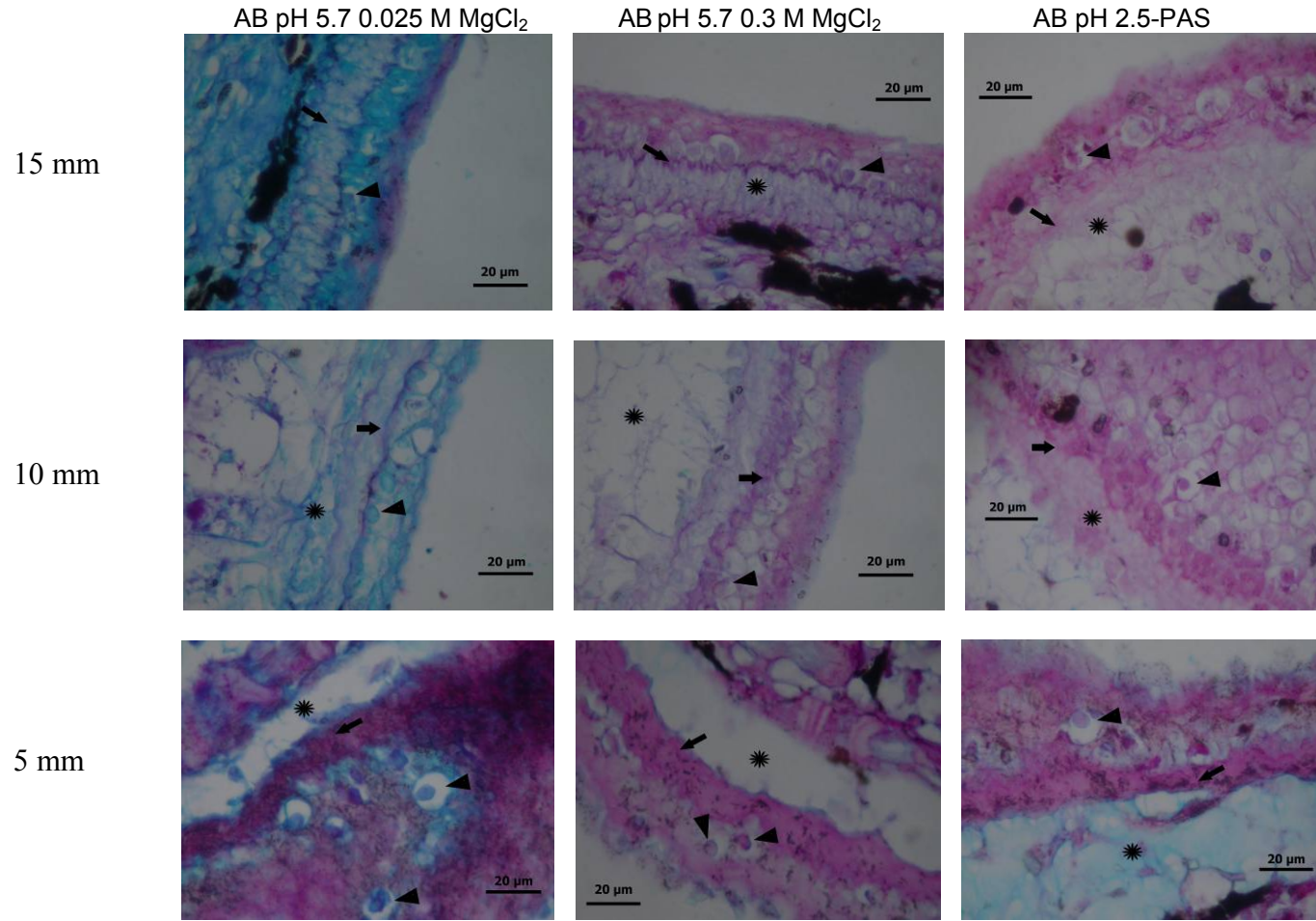
fibrillerini bir arada tutan hücreler arası maddenin de yoğun boyandığı görülür (Şekil 3.14b, Şekil 3.15b, Şekil 3.16b, Çizelge 3.1).

AB'nin zayıf ve kuvvetli olarak sülfatlanmış GAG'ları boyadığı 0,3 M MgCl₂ konsantrasyonunda AB pH 5,7-PAS boyamada, kas dokusunda yoğun olmayan bir boyanma görülür. Boyanma apoptotik kas hücrelerinde, yoğun olmamakla birlikte, sağlam kas dokusuna göre daha belirgindir (Şekil 3.14c, Şekil 3.15c, Şekil 3.16c, Çizelge 3.1).

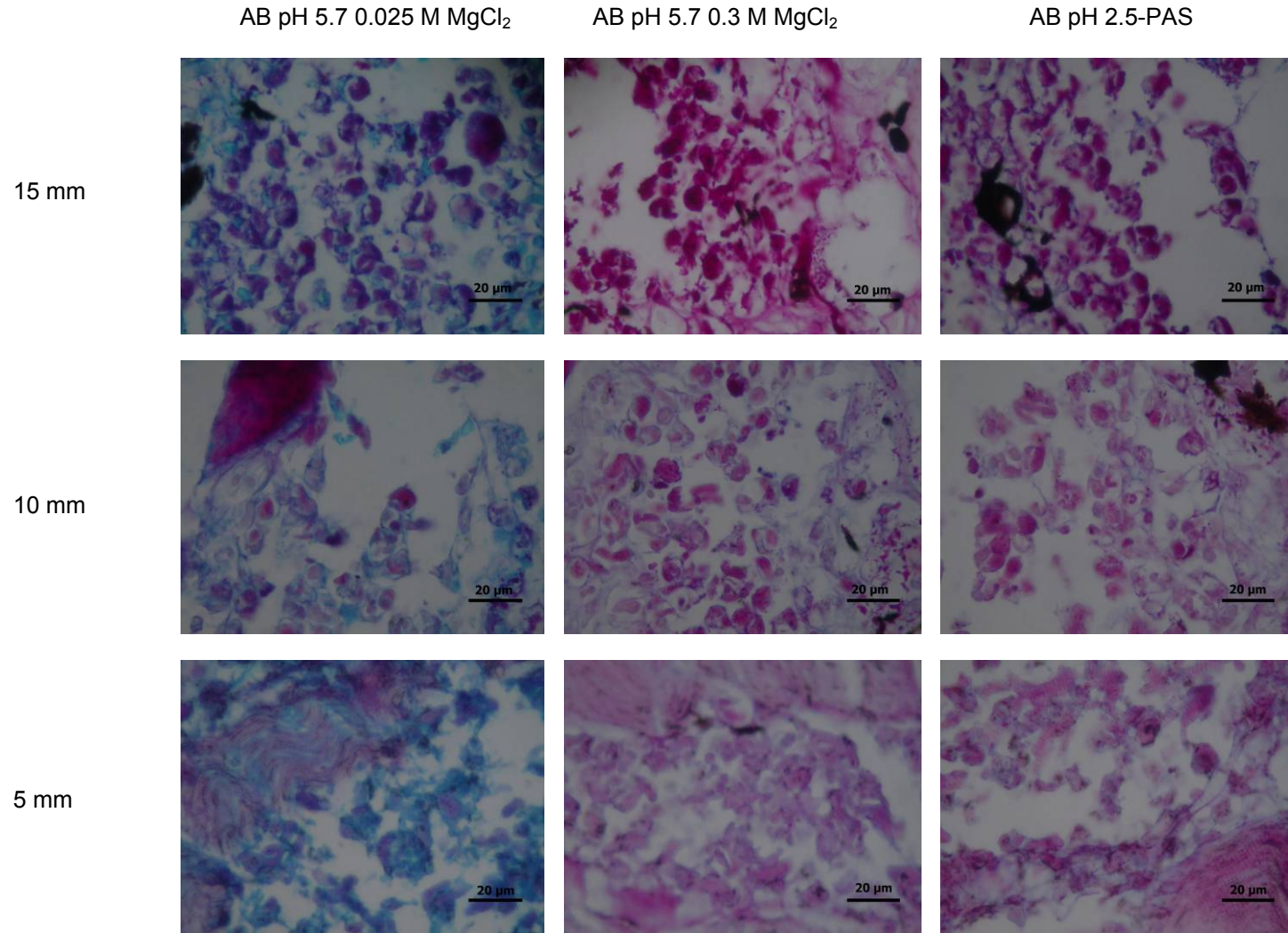
AB'nin asit müsinleri boyadığı PAB boyamada elde edilen sonuçlar, 0,3 M MgCl₂ konsantrasyonunda AB pH 5,7-PAS boyamaya benzer olmakla beraber boyanma daha siliktir. Kısmen sağlam kas dokusunda neredeyse fark edilmez (Şekil 3.14d, Şekil 3.15d, Şekil 3.16d, Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Epitel, Bağ ve Kas Dokusundaki AB Boyamalarının Kuyruk Boyuna Göre Karşılaştırması. (+++: Çok Yoğun Boyanma, ++: Yoğun Boyanma, +: Az Yoğun Boyanma +/-: Var/Yok Arası Boyanma)

Kuyruk Boyu	Epitel Doku			Bağ Doku			Kas Dokusu		
	pH 5.7		PAB	pH 5.7		PAB	pH 5.7		PAB
	0,025 M	0,3 M		0,025 M	0,3 M		0,025 M	0,3 M	
15 mm	++	+	+/-	++	+	+/-	++	+	+/-
10 mm	++	+	+/-	++	+	+/-	++	+	+/-
5 mm	++	+	+/-	++	+	+/-	++	+	+/-



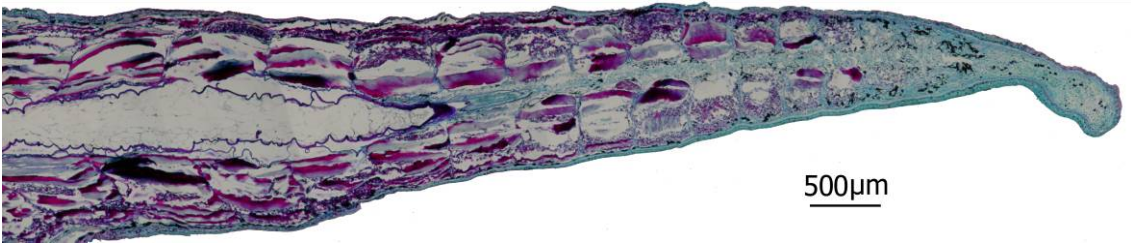
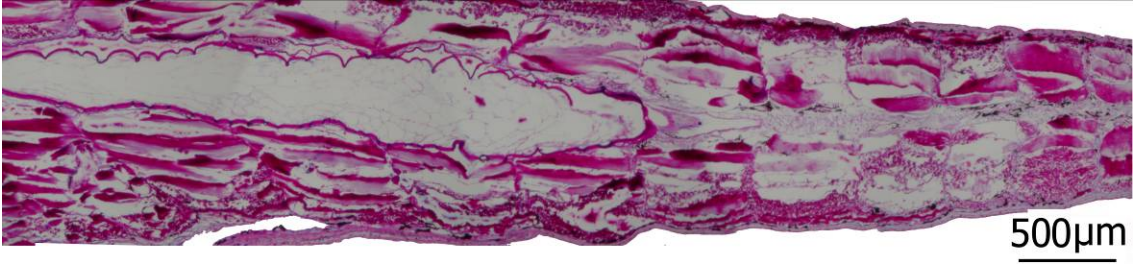
Şekil 3.12. Farklı kuyruk boylarında epitel dokudaki AB boyamaların karşılaştırması. Ok uçları apoptotik epitel hücrelerini, oklar subepidermal fibroblast tabakasını, yıldızlar da amorf bağ doku bileşenlerini gösteriyor.



Şekil 3.13. Farklı kuyruk boylarında kas dokusundaki Alcian Blue boyamalarının karşılaştırması.



a) Hematoksilen-Eozin

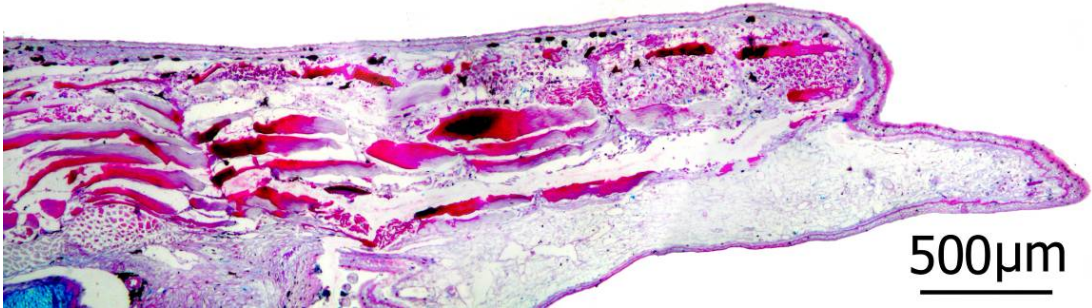
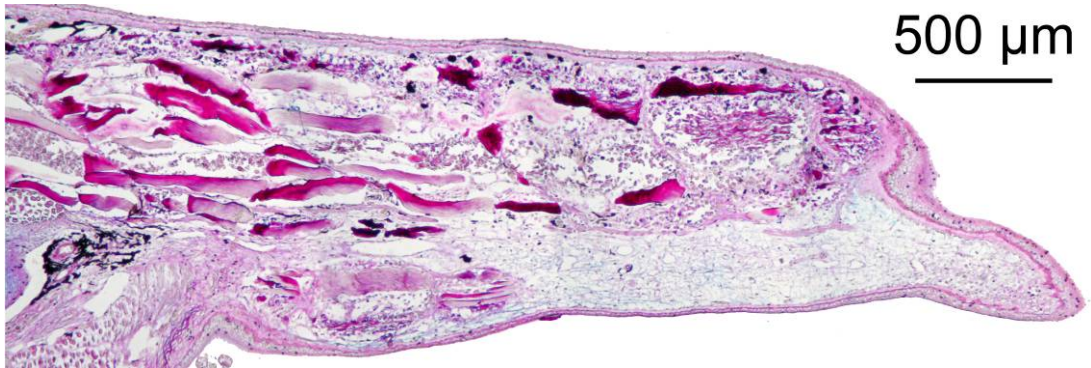
b) 0.025 M MgCl₂ Konsantrasyonunda, %0,1 Alcian Blue pH 5.7-PAS Boyamac) 0.3 M MgCl₂ Konsantrasyonunda, %0,1 Alcian Blue pH 5.7-PAS Boyama

d) Alcian Blue pH 2.5-PAS Boyama

Şekil 3.14. 15 mm. kuyruk boyunda, boyama sonuçlarının genel görüntüleri.

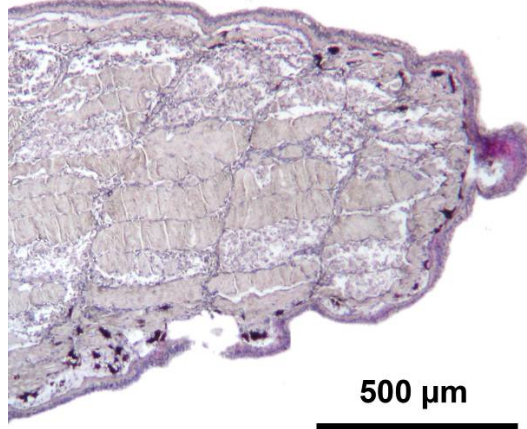


a) Hematoksilen-Eozin

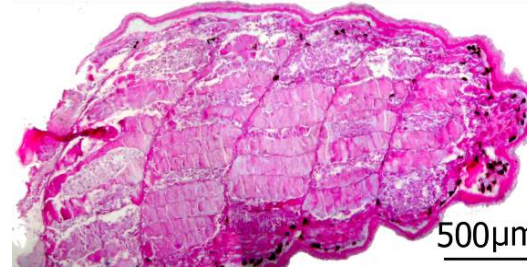
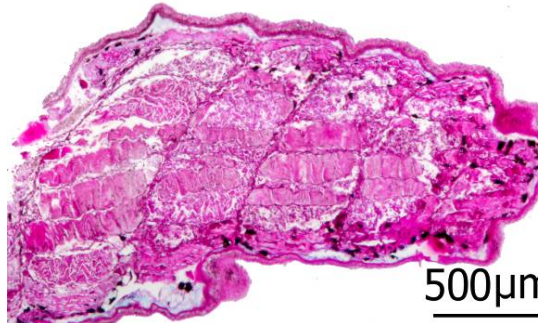
b) 0.025 M MgCl₂ Konsantrasyonunda, %0,1 Alcian Blue pH 5.7-PAS Boyamac) 0.3 M MgCl₂ Konsantrasyonunda, %0,1 Alcian Blue pH 5.7-PAS Boyama

d) Alcian Blue pH 2.5-PAS Boyama

Şekil 3.15. 10 mm. kuyruk boyunda, boyama sonuçlarının genel görüntüleri.



a) Hematoksilen-Eozin

b) 0.025 M MgCl₂ Konsantrasyonunda, %0,1 Alcian Blue pH 5.7-PAS Boyamac) 0.3 M MgCl₂ Konsantrasyonunda, %0,1 Alcian Blue pH 5.7-PAS Boyama

d) Alcian Blue pH 2.5-PAS Boyama

Şekil 3.16. 5 mm. kuyruk boyunda, boyama sonuçlarının genel görüntüleri.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Programlı hücre ölümü embriyonik gelişim ve doku dengesinin sağlanması gibi olaylarda gerekli olan evrimsel olarak korunmuş, fizyolojik bir süreçtir. Embriyonik gelişimde, birçok doku ve organın gelişiminde apoptotik mekanizmalar rol almaktadır (Renehan et al, 2001). Örneğin farelerde el ve ayak parmaklarının şekillenmesinde, kurbağa başkalaşımında da kuyruk kısalması sırasında hücrelerin programlı olarak öldürülmesiyle kuyruğun ortadan kaldırılmasında ya da gelişen sinir sisteminde hücre sayısının düzenlenmesinde görev almaktadır (Alberts et al, 2002). Çalışmada, kurbağa başkalaşımının son evresi olan kuyruk kısalmasında apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla, ülkemizde geniş bir yayılım gösteren ve laboratuvar çalışmalarına oldukça uygun bir kurbağa türü olan *Bufo viridis*'i kullandık.

Ölen hücredeki morfolojik, biyokimyasal ve moleküler değişikliklere bağlı olarak iki farklı hücre ölümü şekli (apoptozis ve nekroz) birbirinden ayırt edilebilmektedir. Hücre morfolojisini belirlemede kullanılan standart bir boyama yöntemi olan hematoksilen-eozin ile farklı kuyruk boylarındaki apoptotik hücrelerde kromatin yoğunlaşması, hücrelerin diğer hücre ve hücreler arası matriksten kopmaları ve büzüşmeleri, sitoplazmik tomurcukların oluşması, çekirdek ve sitoplazmanın zar yapısı dağılmadan parçalanması, bilinen apoptotik morfolojiye uygun olarak (Kerr et al, 1974), kolaylıkla ayırt edilmiştir (Şekil 3.4, Şekil 3.7, Şekil 3.9). Buna ek olarak apoptotik hücreleri belirlemede uygun bir yöntem olan (Labat-Moleur et al., 1998; Sloop et al., 1999) TUNEL yöntemi kullanılmış ve kısalan kuyrukta apoptotik hücreler spesifik olarak belirlenmiştir (Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.10, Şekil 3.11). Yapılan literatür çalışmasında kısalan *Bufo viridis* kuyruğunda apoptozisin belirlenmesine yönelik bu yöntem ile ilgili bir bilgi bulunamamıştır. Çalışmamızda bu yöntemin olumlu sonuçlar vermesi, *Bufo viridis* kuyruğundaki apoptotik hücrelerin belirlenmesinde TUNEL'in uygun bir yöntem olduğunu göstermiştir. Öte yandan, kuyruk kısalması sırasında kuyrukta yer alan çizgili kasların ölümü, kromatin yoğunlaşması ve hücre fragmentasyonu gibi normal apoptotik morfolojiye uygun özellikler göstermesinin yanında, Kerr ve meslektaşlarının bulgularına (1974) uygun biçimde miyofibrillerin arasında yarıklar oluşması sonucunda miyofibrillerin fragmanlara ayrılması ve sitoplazmanın çok sayıda apoptotik cisme bölünmesiyle klasik apoptozisten farklı bir morfoloji göstermektedir. *Xenopus* larvasında bu çizgili kas apoptotik cisimlerinin daha sonra, büyük olasılıkla kas fibrilleri arasındaki mezenşimal hücrelerden kaynaklanan makrofajlar tarafından sindirildiği öne sürülmüştür (Weber, 1964). Yapılan çalışmalarda kısalan kuyrukta otofajinin meydana geldiği (Kerr et al, 1974), otofajik vakuollerin miyofibriller arasında yer aldığı ve otofajinin kuyruk kısalmasında bir rol üstlenebileceği öne sürülmüştür (Fox, 1975).

İncelenen üç farklı kuyruk boyunda epitel dokuda ve çizgili kas dokusunda apoptotik hücrelerin oranında dikkate değer bir farklılığın olmaması, kuyruk kısalması sırasında apoptotik hücre sayısının programlı olarak dengede tutulduğunu düşündürmüştür.

Kuyruğun sagittal ve longitudinal kesitleri incelendiğinde kuyruktaki hacim yitirilmesinin, uç kısımlardan başlayarak kas dokusu hücrelerinin ölmesi, hücreler arası matriks, spinal korda, notokorda ve damarların dejenerasyonu sonucunda dıştan içe doğru gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 3.14a, Şekil 3.15a, Şekil 3.16a). Kısalan kuyrukta epitel tabakasının çok katlı bir görünüm kazanması ve kuyruk boyunun çok kısaldığı (1–2 mm) durumlarda kuyruğun peltemsi bir hal alması da bunu kanıtlamaktadır. Bu düzenlemenin gelişimle artan tiroit hormonu düzeyinden kaynaklandığı öne sürülmektedir (Zhou ve Brown, 1993; Brown et al, 1996; Nakajima et al, 2005).

Kurbağa başkalaşımının çıplak gözle de izlenebilen ve hormon etkisiyle meydana gelen, hücre ölümü çalışmaları için uygun bir model olan, gerileyen kuyruktaki hücre ölümünün mekanizması için günümüzde iki model ortaya atılmıştır (Nakajima et al, 2005). Bunlardan biri hücrelerin hormon artışına doğrudan yanıt verdiklerini iddia eden “intihar” (suicide) modeli, diğeri ise hücrelerin diğer hücrelerin ya da hücreler arası matriksin etkisiyle öldürüldüklerini öne süren “katil” (murder) modelidir. Katil modeli, normal epitel hücreleri ve hücreler arası matriks arasındaki etkileşimlerin bozulmasıyla ortaya çıkan programlı hücre ölümü ‘anoikis’ (Yunanca: evsizlik) olgusu ile desteklenmektedir (Meredith et al, 1993; Frisch ve Francis, 1994; Boudreau et al, 1995).

Gözlemlerimizde epitel hücrelerinin apoptozisinin, hücrenin diğer hücrelerle ve hücreler arası matriksle bağlantılarını kaybetmesiyle (Şekil 3.4), tipik anoikis morfolojisi şeklinde ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu ölüm şekli, hücrelerin tek tek öldükleri görüldüğünden intihar modeline de uymaktadır. Kısalan kurbağa kuyruğunda, hücrelerin hücreler arası matriksle olan bağlantılarını apoptotik süreç neticesinde mi kaybettiklerinin yoksa hücrelerin bağlantılarını kaybetmesinin mi apoptozise yol açtığına ilişkin anlaşılması için daha spesifik çalışmalara gereksinim duyulmaktadır. Kas fibrillerinin kompartımanlar halinde, grup olarak ölmeleri ise katil modele uymaktadır (Şekil 3.7, Şekil 3.8). Kuyruk boyu kısaldıkça fibroblast tabakasının daha kalın bir görünüm arz etmesi, TUNEL işaretlemeye fibroblast tabakasında apoptotik hücrelerin belirlenememesi ve fibroblast tabakasına komşu olan hücrelerin erken aşamalarda apoptozise gitmeleri, fibroblast hücrelerinin diğer hücrelerin öldürülmesinde rol aldıklarını düşündürmüştür (Şekil 3.9, Şekil 3.10). Bu bulgular da katil modeli destekleyen gözlemlerdir. Bu sonuçlar, kuyrukta, her iki ölüm modelinin de geçerli olduğunu düşündürmektedir. Bunun yanında hem epitel dokuda hem de kas dokusunda aynı tip hücrelerin farklı zamanlarda apoptozise gitmelerinin, bazı hücrelerin de (notokordayı çevreleyen fibroblastlar ve subepidermal fibroblastlar) yaşamaya devam etmelerinin arkasındaki mekanizma hala bilinmemektedir. Öte yandan, hücrelerin aynı uyarana (plazmadaki T_3 artışı) nasıl farklı tepkiler verebildikleri henüz anlaşılabilmiş değildir. Bütün bu soru işaretleri, kuyruk kısılması sırasında sadece apoptozisin değil başka ölüm mekanizmalarının da olabileceğini ve bu konu üzerinde daha fazla durulması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Epitel dokuda her üç kuyruk boyunda da apoptotik ve apoptotik olmayan hücrelerin yüzeylerindeki Alcian blue boyamanın farklılık göstermemesi (Şekil 3.12; Şekil 3.14b,c,d; Şekil 3.15b,c,d; Şekil 3.16b,c,d) hücrelerin apoptozise gitmelerinde ve apoptotik süreçte yüzey GAG'larında değişiklik olmadığını düşündürmüştür.

İncelenen her üç kuyruk boyunda AB boyamalarında, özellikle AB pH 5,7-PAS boyama için 0,025 M MgCl₂ konsantrasyonunda boyanmanın yoğun olması ve 0,03 M MgCl₂ konsantrasyonunda boyanmanın azalması, kuyrukta sülfatlanmış glikoproteinlerin veya karboksillenmiş GAG'ların yoğun, sülfatlanmış GAG'ların ise az olduğunu göstermektedir (Şekil 3.12; Şekil 3.13; Şekil 3.14b,c; Şekil 3.15b,c; Şekil 3.16b,c). Öte yandan AB pH 2.5 boyanmasında hem apoptotik hem de apoptotik olmayan hücrelerde mavi boyanmanın oldukça az olması (Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14d, Şekil 3.15d, Şekil 3.16d), kuyruk kısalması sırasında hücre yüzey sialik asit miktarında bir azalma olabileceğini düşündürmüştür. Kas dokusunda ise özellikle 0,025 M MgCl₂ konsantrasyonunda AB pH 5,7-PAS boyamada, apoptotik bölümlerde boyanmanın artması sağlam kas dokusuna oranla bu bölgelerde karboksillenmiş GAG'ların daha yoğun olarak bulunduğunu göstermiştir (Şekil 3.12, Şekil 3.13, Şekil 3.14, Şekil 3.15, Şekil 3.16). Bu artış üç nedenle olabilir 1) Çizgili kas apoptozisinde karboksillenmiş GAG'ların bir rolü olabilir, 2) kas dokusu arasına yerleşmiş olan fibroblast ya da bağ dokunun elemanlarından kaynaklanan bir boyanma olabilir veya 3) bu devrede kas dokusunda görüldüğü (Weber, 1964; Nishikawa et al, 1998) bildirilen makrofajların sayıca artışlarından kaynaklanan bir boyanma artışı olabilir.

Genel sonuç olarak, kurbağa başkalaşımında kısalan kuyrukta meydana gelen programlı hücre ölümü, büyük olasılıkla işin içine hücreler arası matriks bileşenlerinin (Zhu et al, 2001), dolayısıyla glukokonjugatların da karıştığı birden fazla hücre ölüm tipini içermektedir. Bu nedenle, kısalan kurbağa kuyruğunda yapılacak daha spesifik çalışmalar, hücre ölümü mekanizmalarının karanlık yanlarının aydınlatılması için faydalı olabilir.

5. KAYNAKLAR

Abraham, M.C. and Shaham, S., 2004. Death without caspases, caspases without death. *Trends in Cell Biology*, 14(4): 184–193.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th. Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group, NY., 1010–1021, 1463.

Arnoult, D., Viollet, L., Petit, F., Lelièvre, J., Estaquier, J., 2004. HIV-1 triggers mitochondrion death. *Mitochondrion*, 4: 255–269.

Baum, L. G. and Pace, K.E., 1997. Induction of T Lymphocyte Apoptosis: A Novel Function for Galectin-1. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 9(45): 21-29.

Berry, D. L., Schwartzman R. A. and Brown, D. D., 1998. The expression pattern of Thyroid Hormone Response Genes in the Tadpole Tail Identifies Multiple Resorption Programs. *Developmental Biology*, 203: 12–23.

Boudreau, N., Sympson, C.J., Werb, Z., Bissell, M.J., 1995. Suppression of ICE end apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*, 267: 891–893.

Brandley, B.K., 1991. Cell surface carbohydrates in cell adhesion. *Semin. in Cell Biol*, 2: 281–287.

Brandley, B.K., Rao, N., Nashed, M., Dasgupta, F., Abbas, S., Asa, D., Gant, T. And Musser, J., 1992. Carbohydrates and their analogs as selectin ligands and antagonists. Elsevier Science Publisher B. V. Leucocyte adhesion. Basic and clinical Aspects. C.G. Gahmberg, T. Mandrup-Poulsen, L. Wogensen Bach and B. Hökfelt, eds., 99–111.

Brown, D.D., Zhou, W., Furlow, J.D., Kanamori, A., Schwartzman, R.A., Remo, B.F., Pinder, A., 1996. The thyroid hormone-induced tail resorption program during *Xenopus leavis* metamorphosis. *Developmental Biology*, 93: 1924–1929.

Curtin, J.F. and Cotter, T.G., 2003. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular Signalling*, 15: 983–992.

Davies, J.A., Fisher, C.E., and Barnett, M.W., 2001. Glycosaminoglycans in the study of mammalian organ development. *Biochemical Society Transactions*, 29(2): 166-171.

Demirsoy, A., 1998. Yaşamın Temel Kuralları. Genel Biyoloji/Genel Zooloji. Cilt-1/Kısım-1 11. Baskı. s: 286 Meteksan A.Ş. ANKARA.

Denver, R.J., Pavgi, S. and Shi, Y., 1997. Thyroid Hormone-dependent Gene Expression Program for *Xenopus* Neural Development. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(13 :28): 8179–8188.

Do, K.Y., Smith, D.F. and Cummings, R.D., 1990. Lamp-1 in CHO cells is a primary carrier of poly-N-acetyllactosamine chains and is bound preferentially by a mammalian S-type lectin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 173: 1123–1128.

Doorn, W.G. and Woltering, E.J., 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*, 10 (3): 117–122.

Drickamer, K., 1988. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem*, 263:9557–9560.

- Eda S., Yamanaka M., Beppu M., 2004. Carbohydrate-mediated phagocytic recognition of early apoptotic cells undergoing transient capping of CD43 glycoprotein. *J Biol Chem.*, 279(7):5967–5974.
- Edinger A. L. and Thompson C. B., 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16: 663–669.
- Evan, G. I. and Vousden, K. H., 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342–348.
- Feizi, T., 1981. Carbohydrate differentiation antigens. *Trends Biochem. Sci.*, 6: 333-335.
- Fox, H., 1975. Aspects of tail muscle ultrastructure and its degeneration in *Rana temporaria*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 23: 191–207.
- Frisch, S.M. and Francis, H., 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.*, 124:619-626.
- Granville, D.J., Carthy, C.M., Hunt, D.W., McManus, B.M., 1998. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab. Invest.*, 78: 893– 913.
- Grimsley, C., and Ravichandran, K.S., 2003. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends in Cell Biology*, 13(12): 648–656.
- Gurp, M., Festjens, N. Loo, G., Saelens, X., Vandenabeele, P., 2003. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 304: 487–497.
- Hanada, H., Katsu, K., Kanno, T., Sato, E.F., Kashiwagib, A., Sasaki, J., Inoued, M., Utsumic, K., 2003. Cyclosporin A inhibits thyroid hormone-induced shortening of the tadpole tail through membrane permeability transition. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135: 473–483.
- Ishikawa, Y. and Kitamura, M., 1999. Inhibition of glomerular cell apoptosis by heparin. *Kidney International*, 56: 954–63.
- Jennings D.H., and Hanken J., 1998. Mechanistic Basis of Life History Evolution in Anuran Amphibians: Thyroid Gland Development in the Direct-Developing Frog, *Eleutherodactylus coqui*. *General and Comparative Endocrinology*, 111: 225–232.
- Keppler O.T., Peter M.E., Hinderlich S., Moldenhauer G., Stehling P., Schmitz I., Schwartz-Albiez R., Reutter W., Pawlita M., 1999. Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)- mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology*, 9: 557–569.
- Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R., 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26: 239–257.
- Kerr, J.F.R., Harmon, B., Searle, J., 1974. An electron-microscope study of cell deletion in the anuran tadpole tail during spontaneous metamorphosis with special reference to apoptosis of striated muscle fibers. *J. Cell Sci.*, 14: 571–585.
- Kerr, J.F.R., Winterford, C.M., Harmon, B.V., 1994. Morphologic criteria for identifying apoptosis. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Pres., 1: 319–329.

- Kim E.J., Sampathkumar S.G., Jones M.B., Rhee J.K., Baskaran G., Goon S., Yarema K.J., 2004. Characterization of the metabolic flux and apoptotic effects of O-hydroxyl- and N-acyl-modified N-acetylmannosamine analogs in Jurkat cells. *Biol Chem*, 30;279(18): 18342–18352.
- Konopleva, M., Zhao S., Xie Z et al., 1999. Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp. Med. Biol.*, 457: 217–236.
- Labat-Moleur, F., Guillermet, C., Lorimier, P., Robert, C., Lantuejoul, S., Brambilla, E. and Negoescu A., 1998. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J. Histochem. Cytochem.*, 46(3): 327–334.
- Lewis, K., 2000. Programmed Death in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 503–514.
- Liu, J. Zhang, J. Ramanan, S. Julian, J. Carson, D. D. and Hooi S. C., 2004. Heparin/heparan sulfate interacting protein plays a role in apoptosis induced by anticancer drugs *Carcinogenesis*, 25 (6) :873–879.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R., Wang, X., 1996. Induction of the apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, 86: 147–157.
- Lockshin, R.A., and Zakeri, Z., 2002. Caspase-independent cell deaths. *Current Opinion in Cell Biology*, 14: 727–733.
- Lockshin, R.A., and Zakeri, Z., 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36: 2405–2419.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S., Frohlich, K.U., 2002. A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell*, 9: 911–917.
- Meredith, J.E. Jr, Fazeli B., Schwartz, M.A., 1993. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*, 4: 953–961.
- Mihara, S., Suzuki, N., Wakisaka, S., Suzuki, S., Sekita, N., Yamamoto, S., Saito, N., Hoshino, T., and Sakane, T., 1999. Effects of Thyroid Hormones on Apoptotic Cell Death of Human Lymphocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(4): 1378-1385.
- Murrell, M.P., Yarema, K.J., Levchenko, A., 2004. The system biology of Glycosylation. *ChemBioChem*, 5: 1334-1347.
- Nagata, S., 1997. Apoptosis by death factor. *Cell*. 88: 355–365.
- Nakajima, K., Fujimoto, K., Yaoita, Y., 2005. Programmed cell death during amphibian metamorphosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 16: 271–280.
- Nishikawa, A., Murata, E., Akita, M., Kaneko, K., Moriya, O., Tomita, M., 1998. Hideo Hayashi Roles of macrophages in programmed cell death and remodeling of tail and body muscle of *Xenopus laevis* during metamorphosis. *Histochem Cell Biol*, 109: 11–17.
- Ogier-Denisy, E. and Codogno, P., 2003. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1603: 113–128.
- Ozeki, Y., Matsui, T., Yamamoto, Y., Funahashi, M., Hamako, J. and Titani, K., 1995. Tissue fibronectin is an endogenous ligand for galectin-1. *Glycobiology*, 5: 255–261.

- Özeti, N., Yılmaz, İ., 1994. Türkiye Amfibileri. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 151 Bornova/İzmir Ege Üniversitesi Basımevi 101, 123–134, 168–170.
- Perillo, NL, Uittenbogaart, CH, Nguyen, JT and Baum, LG., 1997. Galectin-1, an Endogenous Lectin Produced by Thymic Epithelial Cells, Induces Apoptosis of Human Thymocytes. *J. Exp. Med.*, 185: 10, 1851–1858.
- Pumphrey, C. Y., Theus, A. M., Li, S., Parrish, R. S. and Sanderson, R. D., 2002. Neoglycans, Carbodiimide-modified Glycosaminoglycans: A New Class of Anticancer Agents That Inhibit Cancer Cell Proliferation and Induce Apoptosis. *Cancer Research*, 62: 3722–3728.
- Quintarelli, G., Scott, J.E., Dellovo M.C., 1964. The chemical and histochemical properties of Alcian blue. II. Dye binding of tissue polyanions. *Histochemie*, 4: 86.
- Regula, K.M., Ens, K., Kirshenbaum, L.A., 2003. Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 35: 559–567.
- Renehan, A.G. Booth, C. And Potten C.S., 2001. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ*, 322: 1536–1538.
- Rose C.S., 2005. Integrating ecology and developmental biology to explain the timing of frog metamorphosis. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(3): 129-135.
- Sarastea, A., Pulkki, K., 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45: 528–537.
- Schwerk, C. and Schulze-Osthoff. K., 2003. Non-apoptotic functions of caspases in cellular proliferation and differentiation. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1453–1458.
- Scott, J.E., Quintarelli, G., Dellovo M.C., 1964. The chemical and histochemical properties of Alcian blue. I. The mechanism of alcian blue staining. *Histochemie*, 4: 73.
- Scott, J.E. and Dorling, J., 1965. Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian blue in salt solutions. *Histochemie*, 5:221-33.
- Sharon, N. And Lis, H., 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246: 227–234.
- Sheehan, K.M., DeLott, L.B., West, Richard A. Bonnema, J.D., DeHeer. D.H., 2004. Hyaluronic acid of high molecular weight inhibits proliferation and induces cell death in U937 macrophage cells. *Life Sciences*, 75: 3087–3102.
- Shi, Y. 2002. Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis. *Molecular Cell*. 9: 459–470.
- Sloop, G.D., Roa, J.C., Delgado, A.G., Balart, J.T., Hines, M.O. and Hill, J.M., 1999. Histologic sectioning produces TUNEL reactivity. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 123: 529-532.
- Spicer, S.S. and Meyer, D.B. 1960. Histochemical differentiation of acid mucopolysaccharides by means of combined aldehyde fuchsin-alcian blue staining. *Am. J. Clin. Pathol.*, 13:343.
- Suzuki O., Nozawa Y., Abe M., 2003. Sialic acids linked to glycoconjugates of Fas regulate the caspase-9-dependent and mitochondria-mediated pathway of Fas-induced apoptosis in Jurkat T cell lymphoma. *Int J Oncol.*, 23(3): 769–774.

Tang, P.W., Gooi, H.C., Hardy, M., Lee, Y.C. and Feizi, T., 1985. Novel approach to the study of the antigenicities and receptor functions of carbohydrate chains of glycoproteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 132: 474–480.

Tata. J.R., 1999. Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. *Biochimie*, 81: 359–366.

Thompson C.B., 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267(5203):1456–62.

Thorburn, A., 2004. Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling*, 16: 139–144.

Varki, A., 1997. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J.*, 11: 248–255.

Weber, R., 1964. Ultrastructural changes in regressing tail muscles of *Xenopus* larvae at metamorphosis. *J. Cell Biol.*, 22: 481–487.

Wride, M.A., Parker, E., Sanders, E.J., 1999. Members of the Bcl-2 and Caspase Families Regulate Nuclear Degeneration during Chick Lens Fibre Differentiation. *Developmental Biology*, 213: 142–156.

Yamashita, K. and Fukushima, K., 2004. The carbohydrate recognition by cytokines modulates their physiological activities. *Glycoconjugate Journal*, 21: 31–34.

Yang, T., Witham, T.F., Villa, L., Erff, M., Attanucci, J., Watkins, S., Kondziolka, D., Okada, H., Pollack, I.F., Chambers, W.H., 2002. Glioma-associated hyaluronan induces apoptosis in dendritic cells via inducible nitric oxide synthase: implications for the use of dendritic cells for therapy of gliomas. *Cancer Res.*, 62: 2583–2591.

Yen, P.M., 2001. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiological Reviews*, 81(3): 1097–1142.

Zhou, Q. and Cummings, R.D., 1990. The S-type lectin from calf heart tissue binds selectively to the carbohydrate chains of laminin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 281: 27–35.

Zhou, W. and Brown, D.D., 1993. Thyroid hormone-induced Gene Expression Program for Amphibian Tail Resorption. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(22): 16270–16278.

Zhu, W., Leber, B. and Andrews, D.W., 2001. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *Embo J.*, 20 (21): 5999–6007.

WWW Adresleri

<http://www.whose-tadpole.net/key-to-tadpoles/B-viridis-LARVAE.htm> (22-05-2005)

<http://www.whose-tadpole.net/key-to-adult-amphibia/B-viridis.htm> (22-05-2005)

ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi : 22 Ocak 1980

Doğum Yeri : Hekimhan/Malatya

Mezun Olduğu Okullar ve Mezuniyet Yılları:

İlköğretim : 8 Eylül İlkokulu-Manisa, 1990

Ortaöğretim : Atatürk Ortaokulu-Manisa, 1993

Lise Eğitimi : Manisa Lisesi-Manisa, 1996

Lisans : Celal Bayar Üniversitesi Biyoloji Bölümü-Manisa, 2001