

T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKUT APANDİSİT PATOFİZYOLOJİSİNDE
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES, APOPTOZ VE OTOFAJİ
MARKERLARININ İNCELENMESİ

Hazırlayan:

Büşra AYNEKİN

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Kadir DEMİRCAN

Ankara-Haziran 2015

Aileme ithaf ediyorum...

T.C.
TURGUT ÖZAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

AKUT APANDİSİT PATOFİZYOLOJİSİNDE
ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES, APOPTOZ VE OTOFAJİ
MARKERLARININ İNCELENMESİ

Hazırlayan:

Büşra AYNEKİN

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Kadir DEMİRCAN

Ankara-Haziran 2015

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

Turgut Özal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahribat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı beyan ederim.

Büşra AYNEKİN

ONAY

Büşra AYNEKİN tarafından hazırlanan “*AKUT APANDİSİT PATOFİZYOLOJİSİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES APOPTOZ VE OTOFAJİ MARKERLARININ İNCELENMESİ*” başlıklı bu çalışma, 11/06/2015 tarihinde yapılan savunma sınavı sonucunda (*oybirliği/oyçokluğu*) ile başarılı bulunarak jürimiz tarafından TIBBİ GENETİK ANABİLİM Dalında *Yüksek lisans* tezi olarak kabul edilmiştir.

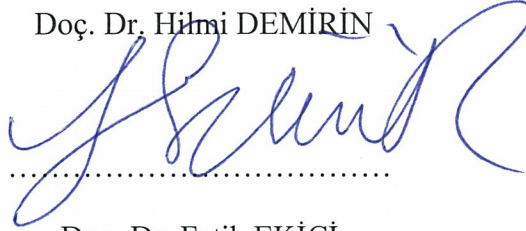


Doç. Dr. Kadir DEMİRCAN

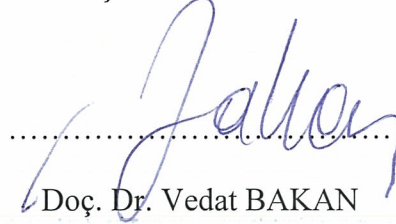
(Danışman)



Doç. Dr. Hilmi DEMİRİN



Doç. Dr. Fatih EKİCİ



Doç. Dr. Vedat BAKAN

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Kadir DEMİRCAN' a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca emekleri geçen hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet GÜNDÜZ'e, Sayın Doç. Dr. Esra GÜNDÜZ'e, Sayın Yrd. Doç. Dr. Sümeyya AKYOL'a, Sayın Doç. Dr. Adem KARA'ya, Sayın Yrd. Doç. Dr. Muradiye Acar'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ömer Faruk HATİPOĞLU'na, Sayın Doç. Dr. Hilmi DEMİRİN'e, Sayın Doç. Dr. Fatih EKİCİ'ye ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat ÖZNUR'a ve Sayın Doç. Dr. Hüsamettin ERDAMAR'a teşekkür ederim.

Dokuların teminini sağlayan Sayın Doç. Dr. Vedat BAKAN'a teşekkür ederim.

Bu çalışma sırasında TÜBİTAK Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projeleri Destekleme Programı 1001-113S428 no' lu projede bursiyer olarak çalıştım. Proje yürütücüsü Sayın Prof. Dr. Ferah ARMUTÇU'ya ve TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Laboratuvar arkadaşlarım ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Büşra AYNEKİN

Ankara-Haziran

ÖZET

[AYNEKİN, Büşra]. [Akut Apandisit Patofizyolojisinde ER Stres, Apoptoz ve Otofaji Markerlarının İncelenmesi], [Yüksek lisans tezi], Ankara, [2015].

Akut apandisit (AA) karın hastalıkları içinde sık görülen ve sinsi ilerleyen bir hastalıktır. Hastalık tanısının erken yapılamaması ve tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması bu hastalığı ölüm oranı yüksek hastalıklardan biri yapmaktadır. AA, apendiksin bir bölümünde izlenen akut iltihabi bir süreçtir ve pediatrik yaş grubunda en sık görülen, yaşamı tehdit eden, acil cerrahi gerektiren bir durumdur.

Son yıllarda bu hastalığa ilişkin bazı klinik tecrübeler kazanılmıştır. Ancak, hastalığın tek tedavisi cerrahi olarak apendiksin total olarak çıkarılmasıdır. Dolayısıyla mevcut yaklaşımların yerine alternatif tanı ve tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hastalıkların moleküler mekanizmasını anlayabilmek ve yeni tedaviler ortaya koyabilmek için yapılan genetik çalışmalar bu şartlarda önem kazanmaktadır.

Endoplazmik retikulum (ER) bir hücrenin protein sentezinden ve düzgün katlanmasından sorumlu bir organeldir. Diğer önemli görevi ise; bir sensör gibi hücresel stresi hissetmektir. ER, kalite kontrol merkezi gibi proteinlerin doğru katlanmasından sorumludur. ER kapasitesini aşan durumlarda proteinler katlanamamakta ya da yanlış katlanmaktadır. Bu duruma Endoplazmik retikulum stresi (ER stresi) denilmektedir. Burada katlanamayan ya da yanlış katlanmış proteinler hücre dengesini bozmaktadırlar. Bu gibi durumlarda Unfolded Protein Response, (UPR) devreye girmekte ve sorunu gidermeye çalışmaktadır

UPR, hücrede sorunu gideremez ise; hücre iki ölüm mekanizmasından birini tercih etmektedir. Bu ölüm mekanizmalarından biri; içsel bir programı aktive ederek hücrenin kendi kendini yok etmesi olan apoptoz iken, diğeri ise hücrenin iç dengesini

sağlamak için açlık gibi bazı koşullarda hücre içi yapıları parçalayarak kendi kendini yok etme mekanizması olan otofajidir.

Yapılan bazı çalışmalar UPR'nin enflamasyonu başlatabileceğini savunmaktadırlar. Bu çalışmalar enflamasyon kaynaklı hastalıkların mekanizmasını anlamak için esas konu teşkil etmektedir.

Enflamasyon; doku hasarı ya da enfeksiyon sonucu insan vücudunun immün sisteminin bu tepkilere karşı verdiği ilk yanıttır. Ancak enflamasyon halinin kronikleşmesi halinde zararlı hale gelecektir. Artrit, alzheimer, tip 1 ve tip 2 diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi bazı hastalıkların gelişmesine sebep olacaktır.

AA'da ER stres, apoptoz ve otofaji markerlarını araştırarak, AA patogenezinin farklı bir bakış açısını kazandırmak amaç edinilmiştir.

Anahtar kelimeler: Akut apandisit (AA), Endoplazmik retikulum stresi (ER stresi), Apoptoz, Otofaji.

ABSTRACT

[AYNEKIN, Busra]. [Investigation of Autophagy, Apoptosis, And ER Stress Markers in Acute Appendicitis Pathogenesis], [Master's Thesis], Ankara, [2015].

Acute appendicitis (AA) is the most common pathology in the abdomen and is an insidious disease, hardly having an early diagnosis and limited treatment options, making it one of the highest mortality rate of general. The entity hardly having an AA is an acute inflammatory process observed in the pediatric age group, and most common, life-threatening, is a condition which requires immediate surgery.

Some clinical experience has been gained in recent years for the disease. However, surgical treatment total removal of appendix remains the only choice. Therefore there is a need for alternative methods of diagnosis and treatment instead of the current approach. To understand the machinery disease at the molecular level and put forth new treatment regimes, conducted genetic studies gained importance. Endoplasmic reticulum (ER) is responsible for a cell's protein synthesis and its folding correctly. Another important task is to feel the cellular stress. It is responsible for proper folding of proteins, working as a quality control center. In case of capacity excess of the ER, the protein is unfolded or misfolded. The condition is called ER stress. In this condition, the unfolded/misfolded proteins drive the cell to a stress, which in turn switches to a reaction cascade called unfolded protein response (UPR) entering the circuit to resolve the issue.

If the UPR can not provide adaptation to the cell, the cell has choose one of the two cell death mechanisms,

One of which is apoptosis, running by action of an internal program with self-destruction, and the other is the autophagy which is to ensure the cell's internal balance by breaking some conditions, such as intracellular structures in hunger with self-destructing mechanisms.

Some authors argue that UPR may initiate inflammation. These studies are essential issues to understand the underlying mechanisms of inflammation-induced diseases.

Inflammation is the reaction to a tissue injury or is the result of an infection of the human body via the immune system, which is the first reflex to these responses. However, it becomes harmful if the condition of the inflammation elongates as in the state of chronic arthritis, Alzheimer's disease, type 1 and type 2 diabetes and cardiovascular diseases.

We want to put a different aspect on the mechanism of AA, investigating the ER stress, apoptosis, and autophagy markers in the tissue of the patients.

Key words: Acute appendicitis (AA), Endoplasmic reticulum stress (ER stress), Apoptosis, Autophagy.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER	viii
TABLolar	viii
KISALTMALAR	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM.....	2
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1. TARİHÇE.....	4
2.2.1. Apendiksin Embriyolojisi ve Anatomisi	4
2.2.2. Apendiksin Histolojisi	5
2.2.3. Apendiksin Fizyolojisi	6
2.2.4. Akut Apendisit Etiyolojisi ve Patogenezi	7
2.2. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ.....	7
2.2.1. Katlanmamış Protein Sinyal Yolakları.....	9
2.2.1.1. ATF-6 (Activation Transcription Factor 6) Yolağı	10
2.2.1.2. PERK Yolağı (PKRK-like ER Kinase)	10
2.2.1.3. IRE1 α Yolağı (İnositol-Requirising1 Alfa)	11
2.3. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI.....	12
2.3.1. Apoptoz	12
2.3.1.1. Kaspazlar	13
2.3.2. Otofaji.....	14
2.3.2.1. Otofaji Üzerinde Etkili Olan Moleküller:.....	15
3. MATERYAL ve METOD	17
3.1. DENEYDE KULLANILACAK CİHAZLAR.....	18
3.2. WESTERN BLOT.....	18
3.2.1. Protein İzolasyonu.....	19

3.2.2. Protein Miktar Tayini	20
3.2.3. Kaynatma.....	20
3.2.4. SDS-PAGE.....	21
3.2.5. Yükleme	22
3.2.6. Transfer İşlemi	22
3.2.7. Bloklama	22
3.2.8. Birinci Antikor (1. Ab).....	23
3.2.9. İkinci Antikor (2. Ab).....	23
3.2.10. ECL solüsyonu ile görüntüleme	23
3.3. İMMÜNOHİSTOKİMYA.....	27
3.3.1 Tespit	27
3.3.2 Şeffaştırma	28
3.3.3. Parafin Eldesi	28
3.3.4 Kesit Alma.....	28
3.3.5 Boyama	29
4. BULGULAR.....	30
4.1.GÖRÜNTÜLEME.....	29
4.1.1. ATF-6	30
4.1.2. PERK.....	31
4.1.3. LC3	33
4.1.4. GRP78	34
4.1.5. Kaspaz 12	35
4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYA BOYAMA SONUÇLARI	37
4.2.1. ATF-6	37
4.2.2 PERK.....	38
4.2.3 GRP78	39
4.2.4. LC3	40
4.2.5. Kaspaz 12	41
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ	45
7. KAYNAKLAR:.....	46

TABLÖLAR

Tablo 1. ATF-6'nın Western blot bant yoğunluğunun sayısal olarak ifadeleri.....	24
Tablo 2. PERK ve GRP78'in Western blot bant yoğunluğunun sayısal olarak ifadeleri	25
Tablo 3. Kaspaz 12 ve LC3'ün Western blot bant yoğunluğunun sayısal olarak ifadeleri	26
Tablo 4. ATF-6'nın apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları skorları.	37
Tablo 5. PERK'in apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları skorları.	38
Tablo 6. GRP78'in apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları skorları.	39
Tablo 7. LC3'ün apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları skorları	40
Tablo 8. Kaspaz 12'nin apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları skorları.	41

ŞEKİLLER

Şekil 1. Apendiksin Evrelerinin Şematik Tablosu.....	1
Şekil 2. ER'nin Şaperonlar, ERAD Ve Apoptoz İlişkisi.....	2
Şekil 3. Apendiksin Karın İçinde Anatomik Yerleşimi.....	5
Şekil 4. Apendiksin Histolojik Görünümü	6
Şekil 5. ER Stresi Sonucu Devreye Giren UPR Sistemi.....	8
Şekil 6. ER Stresi Sonucu ATF-6'nın Golgide Kırpılarak Aktive Olması.....	10
Şekil 7. UPR Yolaklarından Perk Yolağı	11
Şekil 8. UPR yolağı IRE1	11
Şekil 9. Otofaji ve Apoptoz Arasındaki Farklar	14
Şekil 10. ATF-6'nın Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü.....	31
Şekil 11. PERK'in Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü	32
Şekil 12. LC3'ün Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü.....	33
Şekil 13. GRP78'in Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü.....	34
Şekil 14. Kaspaz 12'nin Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü.....	36
Şekil 15. ATF-6 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları	37
Şekil 16. PERK İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları.....	38
Şekil 17. GRP78 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları	39
Şekil 18. LC3 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları.....	40
Şekil 19. Kaspaz 12 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları	41

GRAFİKLER

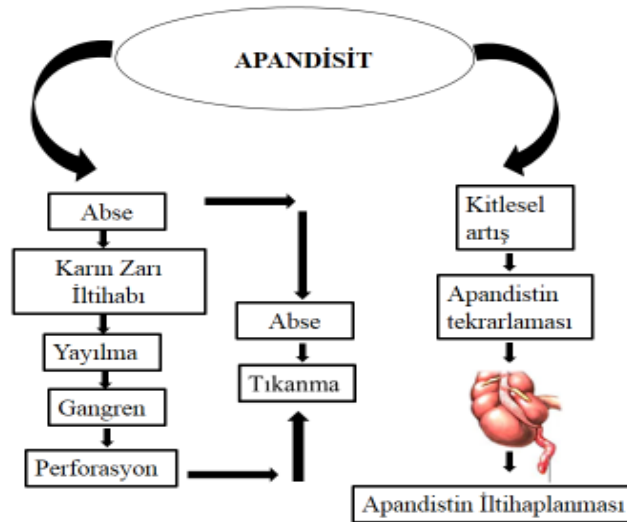
Grafik 1. ATF-6'nin Aktin İle Birlikte Western Blot Grafik Görüntü	31
Grafik 2. PERK'in Aktin İle Birlikte Western Blot Grafik Görüntüsü	32
Grafik 3. LC3'ün Aktin İle Birlikte Western Blot Grafik Görüntüsü.....	33
Grafik 4. GRP78'in Aktin İle Birlikte Western Blot Grafik Görüntüsü.....	34
Grafik 5. Kaspaz 12'nin Aktin İle Birlikte Western Blot Grafik Görüntüsü.....	36

KISALTMALAR

AA	: Akut Apandisit
APS	: Amonyum Persülfat
ATF-6	: Activation Transcription Factor 6
BIP	: Binding Immunoglobulin Protein
BSA	: Bovine Serum Albumin
ELF2	: Eukaryotic Translation Initiation Factor 2
ER	: Endoplazmik Retikulum
ER Stres	: Endoplazmik Retikulum Stres
ERAD	: Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
GRP78	: Glucose-Regulated Protein 78 kDa
HSP70	: Heatshock 70 kDa protein
IRE1	: Inositol-Requiring Enzyme
HE	: Hematoksilen Eozin
kDa	: Kilo Dalton
PERK	: Pkrk-Like ER Kinase
PVDF	: Polivinilidin Diflorür
PAGE	: Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
T-PER	: Tissue Protein Extraction Reagent
TBS-T	: Tris Buffered Saline - Tween 20
UPR	: Unfolded Protein Response

1. GİRİŞ

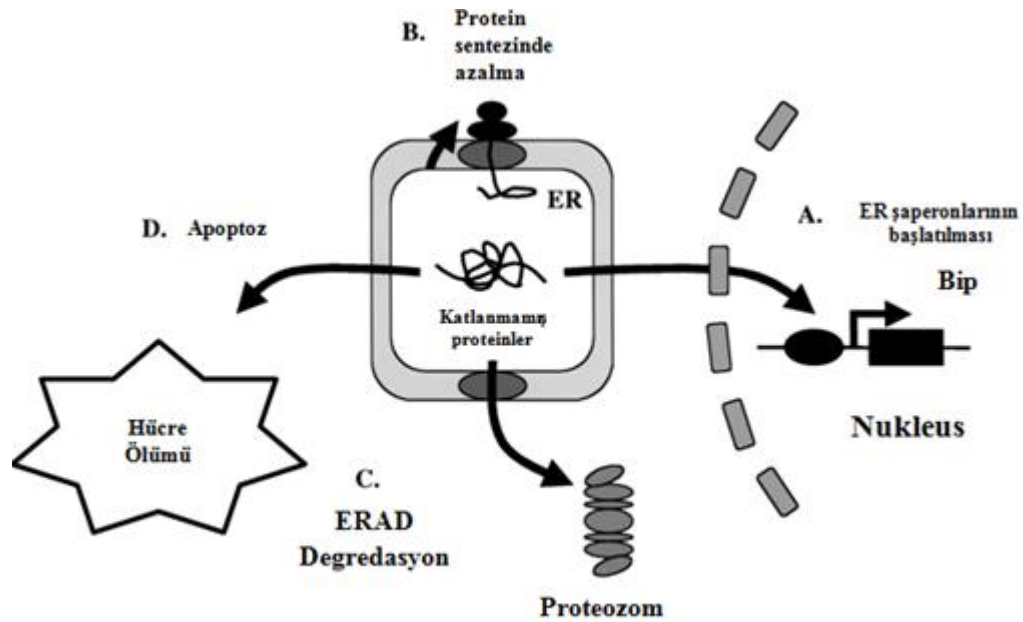
Akut apandisit (AA), appendiks vermiformisin akut iltihabıdır [15,17]. Akut kelime anlamı olarak tanı için gerekli işlemlerin yapılması ardından acil karar verilmesi gereken durum anlamına gelir. 1886 yılına kadar bir çekum rahatsızlığı olarak adlandırılan, tiflit olarak bilinen bu hastalık Reginald Haber Fitz bu lezyona AA denilmesi gerektiğini belirtti. [1] Çünkü bu hastalıkta çekum sağlamken, appendiksin ülserleşmiş olduğunu belirtti [2]. Ameliyatların %10-15 normal görünümlü appendiksin alımı ile sonuçlanabilmektedir [3]. Gelişen teknoloji ve artan tanı yöntemleri AA bağlı ölüm oranı azalmasına rağmen perforasyon oranı ve negatif apendektomide azalma olmamıştır [4-6]. Bebeklerde görülme sıklığı düşük olup, puberte döneminde artar. 20’li yaşlarda maksimum seviyeye ulaşır [7]. Perforasyon ise yaşlılarda %38,5, çocuklarda %17 civarında genç erkeklerde ise %3,5 civarındadır [8]. AA’da müdahalede geç kalındığında basit apandisit kliniği perforasyon ile sonuçlanmakta ve gecikmeye bağlı olarak morbidite ve mortalite de artma görülmektedir. Şekil 1’de appendiksin evreleri görülmektedir.



Şekil 1. Apendiksin Evrelerinin Şematik Tablosu

1.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM

Hücre içerisinde birçok görevi olan ER'nin bir diğer önemli görevi de protein katlanmasını sağlamaktır [9]. ER protein sentezinin kontrol edildiği yerdir. Proteinlerin doğru katlanıp katlanmadığını, şayet yanlış katlanma oldu ise düzeltilmesini eğer yanlış katlanma düzeltilemiyorsa proteinin yıkıma gönderilmesinden sorumlu olan organeldir [10]. ER fonksiyon kapasitesini aşan durumlarda katlanamamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi gözlenir. Bu durumda ER stresi oluşur [11]. Stresin hücrede hissedilmesi ve ardından bu strese karşı bir cevap verilmesi gerekir. Stres nedenleri arasında enfeksiyon, besin eksikliği, mutasyon sayılabilir [12]. ER, herhangi bir stresle karşılaştığı zaman homeostaziyi sağlamak için bu stresle başa çıkmak için UPR yolları devreye girer. Yanlış katlanan proteinler yıkıma gidecektir. Hücre yine de homeostaza erişemez ise apoptozise yönlendirilir [13]. UPR sinyal yolağının başlıcaları protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF6), inozitol gerektiren kinaz 1 (IRE1) yollarıdır [11]. Şekil 2'de ise ER'nin şaperonlar, ERAD ve Apoptoz ilişkisini görmekteyiz.



Şekil 2. ER'nin Şaperonlar, ERAD Ve Apoptoz İlişkisi

Bugüne kadar akut apandisitini erken tanıya yönelik birçok parametre araştırılmıştır. Bunlar arasında IL-6, TNF (Tümör Nekroz Faktör) ve prokalsitonin sayılabilir [14,15].

Akut batın antitesinin en sık nedeni olan, acil cerrahi girişim gerektiren hastalıklar içinde ilk sırayı almakta olan AA'da ER stresi, apoptoz ve otofaji markerlarının konsantrasyonu araştırılarak bu hastalığın erken tanı ve farklı tedavi alternatiflerinde yardımcı olabilecek hastalık patofizyolojisinin aydınlatılmasına dair yeni veriler elde etmek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TARİHÇE

AA en sık karşılaşılan karın hastalıklarından biridir. Çekum bölgesinin ciddi enflamasyonu ile ilgili klinik bir tabloyu fark ettiklerinde bu hastalığa “Perityphlitis” denildi. 1700’lü yıllarda Cladius Amyand bu hastalığa dair ilk başarılı sonucu elde etti [2] . Cladius Amyand bu hastalıkta aslında o güne kadarki bilinenleri yok sayan bir açıklama yaptı. Yapmış olduğu cerrahi operasyonda sakrumda izlenen fistülün delinmiş apendiks ucundan kaynaklandığını belirtti. O güne değin çekum bölgesinin harabiyeti söz konusuydu. Amyand, harabiyetin apendiks ucundan kaynaklandığını savunuyordu. 1759 yılında Mestivier apandisit apsesini iliak bölgeden uzaklaştırdı [3]. Bir hastada akut apandisit tanısı koyarak ilk appendektomi Abraham Groves tarafından yapıldı [5]. 1886 yılında Reginald Fitz ana hatlarıyla bu hastalığı ve cerrahisini tanımlayarak AA hastalığını tanımladı [8]. 1889’da Charles McBurney AA’da asıl meselenin erken tanı olduğunu belirtti [6].

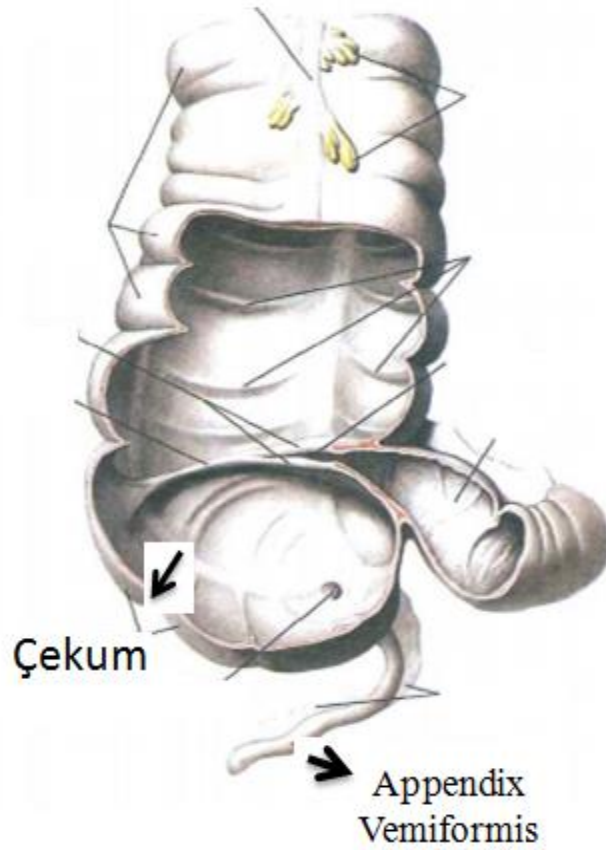
AA’da önemli olan, tanının komplikasyonlar gelişmeden konarak apendektominin yapılmasıdır. Tanı bazı hastalarda kolay konabilse de yaşa bağlı olarak güçlükler artmaktadır [1,16].

2.2.1. Apendiksin Embriyolojisi ve Anatomisi

Embriyolojik olarak apendiks çekumun alt ucundan gelişen bir divertiküldür. Embriyolojik dönemin hayatın 6. haftasında apendiks çekumdan ayrılır. İnce ve kalın barsakların birleşme noktasında bir çıkıntı belirir. Gelişimin üç ayı boyunca çekum büyümeye devam eder. Distal ucu büyümeye katılmaz. Çekuma bağlı kalarak çapı gittikçe incelen bir uzantı halinde kör sonlanarak apendiks adını alır.

Appendiks ileoçekal valfin 2,5 cm veya daha fazla distalinde olmak üzere çekumun iç ve arka yüzüne açılır. Genel olarak 8,5 ve 9 cm uzunluğunda, ucu dar ve kör sonlanan bir boru şeklindedir. Genel çap 3,8 mm arasında iken lümenin dar çapı 1-3 mm kadardır [1].

Anatomik olarak sağ fossa iliaca da bulunan apendiks spina iliaca anterior ile umbilicusu birleştiren hattın 1/3 dış ve 2/3 i uzunluklarının kesişme yerinde karın ön duvarı ile temas eder. (şekil 3.)

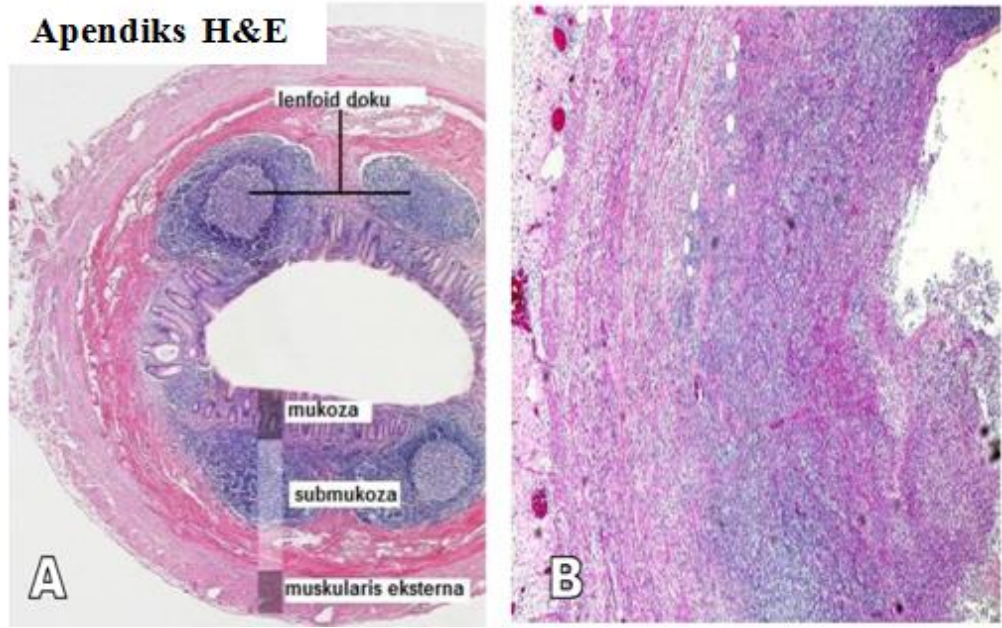


şekil 3. Apendiksin Karın İçinde Anatomik Yerleşimi

(Tus Time İnfotus SMT Anatomi kitabından alınmıştır. Syf 358).

2.2.2. Apendiksin Histolojisi

Apendiks duvarı seroza, mukoza, muskularis ve submukoza katlarından oluşmaktadır. Mukozada lenf folikülleri bulunur (şekil 4). Folikül köklerinde çukurluklar vardır [1].



A.Normal Apendiks

B.İnflame Apendiks (Apendisit)

Şekil 4. Apendiksin Histolojik Görünümü

2.2.3. Apendiksin Fizyolojisi

Apendiks vermiformis, fonksiyonu bilinmeyen bir organ kalıntısı olarak tanımlanmıştır [15].

Apendiks lümeninin içinde mukus, kalsiyum ve sindirim enzimlerinin bulunduğu ortalama 1-2 ml salgı üretilmektedir. Bu salgı tıkanmalı akut apandisit etiyolojisinde önem kazanmaktadır. Barsağın diğer bölümleri apendiks dokusu gibi peristaltik hareketlerle kasılmaktadır. Bu hareketler enfeksiyonun yayılmasında önem kazanır. Perforasyonun daha erken görülmesinin nedeni de apendiksin peristaltik hareketlerine bağlanmıştır.

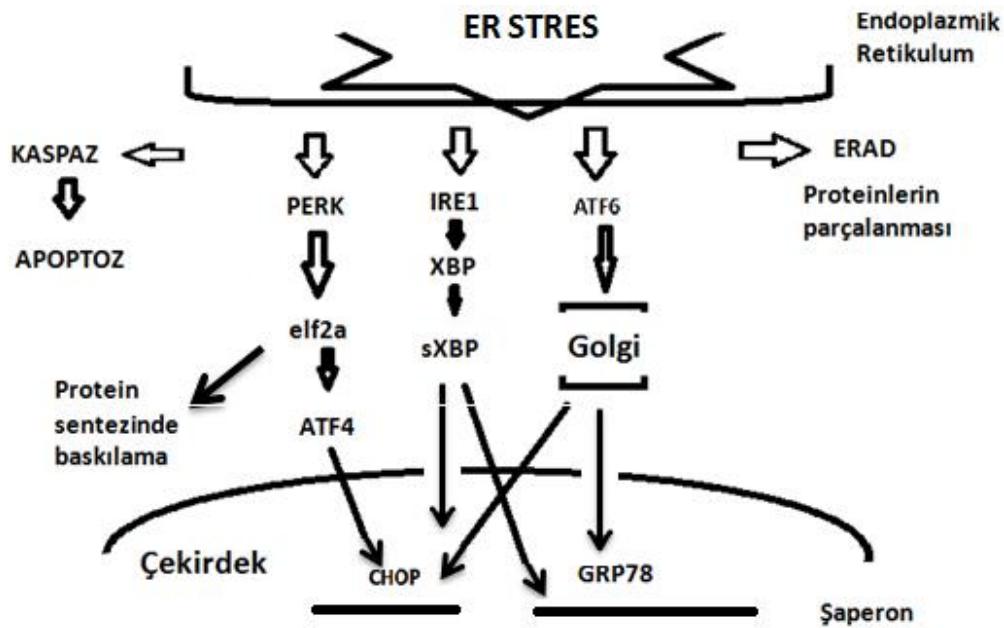
2.2.4. Akut Apendisitın Etiyolojisi ve Patogenezi

Apendiksteki enflamatuvar yanıtın klinik olarak karşılığına AA denir [17]. Enflamasyon ilk apendiks duvarında başlar ve sonrasında lokalize iskemi, perforasyon, abse ve peritonit gelişir [18].

ABD’de yaklaşık 300 bin ve Avrupa topluluğu ülkelerinde yılda yaklaşık 400 bine yakın apendektomi ameliyatı yapılmaktadır [19]. AA görülme yaşı ortalama olarak 31,3 iken en sık görülme yaşı 22’dir [20].

2.3. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Protein katlanmasının yapılandırıldığı en önemli organel (ER)’ dir. Karmaşık yapıya sahip proteinler ER’ de katlanırken, karmaşık yapıya sahip olmayan proteinler stoplazmada katlanır [9]. Proteinler sentezlendikten sonra ER’ ye gelirler. Burada çeşitli düzenlemeler yapıldıktan sonra katlanabilirler. Translasyon sonrası düzenlemelerin birçoğu ER’ de meydana gelir [21]. ER bir kalite-kontrol merkezidir. Birçok çeşit kontrol mekanizmaları vardır. Bunlardan biri protein katlanmasını takip etmek için şeker rezidülerinin ardışık eklenmeleri lektin mekanizması ile kontrol edilerek yapılır [22-24]. ER’ de proteinlerin düzgün katlanmasını sağlayan moleküller şaperon adını alır. Bu proteinler aynı zamanda iyi birer kalsiyum tamponlayıcı proteinlerdir. Çok yoğun şekilde kalsiyuma ihtiyaç duyarlar [25]. Translasyon sonrası düzenlemelerden biri glikozilasyondur. Glikozilasyon proteine hidrofilik bir yapı kazandırarak sudaki çözünürlüğünü artırır. Oligosakkarite şaperon özelliği kazandırılmış olur [26]. Proteinler translasyondan sonra ER’ ye gönderilirler. Burada ancak doğru katlanan proteinler yerlerine ulaştırılmak için golgi cisimciğine gönderilirken katlanmada problemi olanlar ise “ER-aracılı degradasyon” (ERAD) adı verilen bir sistem ile proteozomlarda yıkılmak üzere sitoplazmaya taşınır (Şekil 5). Bu taşıma olana kadar da ER lümeni içerisinde bekletilir [27,28].



Şekil 5. ER Stresi Sonucu Devreye Giren UPR Sistemi

Başlıca elemanları GRP-78, PERK, ATF-4, ATF-6, IRE-1, XBP-1, sXBP-1'dir. UPR ER stresini ortadan kaldırmak için çalışır. Şaperon proteinlerin katlanma ekspresyonlarını artırarak proteinlerin katlanma kapasitelerini artırır. EIF2 α (elongasyon inhibisyon faktörü) aracılığıyla genel protein translasyonunu inhibe eder. ERAD aracılığıyla yanlış katlanmış proteinlerin degradasyonuna öncülük eder. ER stres halen devam eder ve homeostazi sağlanamaz ise hücreler apoptozise yönlendirilir.

Hücreyi strese sevkeden durumlar detaylıca tanımlanmıştır. Redoks tepkilerinde düzensizlikler, plazma kalsiyum seviyesinde dengesizlikler, serum yüksek kolesterol seviyeleri, proteinin sentez aşamasındaki yoğunluğu, glikozilasyon dengesinin bozulması, sebebi belli olmayan ama hücresel stres koşulları proteinin katlanmasında aksaklıklara, hatalı katlanmış proteinlere ve hatalı bir şekilde katlanma proteinlerin ER lümeninde birikmesine sebep olduğu bulunmuştur [26,28]. Besin eksikliği, enfeksiyonlar, genetik mutasyonlar, kalsiyum dengesinin bozulması gibi sebepler hücrede strese sebep olmaktadır. [12]. Hücre bu ve diğer sebebi bilinmeyen sebeplerden kaynaklı stresle karşılaştığında üstesinden gelmek UPR yolğını kullanır.

Bu yolağın başlıca üyeleri devreye girerek durumu düzeltmeye, tekrar iç dengeyi sağlamaya çalışır. UPR' ı indükleyen pek çok fizyolojik ve patolojik durum tanımlanmıştır. Fizyolojik durumlar makrofaj, pankreas beta hücreleri gibi sekretuar hücrelerdir. Patolojik durumlar ise hipoglisemi, iskemi gibi artmış metabolik durumlar, mutasyon ve hepatit-C enfeksiyonu gibi durumlar sayılabilir [12]. Bugüne kadar bilinen üç transmembran protein tanımlanmıştır. [29,30]. Proteinlerin katlanma kapasitesini artıran UPR yolağı aynı zamanda katlanmaya yardımcı üyelerin sentezini artırır. UPR, ER' nin homeostazinin sağlanması için kullandığı yolaktır. [26]. UPR devreye girince önce protein sentezini durdurarak, yükü azaltmaya çalışır [31] [51]. Katlanamayan proteinler yıkıma gönderilirken, yapılan her şeye rağmen iç denge sağlanmaz ise hücre apoptozise yönlendirilir [12]. Nörodejeneratif hastalıklardan Alzheimer ve Parkinson'da agregat birikiminde UPR yolları görev almaktadır [32,33]. Apoptoziste PERK ve IRE1 aktive edilerek, bcl-2 proteini üzerinden "bax" ve "bak" oligomerizasyonuna yol açar [34,35]. UPR aynı zamanda DM' de de rol almaktadır. Üç yoldan en çok PERK etkili olmaktadır. Tip 1 ve tip 2 DM' de ER stresi önemli rol oynamaktadır [36]. Potansiyel kanser tedavisinde PERK ve IRE1 aktivelerinin düzenlenmesi önemlidir [37]. Enflamatuar genlerin ifadelerinde artışa sebep olabilir [38]. Hipoksi UPR yollarını uyarır. PERK yolağının aktivasyonuna yol açar [39]. Serebral iskemide ise ELF2 α fosforilasyonu izlenmiştir [40].

UPR yolları ER' nin karşılaştığı sorunu gideremezlerse ER yükünü azaltmak için katlanamayan proteinleri yıkıma gönderir. Hücre hala dengeyi sağlayamaz ise çevre dokulara hasar vermemek için apoptozise gönderilir [13].

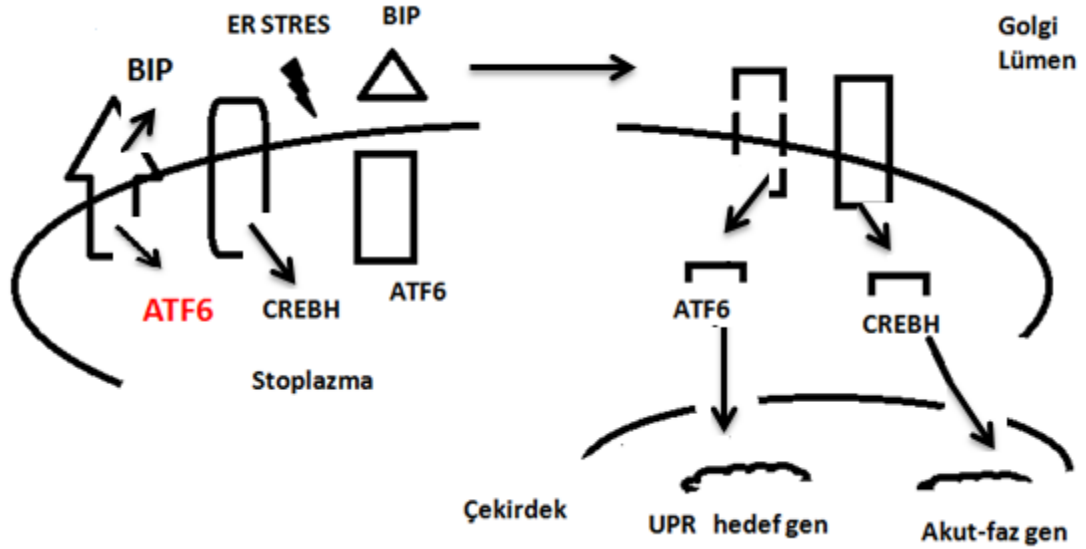
2.3.1. Katlanamamış Protein Sinyal Yolları

ER stresi oluşuktan sonra hücre zarı üzerinde bulunan üç sinyal yolağı devreye girmektedir. Bu yolları şu şekilde sıralayabiliriz. IRE1 α (inositol-requiring1alfa), PERK [double stranded RNA dependent protein Kinase (pkr) like ER Kinase] ve ATF-6 (aktive edici transkripsiyon faktörü 6) adı verilen transmembran proteinleri ile aktive olan UPR yollarıdır. Sensör olarak üç farklı

UPR sensörü varken (Şekil 5), bu proteinlerin aktivasyonlarını düzenleyen BIP (Binding Protein) olarak bilinen tek protein vardır [28].

2.3.1.1. ATF-6 (Activation Transcription Factor 6) Yolağı

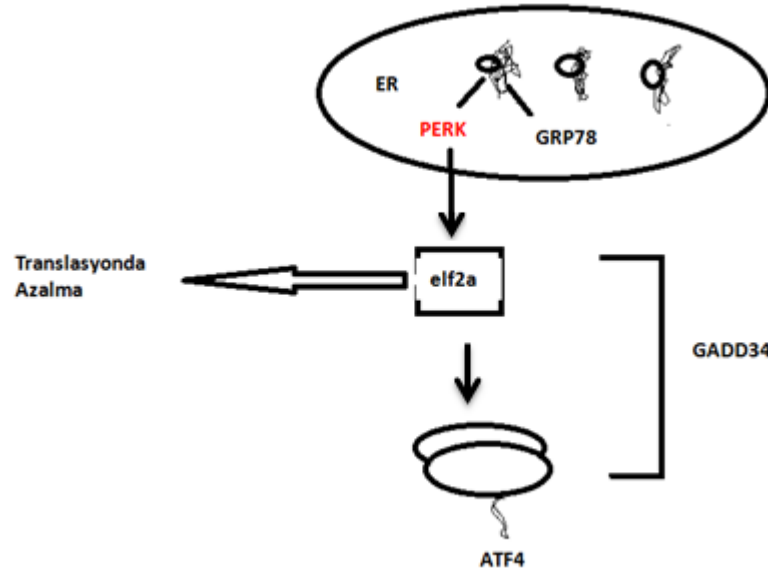
ATF-6, ER membranında hücrede ER stresi olmadığında GRP78 (Binding Protein) ile beraber inaktif şekilde bulunmaktadır. Bir stres durumunda ATF-6 posttranskripsiyonel modifikasyona uğrarken, GRP78 lümeneye katlanmaya yardımcı olmak için gönderilir. Sonuç olarak bu proteinlerin sentezi artar [38,41,42]. ER stresi sonucu ATF-6'nın golgide kırılarak aktive olması gösterilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. ER Stresi Sonucu ATF-6'nın Golgide Kırılarak Aktive Olması

2.3.1.2. PERK Yolağı (PKRK-like ER Kinase)

PERK yolağının stres olmadığı durumda GRP78 ile beraber bulunması molekülün inaktif monomerik durumda kalmasını sağlar [26,38]. Aktive olan PERK, sitoplazmik yüzeydeki kinaz domeini ile ökaryotik translasyon başlatıcı faktör 2 (eIF2)'nin α -alt birimini Ser51 bakiyesinden fosforlayarak inaktive etmektedir [28]. UPR yollarından PERK mekanizması anlatılmaya çalışılmıştır (Şekil 7).

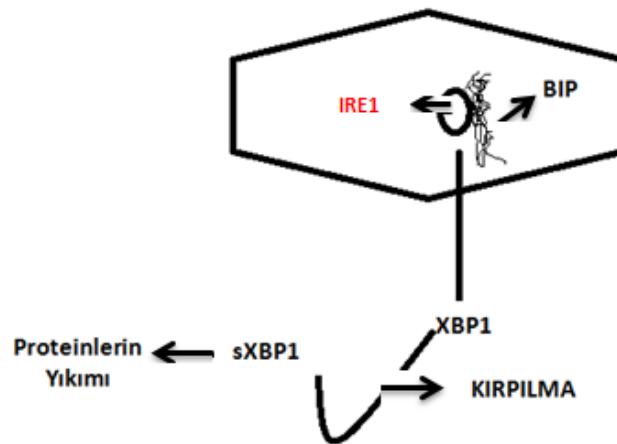


Şekil 7. UPR Yolaklarından Perk Yolağı

Protein Kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK) yolağı, aktive olduktan sonra hücre içerisinde farklı aktivasyonlara neden olmaktadır [11].

2.3.1.3. IRE1 α Yolağı (İnositol-Requirising1 Alfa)

Bu yolağın iki formu vardır. IRE1- α tüm hücrelerde bulunurken β formu ise barsaklarda bulunmaktadır [43]. IRE1'de diğer UPR yolakları gibi aktifleşmek için önce GRP78'den ayrılması gerekir (şekil 8).



Şekil 8. UPR yolağı IRE1

GRP78 ile beraberken inaktiftir. ER stres sırasında GRP78 (BIP) 'in ayrılmasıyla dimerize olur ve otofosforillenir.

2.3.1.4. Binding Immunoglobulin Protein (BIP) (GRP78)

BIP (GRP78) bir ER şaperonudur. UPR yolağının ana düzenleyicisidir [28]. Birçok isimle anılmaktadır. Bunlar; BIP, HSP70 ailesinin bir üyesidir.

BIP stres olmayan koşullarda, ATF-6, PERK, IRE1'in ER lümenine bakan domainlerine de bağlanmaktadır. Lümen içerisinde katlanmamış proteinlerin birikmesi sonucu bu şaperon bağlı olduğu UPR yolaklarından ayrılarak, o yolakların aktive olmalarına izin vermektedir.[28].

2.4. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI

1990'lı yıllarda Clarke tarafından programlı hücre ölüm mekanizmaları üç ayrı kutupta toplanmıştır. Apoptoz, Otofaji, Lizozomal olmayan hücre ölümü olmak üzere üç ayrı şekilde ölüm mekanizması vardır [44].

2.4.1. Apoptoz

Hücrenin kendini yok etmesi anlamına gelen apoptoz, içsel bir programı aktive ederek, ölümün programlı bir şekilde gerçekleşmesidir. Her saniye yüzbinlerce hücre ürerken, bir o kadar da apoptozla ölmektedir [45]. Apoptoz denilince genel olarak bilinen bazı olaylar vardır. Embriyolojik gelişim esnasında parmak aralarının oluşumunda mezenkimal dokunun ölmesi, menstrüal siklus ve menopozda uterusun küçülmesi, üreme organlarının oluşumu, nöronal gelişimin erken evreleri, yaşlanma, immün sistemde B ve T hücrelerinin büyük bir bölümünün yok olması, bağırsak kripta epitelinde sürekli çoğalan hücrelerin kontrolü ve DNA'sı onarılamayan hücreler, zararlı ve hasarlı hücreler [45-49]. Apoptoz belirli bir dengede olmaktadır. Bu dengenin bozulması bazı rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Apoptoz arttığında nörodejeneratif rahatsızlıklar (Alzheimer, Parkinson, Huntington, Amyotrophic lateral sclerosis), AIDS, iskemi, otoimmünite problemler apoptoz az

olduğunda ise kanser, sürekli enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir [49-53]. Apoptoz DNA fragmantasyonu [54] ve bir dizi kaspazın aktivasyonu [55,56] olarak tanımlanmaktadır [57].

2.4.1.1. Kaspazlar

Kaspazların şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptoziste rol oynamaktadır.[58].

Kaspaz 1 (ICE)

Kaspaz 2 (ICH-1, Nedd-2)

Kaspaz 3 (CPP32, Apopain, Yama)

Kaspaz 4 (ICH-2, TX, ICE re1)

Kaspaz 5 (ICE re111, TY)

Kaspaz 6 (Mch2)

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

Kaspaz 8 (FLICE, Mch5, MACH)

Kaspaz 9 (Mch6, ICE-LAP6)

Kaspaz 10 (Mch4)

Kaspaz 11 (ICH-3)

Kaspaz 12

Kaspaz 13 (ERICE)

Kaspaz 14 (MICE)

Kaspazlar aktif bölgelerinde sistein içeren ve substratlarını aspartattan sonra kesen apoptozda rol alan protein ailesi üyesidirler. Kaspazlar proteinlerin degradasyonu, inaktivasyonunu gerçekleştirerek, hücre yapısını bozarak apoptoz da rol oynarlar [59,60].

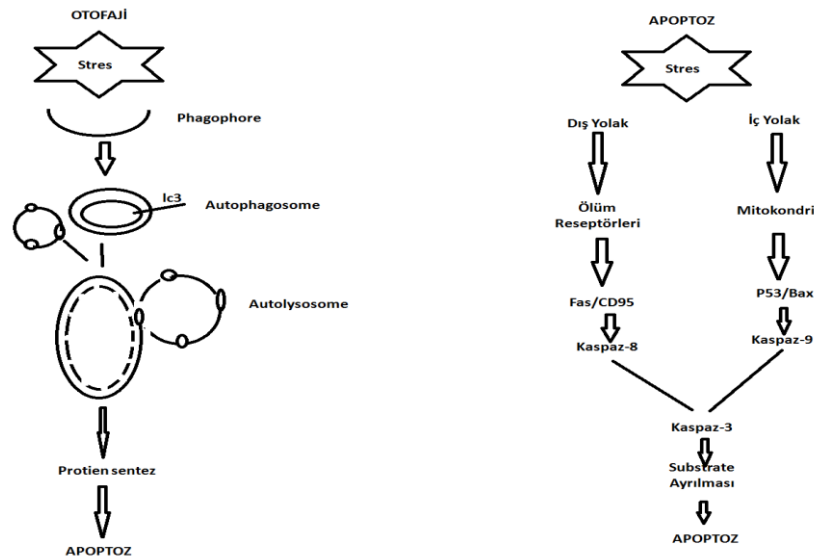
Kaspazlar hücrel proteinlerin degradasyonunu ya da inaktivasyonunu gerçekleştirirler. DNA'yı parçalarlar, nüklear yapıyı bozarlar, hücreyi apoptotik yapılara ayırırlar [51].

Kaspaz 3 apoptoz kaskadında en önemli kaspazdır. Apoptoz bu noktada geri-dönüşümsüz noktadadır [61].

Biz çalışmamızda proapoptotik etkiye sahip Kaspaz 12'yi araştırmayı uygun gördük.

2.4.2. Otofaji

Otofaji kelime anlamı olarak kendi kendini yok etmek, yemek anlamına gelmektedir. Auto (kendisini) ve phagy (yemek) kelimelerinden oluşmaktadır. Hücre hayatta kalmak için açlık gibi bazı koşullarda iç dengesini sağlamak için, hücre içindeki yapıları parçalaması gerekir [62]. Apoptoz ve otofaji arasındaki farklar şekil. 9'da gösterilmiştir [63].



Şekil 9. Otofaji ve Apoptoz Arasındaki Farklar

Otofaji iç dengenin sağlanması için can alıcı bir öneme sahiptir. Bunlar arasında enerji dengesi, gelişme ve hücrel savunma sayılabilir [64,65].

2.3.2.1 .Otofaji Üzerinde Etkili Olan Moleküller:

1. Akt/PKB ve mTor yolağı
2. Bcl-2 ve Bcl-XL
3. Atg4, Atg5 ve Beclin
4. TP53
5. Reaktif oksijen türleri ve Atg4:
6. ARF
7. FADD, Kaspaz 8, FLIP
8. E2F1
9. LCB3

1. Akt/PKB ve mTor yolağı: “GTP-bağlayıcı küçük protein” olan Rheb’in GTP bağlı şekli tarafından düzenlenen mTOR yolağı otofajinin düzenlenmesinde en önemli sensördür. Bu yolak bazı sensör genlerle hem otofajiyi hem de apoptozu düzenlemektedir [66,67].

2. Bcl-2 ve Bcl-XL: Bcl-2 ve Bcl-XL anti-apoptotik proteinler olup, otofajiyi de inhibe etmektedir [68,69].

3. Atg4, Atg5 ve Beclin: Atg4, Atg5 otofaji mekanizmasının temel proteinlerinden olup, beclin-1’in proteolitik olarak kesilmesi apoptotik hücre oluşumunu arttırmaktadır. Kaspaz aktivasyonuna da yol açmaktadır [70].

4. TP53: Tp53’ün işlevini yitirmesi, otofajinin aktivasyonuna yol açmaktadır. Çekirdekte p53 otofajiyi uyarırken, sitoplazma da ise baskılayıcı etkisi görülmüştür [71].

5. Reaktif oksijen türleri ve Atg4: Ros Atg-4 üzerinden otofajiyi düzenlemektedir [72].

6. ARF: Tümör baskılayıcı özelliğe sahiptir. P53 inhibitorunun görevini engellemesiyle, tümör baskılayıcı özelliğini gerçekleştirmektedir [73].

7. FADD, Kaspaz 8, FLIP: Fas (reseptör), FADD (adaptör) kaspaz 8’i içeren ölüm kompleksi (DISC) tarafından yıkıcı (executionary) kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Yapılan çalışmalar, kaspaz 8’in RIP kinazı yıkıma uğratarak bu

yolağı saf dışı bıraktığını göstermiştir. Kaspaz 8'in bloke edilmesi, RIP kinaz tarafından otofajinin uyarılmasına yol açar [74].

8. E2F1: E2F1'nin, p19ARF üzerinden p53'un aktivasyonu ile apoptozu tetiklerken; otofaji genlerinden LC3, Atg1, Atg5, DRAM'ın ifadesini artırarak da otofajiyi indüklediği gösterilmiştir [44,75].

9. LC3: LC3 otofagozom oluşumunda rol oynar. Pek çok molekülle etkileşerek, otofaji ve apoptozda etkilidir. Etkileşime girdiği moleküller arasında E2F1, Atg1, Atg5, DRAM gösterilebilir. Bu moleküllerin ifadesini artırarak, otofajiyi indüklediği gösterilmiştir [44,75].

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, Aralık 2013 (24.01.2014-99950669/119 tarih ve sayılı etik kurul izni ile) - Mart 2014 tarihleri arasında Turgut Özal Üniversitesi Hastanesi Çocuk Cerrahi polikliniğinde veya acil serviste yapılan muayeneler sonucu akut apandisit tanısı konan ve ameliyat edilen hastalardan elde edilen apandisit dokuları kullanılarak, Turgut Özal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı'nda yapıldı. Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2014 yılında operasyon sonucu elde edilen dokular -80 derecede saklanma koşulları yerine getirilerek laboratuvara taşınması yapıldı ve dokuların ER stres, apoptoz ve otofaji markerlarla ilişkisi Western Blot ve İmmünohistokimya yöntemi kullanılarak çalışıldı.

Çalışmamızda Aktin; ATF-6, GRP78, PERK, Kaspaz 12 ve LC3 antikoları ile elde edilen görüntülerin güvenilirliğini doğrulamak amacıyla ve jele yüklenen protein miktarının eşit olduğunun göstergesi olarak internal kontrol olarak kullanıldı. Her bir markerın bant kalınlığının sayı eldesi, Aktin bant kalınlığının sayı eldesine bölünerek Marker/Aktin oranları tespit edildi ve gerek istatistik değerlendirme ve gerekse grafikler, bu oranlar üzerinden oluşturuldu.

Çalışma basamakları sırasıyla aşağıdaki gibi uygulandı:

- Doku izolasyonu
- Dokuların -80 derecede muhafazası
- Dokuların laboratuvara uygun şartlarda taşınması
- Western blot yöntemi
- 1. Yükleme
- 2. Yürütme
- 3. Transfer (Jelden membrana aktarma)
- 4. Antikor ilavesi ve overnight
- 5. Yıkama
- 6. İkinci Antikor ilavesi

7. Yıkama
8. Görüntü alınımı
9. İstatistik

3.1. DENEYDE KULLANILACAK CİHAZLAR

- Scotsman AF80 Buz makinesi (IL, USA),
- Tissue Ruptor, TR12521583, QIAGEN Hilden (Germany),
- VWR advanced VMS-C7 manyetik karıştırıcı (Korea),
- VWR International Vortex (Germany),
- VWR Galaxy Ministar spin arttırıcı (Korea),
- Heidolph Promax 1020 shaker (Germany)
- Himac Microcentrifuge CT 15RE (Japan),
- BIORAD Trans-blot turbo system, 690BR006747, (USA),
- BIORAD Chemidoc MP Görüntüleme Cihazı (USA),
- Sanyo -80 deepfreezer (MDF-U7386S,U5386S)(Japan),
- BIORAD PowerPac Basic (041BR101855)(USA),
- Thermo Scientific Barnstead Easypure II ultra saf su cihazı (USA),
- Techne Dri-Block DB-2D heatblock (UK),
- NÜVE FN032 Dry Heat Sterilizer (Türkiye)
- Thermo Scientific Varioskan (UK).

3.2. WESTERN BLOT

Western Blot; dokudaki spesifik bir proteini analiz etmemizi sağlayan moleküler biyoloji tekniğidir. Bu teknik sayesinde dokuda bulunan bir proteinin varlığı, büyüklüğü, konsantrasyonu, konsantrasyon değişimleri, farklı gruplar

arasındaki konsantrasyonlarının karşılaştırılması vb. araştırılabilir. Araştırdığımız proteini görüntülememizi ve bantlar vasıtasıyla sayısal veriler elde etmemizi sağlayan yöntem western blot denir. Bu tekniği şu şekilde özetleyebiliriz.

1. Total protein izolasyonu
2. Konsantrasyon ölçümü
3. Proteinlerin disülfid bağlarının kırılması
4. Jel hazırlanması (SDS-PAGE)
5. Yükleme
6. Yürütme
7. Transfer (Aktarım)
8. Birinci antikor
9. Yıkama
10. İkinci antikor
11. Yıkama
12. Görüntüleme
13. Analiz

3.2.1. Protein İzolasyonu

İster in vitro (hücre kültürü vb.) ister in vivo (hücre içi) doku içerisindeki proteinleri içeren kısmın diğer kısımlardan ayrıştırılması işlemidir. Kullanılan lizis solüsyonu hücre zarlarını parçalar. Parçalama işleminden sonra hücredeki zarar verici proteazlar ortaya çıkacağından proteinleri bundan korumak için proteaz inhibitör kokteylleri de kullanmak gereklidir. Kullanmada ki amaç yıkım aktivitesini engellemek parçalanmaktan korumaktır. Lizis solüsyonunun proteini açığa çıkarmak, inhibitör kokteylinin görevi ise proteini korumaktır.

İzolasyon Protokolü:

Akut apandisit dokuları muhafaza edildikleri yer olan -80°C 'den çıkarılır. Daha sonra dokunun yapısına bağlı birkaç kez phosphate-buffered saline (PBS) ile yıkanır. Yıkama sonrası doku parçalara ayrılır. Parçalanan dokular ependorfa alınır. Santrifüj de yıkama işlemi yapılır. Proteinlerin yapılarının bozulmaması için tüm basamakların dikkatli bir biçimde buz üzerinde yapılması sağlanır. Süpernatant atılır. Pelet kısmı alınır.

Parçalanmış ve çöktürülmüş dokulara (pellet), lizis solüsyonu ve proteinaz inhibitörü belirli oranlarda ilave edilir.

Bu solüsyonlar belirli oranlarda ilave edildikten sonra yaklaşık yarım saat beklenir. Solüsyonların etki yüzeyini artırmak için belirli aralıklarla vortekslenir.

3.2.2. Protein Miktar Tayini

Elde ettiğimiz proteinlerin konsantrasyonlarını ölçeriz. Öncelikle hazırladığımız bir standart proteinimiz vardır. Biz genellikle BSA (Bovine Serum Albumine) proteinini kullanırız. Standartlarımız ve proteinlerimizi bir belirteç reaksiyonu ve oluşan tepkimenin spektrofotometrik cevabına göre belirlenmesi prensibine dayanır. Belirli değerler elde ederiz. Daha sonra bu konsantrasyon değerlerinden proteinimizin konsantrasyon yoğunluğuna bağlı olarak yükleyeceğimiz mikrolitre başına kaç mikrogram protein yükleyeceğimizi hesaplarız. Daha sonrada bu proteinleri belirli bir miktara göre eşitler ve çalışmamıza kaynatma işlemi ile devam ederiz.

3.2.3. Kaynatma

Kaynatma işlemindeki amaç proteinlerin disülfid bağlarını kırarak lineer hale getirmektir. 95°C 'de 7dk kaynatma yapılmalıdır. Kaynatma yapılacak olan heat blokta tam olarak sıcaklığa ulaştığından emin olunmalıdır.

3.2.4. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamid Jel Elektrofrez)

Buradaki amaç belirli akım dahilinde elde edilen proteinlerin ayrışmasını sağlamaktır. Burada mekanizma kimyasal bir reaksiyona dayanır. Etrafı eksi yüklerle sarılan proteinler elektrik akımı verilince pozitif kutba doğru koşarlar. Binlerce protein bu şekilde moleküler ağırlık ve elektrik yükü gibi faktörler nedeniyle birbirinden ayrılır.

SDS: Proteinlerin etrafında negatif yük katmanı oluşturur. Böylece tüm proteinlerin aynı hızda jelde hareket etmesini sağlar.

PAGE: Jel ortam proteinlerini ayrıştırmaya yarar.

APS: Poliakrilamid jel yapımında akrilamid polimerizasyonunu katalize etmek için kullanılır. APS reaksiyon başlatıcıdır. APS taze olarak hazırlanır.

TEMED: Polimerizasyonu başlatan APS dir. Katalizör ise TEMED' dir.

Bisakrilamid: Hazırlayacağımız jelin iskeletini oluşturacaktır. Por çapı küçük olduğundan proteinlerin daha iyi bir şekilde yürümesini sağlar.

Tris: bir tampondur. Jel iki kısımdan (running jel ve stacking jel) oluştuğu için iki farklı molarite ve pH' da hazırlanır ve kullanılır.

Jel dökme aparatını hazırladıktan sonra; yukarıdaki sırayı takip ederek hazırladığımız Running jel, (TEMED polimerize etmeden yani donmadan) çabucak (biri kalın diğeri ise ince camdır ve bunların arası 1 mm' dir) içine pipetlendi ve üzerine izopropanol ilave edilerek hava ile temasını kesildi (böylece polimerizasyon en iyi şekilde sağlanmış oldu). Aynı zamanda izopropanol (alkol), jelde oluşan dalgalanmaları yok ettiğinden düz bir hat halinde jelin polimerleşmesi sağlandı. Bu sayede proteinlerin aynı seviyeden yürümeye başlaması ve aynı kDa'a sahip bantların, aynı hızda olması sağlanmış oldu. Polimerleşme tamamlandıktan sonra üstteki izopropanol döküldü.

Aynı bir falkonda stacking jel; kimyasallar aynı şekilde yukarıda belirtilen sıraya göre pipetlenerek hazırlandı. Running jelin üzerine stacking jel hızlıca pipetlendi. Aktarım tamamlanır tamamlanmaz jel tarağı dikkatlice iki cam arasına

yerleştirildi. Jelin tam olarak donması beklendi. Jel donduğunda polimerizasyon bitmiş ve jel protein yüklemeye hazır hale gelmiş oldu.

3.2.5. Yükleme

Elektroforez tankının içerisi, yarısına kadar running buffer' la doldurulduktan sonra; biraz önce hazırladığımız jel tanka yerleştirildi.

Daha önce yüklemeye hazır hale getirdiğimiz örneklerimizin her birinden 12'şer µl olacak şekilde jelin kuyucuklarına tek tek yüklendi. Yürütülen proteinlerin kaç kDa olduğunu anlamak için marker yüklemesi yapıldı ve bunun için bir kuyucuğa 2,5 µl marker konuldu. Jel yükleme tankı önce 100 V, 120 dakikaya ayarlandı.

3.2.6. Transfer İşlemi

Her bir whatman kâğıdı ve nitroselüloz membran öncelikle transfer solüsyonu içerisinde iyice ıslatıldıktan sonra; sırasıyla en alta 2 adet whatman kâğıdı, üzerine nitroselüloz membran, sonra jel ve en üste tekrar 3 adet whatman kâğıdı konularak transfere hazır hale getirildi ve transfer cihazına yerleştirildi. Transfer işlemi 33 dk boyunca; 25 Volt, 1.5 Amper olarak ayarlandı.

Transfer cihazı; – yükten + kutba doğru elektrik akımı vererek proteinlerin jelden membrana geçmesini sağlar. Böylelikle jeldeki proteinler daha sağlam ve daha rahatça kullanılabilir bir membrana emdirilmiş olur. Tekniğin adına bu nedenle blotlama denilmiştir.

3.2.7. Bloklama

Membran üzerindeki nonspesifik bağlanma bölgelerinin bloke edilmesi, membranda bulunan proteinlerin sabitlenmesi ve membranın arka yüzünün beyaz veya temiz olması için de mutlaka yapılması gereken bir basamaktır. Bu amaçla süt tozu bovin serum albümin (BSA) kullanıldı. Membran üzerine dökülen %2.5' luk süt tozu ile shaker üzerinde 1 saat ya da 40'dk bloklama yapıldı.

3.2.8. Birinci Antikor (1. Ab)

ATF-6, GRP78, PERK, Kaspaz 12 ve LC3 birinci antikorlarımızı oluşturmaktadır. Çalışılan bu membranların internal kontrol çalışması Aktin ile yapılmıştır. Her Ab için de; 3 ml %2.5' luk süt tozuna 0.3 µl Ab eklendi böylece 1/1000 lik Ab elde edildi. Membran bir kaba konulup, 1/1000' lik Ab solüsyonu membranın üzerine döküldü. Membranın yüzü 1. Ab ile temas edecek şekilde +4 °C' de soğuk odada bir gece shaker üzerinde beklemeye bırakıldı. Ertesi gün antikor tekrar pipetle alınarak başka çalışmalarda tekrar kullanmak üzere +4 °C' ye kaldırıldı. (Not: En fazla üç çalışma için tekrar kullanılabilir).

3.2.9. İkinci Antikor (2. Ab)

Ertesi gün membranlarımız 3 kez 10'ar dk TBS-T ile yıkandıktan sonra membranın üzerine ikinci antikorumuz ilave edildi. %2.5'luk süt tozunda 1/4000 oranında 2. Ab olan; ATF-6, GRP78, PERK, Kaspaz 12 ve LC3 için Rabbit (sc) ve Aktin için ise Mouse (sc) eklendi ve oda sıcaklığında shakerda 1 saat inkübe edildi. Bir saat sonra membran TBS-T ile 3x6 dk yıkandı.

3.2.10. ECL solüsyonu ile görüntüleme

Görüntüleme aşamasına geçildi. 350µl Lumi A ve 350 µl Lumi B (ECL) streç film üzerine pipetlendi. Membranın ön yüzü ECL solüsyonuyla tam temas edecek şekilde 5dk. bekletildikten sonra görüntüleme yapıldı ve elde edilen sonuçlar kaydedildi.

Tablo 1. ATF-6'nin Western blot bant yoğunluğunun sayısal olarak ifadeleri

HASTA SAYISI (n=14)	GRUP	<u>ATF-6*</u> <u>90 kDa</u>	<u>AKTİN</u>	<u>ATF-6/AKTİN**</u>	<u>ATF-6</u> <u>75 kDa</u>	<u>AKTİN</u>	<u>ATF-6</u> <u>75 kDa/Actin</u>
1	A1	281296	10987504	0.0256	105754	10987504	0.009
2	A2	300368	10188822	0.029	371260	10188822	0.036
3	A3	249440	12022185	0.020	329555	12022185	0.027
4	A4	367568	11706576	0.0313	304665	11706576	0.026
5	A5	446512	8400942	0.053	208411	8400942	0.024
6	S2	288176	10954545	0.026	278958	10954545	0.025
7	S3	158208	10521880	0.015	492784	10521880	0.046
8	S4	251648	10014340	0.025	260281	10014340	0.025
9	S5	332448	12212680	0.027	213142	12212680	0.017
10	G1	371472	9683084	0.038	277932	9683084	0.028
11	G2	866432	8839740	0.09	165490	8839740	0.018
12	G3	503216	9855504	0.051	84873	9855504	0.086
13	G4	350432	11153360	0.031	142861	11153360	0.012
14	G5	253888	8548974	0.029	127490	8548974	0.014

(*): protein düzeyinin dansitometrik bant yoğunluğunun sayısal değerleri

(**): protein düzeyinin, Aktin protein düzeyine oranının relatif değerleri

(Not: Veri elde edilemeyen dotalar ND (not determined) olarak ifade edildi. Deneyde veri elde edilememesinin nedenleri arasında; örneklerin transport zincirine dikkat edilmesine rağmen yapısının bozulabilir olabilmesi, aynı örneğin ardı ardına çalışmalarda -80 derece (saklanma) ile buz soğukluğu (çalışma esnasında) arasındaki ısı farkından dolayı proteinlerinin denatüre olabilmesi, Western blotun her bir basamağında kullanılan cihaz, materyal ve kimyasalların bileşenleri ile ilgili aksaklıklar sayılabilir.)

Tablo 2. PERK ve GRP78'in Western blot bant yoğunluğunun sayısal olarak ifadeleri

HASTA SAYISI (n=14)	GRUP	PERK*	AKTİN	PERK/AKTİN**	GRP-78*	AKTİN	GRP-78/Actin**
1	A1	18354800	12522005	1,46	611457	7934628	0,07
2	A2	13666840	11895660	1,14	1146669	9458200	0,121
3	A3	16393839	12609240	1,30	1778004	6679664	0,266
4	A4	13865943	10875870	1,27	46848	3481141	0,013
5	A5	11638578	7702530	1,51	277008	3794576	0,07
6	S2	16633782	12124182	1,37	460592	9439616	0,048
7	S3	13868689	9315947	1,48	185776	5891152	0,031
8	S4	17531756	11717118	1,49	1630752	11132624	0,146
9	S5	14548548	12688440	1,14	234304	6223152	0,037
10	G1	13111580	10484903	1,25	265648	9601472	0,027
11	G2	10017636	8386002	1,19	105808	4636704	0,022
12	G3	8162040	8980483	0,90	13888	5272048	0,002
13	G4	15165303	10186134	1,48	4623894	5969216	0,774
14	G5	13943244	10078272	1,38	1380272	5841888	0,236

(*): protein düzeyinin dansitometrik bant yoğunluğunun sayısal değerleri

(**): protein düzeyinin, Aktin protein düzeyine oranının relatif değerleri

(Not: Veri elde edilemeyen datalar ND (not determined) olarak ifade edildi. Denejde veri elde edilememesinin nedenleri arasında; örneklerin transport zincirine dikkat edilmesine rağmen yapısının bozulabilir olabilmesi, aynı örneğin ardı ardına çalışmalarda -80 derece (saklanma) ile buz soğukluğu (çalışma esnasında) arasındaki ısı farkından dolayı proteinlerinin denatüre olabilmesi, Western blotun her bir

basamağında kullanılan cihaz, materyal ve kimyasalların bileşenleri ile ilgili aksaklıklar sayılabilir.)

Tablo 3. Kaspaz 12 ve LC3'ün Western blot bant yoğunluğunun sayısal olarak ifadeleri

HASTA SAYISI (n=14)	GRUP	<u>KASPAZ-1*</u>	<u>AKTİN</u>	<u>KASPAZ-1/AKTİN**</u>	<u>LC3*</u>	<u>AKTİN</u>	<u>LC3/Actin**</u>
1	A1	228718	8466238	0,027	466336	3330331	0,140
2	A2	139281	6712569	0,020	336816	5410278	0,062
3	A3	261681	7839652	0,033	548560	7658684	0,071
4	A4	40817	3660933	0,011	230544	3905424	0,059
5	A5	47991	3484303	0,013	270096	4315033	0,062
6	S2	659804	5305819	0,124	478528	6531420	0,07
7	S3	116688	2792488	0,041	459216	4773741	0,096
8	S4	429641	5835097	0,073	937072	5280000	0,177
9	S5	470662	3871971	0,121	331424	5323216	0,062
10	G1	149583	3470448	0,043	185792	2587808	0,071
11	G2	291499	2698665	0,108	139456	4285666	0,03
12	G3	43095	3464192	0,012	97152	5546754	0,0175
13	G4	1076032	3093643	0,347	235264	6699740	0,035
14	G5	393822	6953527	0,056	404288	5975220	0,067

(*): protein düzeyinin dansitometrik bant yoğunluğunun sayısal değerleri

(**): protein düzeyinin, Aktin protein düzeyine oranının relatif değerleri

(Not: Veri elde edilemeyen datalar ND (not determined) olarak ifade edildi. Deneyde veri elde edilememesinin nedenleri arasında; örneklerin transport zincirine dikkat edilmesine rağmen yapısının bozulabilir olabilmesi, aynı örneğin ardı ardına çalışmalarda -80 derece (saklanma) ile buz soğukluğu (çalışma esnasında) arasındaki

ısı farkından dolayı proteinlerinin denatüre olabilmesi, Western blotun her bir basamağında kullanılan cihaz, materyal ve kimyasalların bileşenleri ile ilgili aksaklıklar sayılabilir.)

3.3. İMMÜNOHİSTOKİMYA

Hücre ve doku içinde bulunan bazı enzimlerin ya da makromoleküllerin lokalizasyonlarını incelemeye yardımcı olur. Sistem incelenecek olan bir makromeleküle karşı geliştirilmiş olan bir antikorun ortaya konulmasıdır. Dokuda saptanmaya çalışılan protein antijen, bu proteinin saptanması için yararlanılan protein ise antikordur. İşaretlenmeye çalışılan proteinin tam olarak dokunun neresinde olduğunu gösterebilen avantajlı bir yöntemdir.

İmmünohistokimya yapılırken aşağıdaki sıra takip edilir.

1. TESPİT
2. ŞEFFAFLAŞTIRMA
3. GÖMME
4. KESME
5. BOYAMA
6. SCORLAMA

3.3.1 Tespit

Dokuların canlılıklarını korumak için, vücut ph'sına en yakın fiksatif olan ph'ı 7.4 olan fiksatif kullanılarak tespit edildi. Dokuları tespit etmek için pek çok fiksatif vardır. Bunlar arasında; formalin, tamponlanmış nötral formalin, Carnoy, Zenker, Bouin ve alkol-formol karışımlarıdır. Fiksatif solüsyonlarının vücut ph'sına yakın ve izotonik olması beklenir. Bu fiksatifler; dokudaki kokuşmayı önleyebilmeli, dokuyu sertleştirmeli ve boya elemanlarına karşı dokunun affinitesini arttırmalıdır. Bizde akut apandisit dokularımızı formal fiksatif solüsyonuyla tespit etmek amacıyla formalinde beklettik.

3.3.2 Şeffaflaştırma

Dokuların kesilebilir sertliğe getirilebilmeleri için doku suyunun uzaklaştırılmaları gerekir. Bunun için alkol, aseton, diakson gibi su çekici maddeler kullanılır. Biz çalışmamızda alkol serilerini kullandık. Rutin olarak da en fazla alkol serileri kullanılmaktadır. %50'dan %100'e kadar değişen etil alkol su karışımlarının kullanılması ile doku suyu ile etil alkolün yer değiştirilmesi ve dokunun sertleştirilmesi sağlanır.

3.3.3. Parafin Eldesi

Dokularımızı gömme işlemine hazır etmek için ksilol kullandık. Genellikle gömme maddeleri alkol ile yer değiştiremezler. Bu sebeple, sudan kurtarma ile gömme işlemi arasında hem alkol hem de gömme maddesi ile yer değiştirme özelliğindeki ksilol, tolüen ve benzen gibi maddelerin kullanıldığı bir basamak işlem yapılır. Böylece dokudaki alkol şeffaflaştırıcı madde ile yer değiştirerek dokularımız gömme işlemine hazırlanmış olur. Öncelikle doku parçaları 80°C'lik ısıdaki etüvde üç ayrı kapta eriyik parafin içine konularak ksilenin yerine parafin girmesi sağlanır. Daha sonra ayrı bir kapta eritilmiş olan parafin, bloklar içine dökülüp doku parçaları yerleştirilir. Böylece uzun süreli saklanabilen ve dokuların kolay ve uygun şekilde kesilmesini sağlayan bloklar elde edilir.

3.3.4 Kesit Alma

Dokuların mikroskop altında incelenebilmeleri ışığa geçirecek derecede ince olmalarına bağlıdır. Bunun için 3,5-5 µm'lik kesitler uygundur. Mikrotom ile elde edilen kesitler önce 40-50 °C'lik su banyosuna atılarak kırışıklıklarının giderilmesi ve bir miktar parafinin uzaklaştırılmasını sağladık. Su banyosunda ısı etkisiyle açılan doku parçaları lam üzerine alınır. Su banyosunda ısı etkisiyle açılan doku parçaları lam üzerine alınır. Boyanmamış doku elemanları renksizdir ve detaylar ayırt edilemez. Farklı morfolojik elemanların ışık mikroskopunda ayırt edilebilir hale gelmesi için dokuların boyanması gereklidir

3.3.5 Boyama

Boyama işlemine geçmeden önce parafinin uzaklaştırılması ve dokunu yeniden rehidrate edilmesi gereklidir. Parafinin uzaklaştırılması için dokular önce birkaç kaptaki ksilol içerisinde geçirilir; rehidratasyon için de %100'lük alkolden başlayıp %30'a inen alkol serilerinden geçirilip suya alınır. Rehidre olmuş olan dokularımızın antikor ve diğer solüsyonların absorbe olması için epitoplara açılması gerekir. Bunun için ph:6 (ABCAM) olan citrate buffer ve ph:8 (ABCAM) olan edta buffer kullanılır. 120°C'lik etüvde antijenlerin antikorla birleşme yeri olan epitoplara açılması gerekir. Daha sonra etüvden çıkardığımız dokular soğumaya alınır. Epitop açma işlemi mikrodalgada da yapılabilir. Ancak dokulara zarar gelebilir.

Dokuların kurumamasına çok dikkat edilir. Epitoplara açılmış olan dokularımızın yabancı pozitifliklerini engellemek için hidrojen peroksitaz (H_2O_2) (ABCAM) ile blokaj yapılır. Daha sonra pbs'de (ph:7.6) (ABCAM) yıkama yapılır. Takiben proteinlerin istenmeyen bölgelerinin kapanması için bloke edilmesi gerekir. Protein blok (ABCAM) ile blok yapılır. Antikor muamele işlemine geçilir. Bu antikorlar ATF-6, GRP78, PERK, Kaspaz 12 ve LC3 ilave edilir. Overnight'a bırakılır. Ertesi gün, pbs ile (ph:7.6) yıkama yapılır. Poliklonal bir deney olan immünohistokimyasal boyama işlemi için 2 farklı ikinci antikor kullanılır. Birinci ikinci antikor complement (ABCAM) ilave edilir. Bir müddet sıcak su inkübasyonuna bırakılır. Daha sonra diğer ikinci antikor olan HRP conjugate (ABCAM) ilave işlemi yapılır. Pbs ile (ph:7.6) yıkama yapılır. Sonrasında mayers/harris hematoksilen (ABCAM) ile çekirdek boyaması yapılır. Alkol serileri ile su kaybı geri kazandırılarak, kapama işlemiyle preparatlarımızın fotoğraflarını alırız (Leica). Histolojide doku elemanlarını boyamak için pek çok teknik vardır. En çok kullanılan Hematoksilen-eozin boyama yöntemidir. Bu yöntem ile nükleus mavimor, sitoplazma pembe-kırmızıya boyanır. Ayrıca periyodik asit-Schiff (PAS), Van Gieson, Masson trikrom, Mallory Azan boyaları sıklıkla kullanılmaktadır.

4. BULGULAR

4.1. WESTERN GÖRÜNTÜLEME

Çalışmamızda 3 farklı hasta grubu vardı. Bu gruplar Akut, supuratif ve gangrenöz grupları olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Akut grubunda A1, A2, A3, A4, A5 olmak üzere 5 hasta, supuratif grubunda S2, S3, S4, S5 olmak üzere 4 hasta ve gangrenöz grubunda G1, G2, G3, G4, G5 olmak üzere 5 hasta grubu vardı. Hasta gruplarımızı western blot çalışması yaparken aşağıdaki sıralama ile yükledik.

Akut Grubu: A1, A2, A3, A4, A5

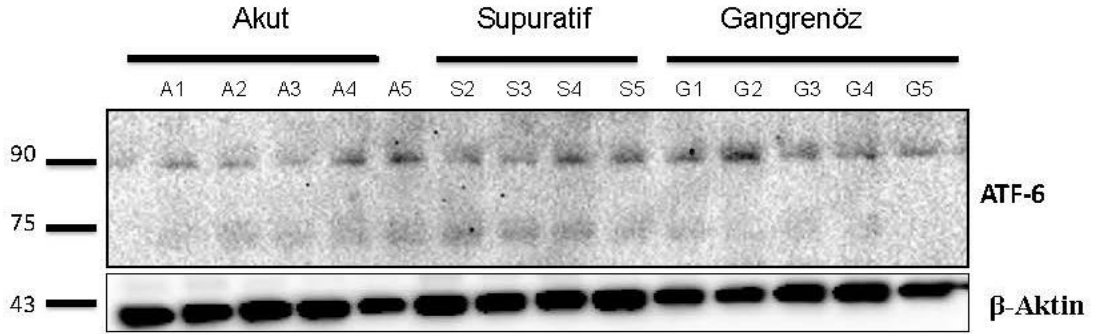
Supuratif Grubu: S2, S3, S4, S5

Gangrenöz Grubu: G1, G2, G3, G4, G5

Yaptığımız hesaplamalar doğrultusunda her bir kuyucuğa 13 µl yükledik .ve 15µg protein yüklemiş olduk. Markerı ise 2.5 µl yükledik. Aşağıda ise ATF-6, PERK, LC3, GRP78, ve Kaspaz 12 proteinlerinin western blot sonuçları yer almaktadır.

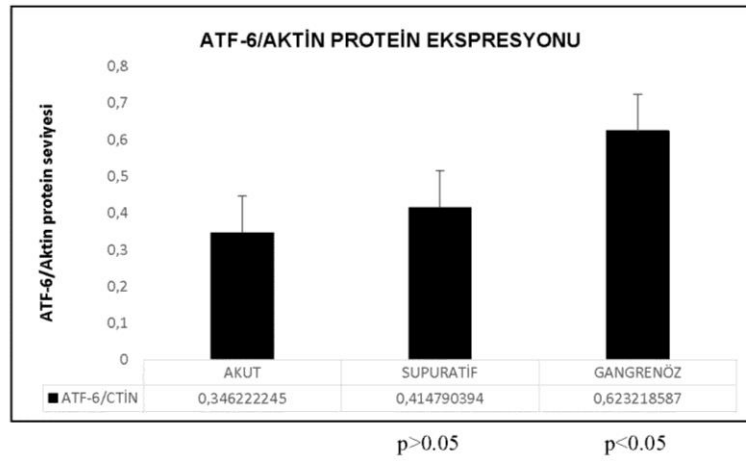
4.1.1. ATF-6

ATF-6 antikorunun 90 kDa'da ATF-6 yürüme bandı görüntüsü elde edildi. ATF-6 western blot görüntüleme sonucu ve aynı proteinlerin Aktin ile doğrulanma (internal kontrol) görüntüsü aşağıda örnek bir membran üzerinde Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. ATF-6'nın Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü
ATF-6/Aktin

ATF-6 WESTERN BLOT SONUÇLARI



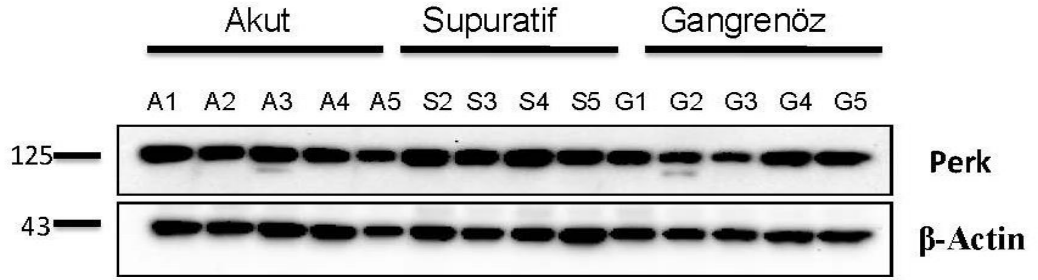
Grafik 1. ATF-6'nın Aktin ile Birlikte Western Blot Grafik Görüntüsü

Apendisit dokularında ATF-6 antikorunun uygulanması sonrası ATF-6/AKTİN ekspresyon sonuçları (n=3). ER stres markerı ATF-6'nın apandisit dokularına uygulanması sonrası gangrenöz grubu, akut grubu ile kıyaslandığında anlamlı sonuç elde edilirken, akut grubu ile supuratif grubu kıyaslandığında ise anlamlı sonuç elde edilememiştir.

4.1.2. PERK

PERK antikorunun 125 kDa'da PERK yürüme bandı görüntüsü elde edildi. PERK western blot görüntüleme sonucu ve aynı proteinlerin Aktin ile doğrulanma

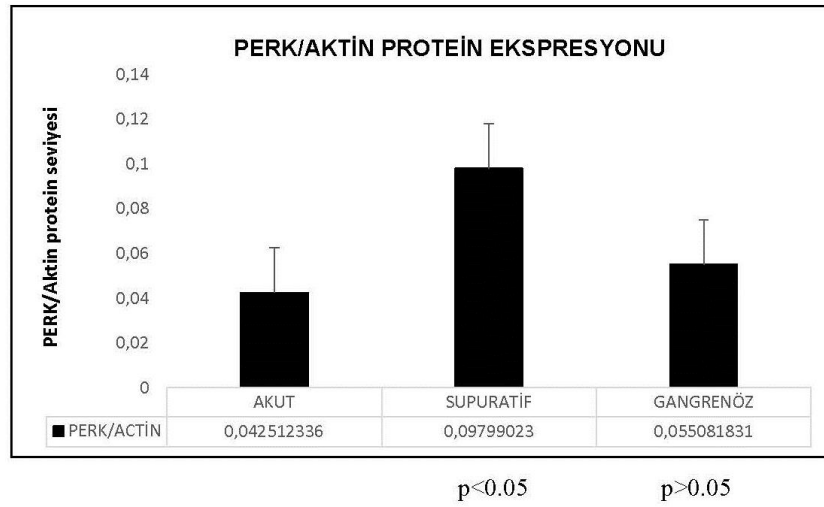
(internal kontrol) görüntüsü aşağıda örnek bir membran üzerinde Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11. PERK’in Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü

PERK/Aktin

PERK WESTERN BLOT SONUÇLARI

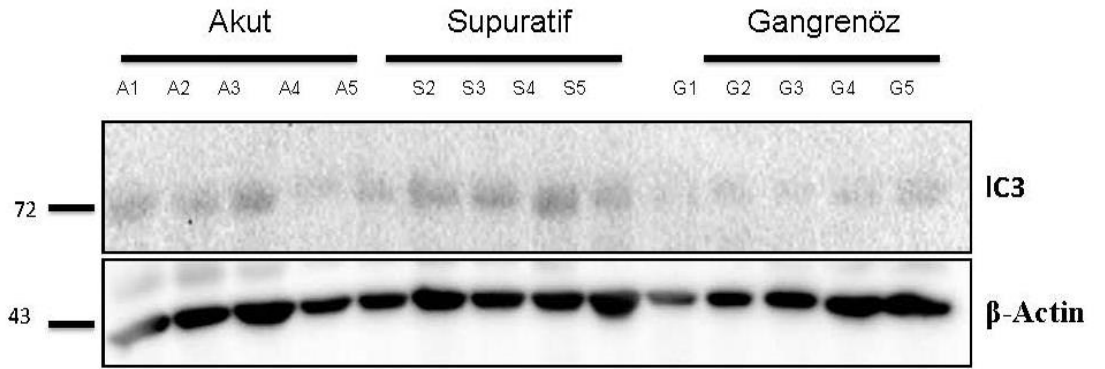


Grafik 2. PERK’in Aktin ile Birlikte Western Blot Grafik Görüntüsü

Apendisit dokularında PERK antikorunun uygulanması sonrası PERK/AKTİN ekspresyon sonuçları (n=3). ER stres markerı PERK'in apandisit dokularına uygulanması sonrası gangrenöz grubu, akut grubu ile kıyaslandığında anlamlı sonuç elde edilmez iken, akut grubu ile supuratif grubu kıyaslandığında ise anlamlı sonuç elde edilmiştir.

4.1.3. LC3

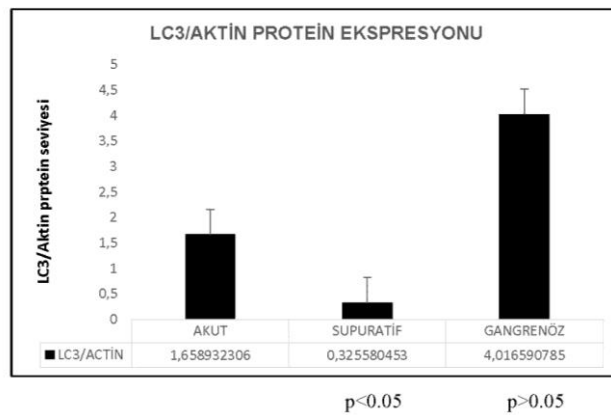
LC3 antikorunun 72 kDa'da LC3 yürüme bandı görüntüsü elde edildi. LC3 western blot görüntüleme sonucu ve aynı proteinlerin Aktin ile doğrulanma (internal kontrol) görüntüsü aşağıda örnek bir membran üzerinde gösterilmiştir. (Şekil 12)



Şekil 12. LC3'ün Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü

LC3/Aktin

LC3 WESTERN BLOT SONUÇLARI

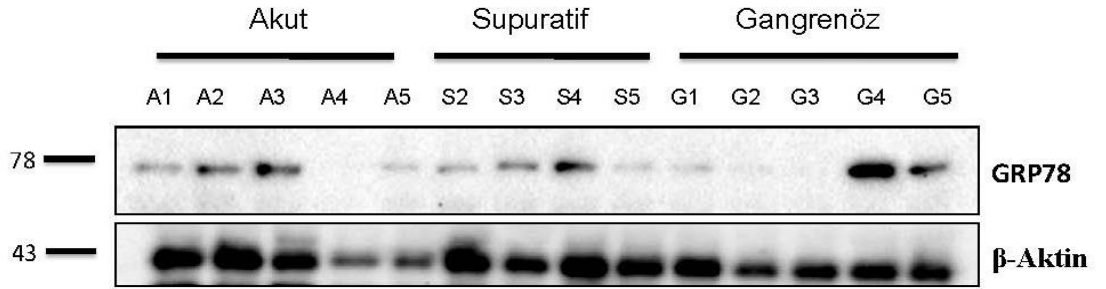


Grafik 3. LC3'ün Aktin ile birlikte western blot grafik görüntüsü

Apendisit dokularında LC3 antikorunun uygulanması sonrası LC3/AKTİN ekspresyon sonuçları (n=3). ER stres markerı LC3' ün apandisit dokularına uygulanması sonrası gangrenöz grubu, akut grubu ile kıyaslandığında anlamlı sonuç elde edilmez iken, akut grubu ile supuratif grubu kıyaslandığında ise anlamlı sonuç elde edilmiştir.

4.1.4. GRP78

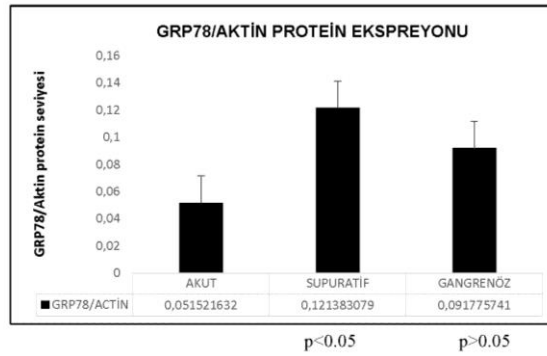
GRP78 antikorunun 78 kDa' da GRP78 yürüme bandı görüntüsü elde edildi. GRP78 western blot görüntüleme sonucu ve aynı proteinlerin Aktin ile doğrulanma (internal kontrol) görüntüsü aşağıda örnek bir membran üzerinde Şekil 13'de gösterilmiştir.



Şekil 13. GRP78'in Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü

GRP78/Aktin

GRP78 WESTERN BLOT SONUÇLARI

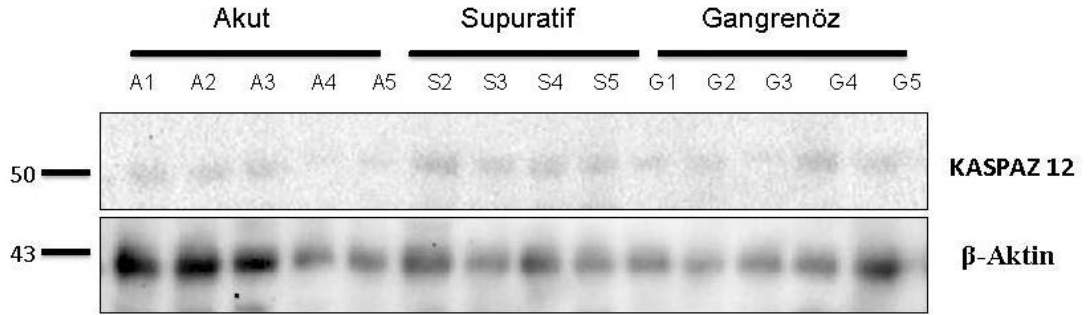


Grafik 4. GRP78'in Aktin İle Birlikte Western Blot Grafik Görüntüsü

Apendisit dokularında GRP78 antikorunun uygulanması sonrası GRP78/AKTİN ekspresyon sonuçları (n=3). ER stres markerı GRP78'in apandisit dokularına uygulanması sonrası gangrenöz grubu, akut grubu ile kıyaslandığında anlamlı sonuç elde edilmez iken, akut grubu ile supuratif grubu kıyaslandığında ise anlamlı sonuç elde edilmiştir.

4.1.5. Kaspaz 12

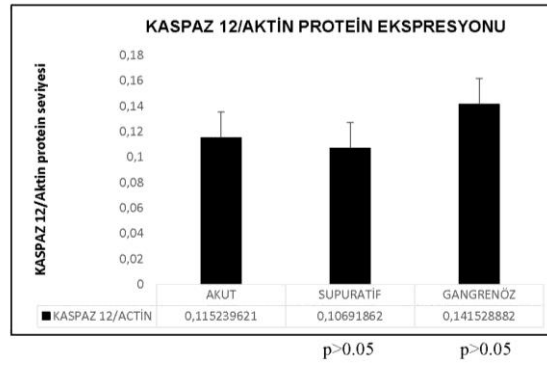
Kaspaz 12 antikorunun 50 kDa'da Kaspaz 12 yürüme bandı görüntüsü elde edildi. Kaspaz 12 western blot görüntüleme sonucu ve aynı proteinlerin Aktin ile doğrulanma (internal kontrol) görüntüsü aşağıda örnek bir membran üzerinde Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 14. Kaspaz 12'nin Aktin İle Birlikte Western Blot Bant Görüntüsü

Kaspaz12/Aktin

Kaspaz 12 WESTERN BLOT SONUÇLARI



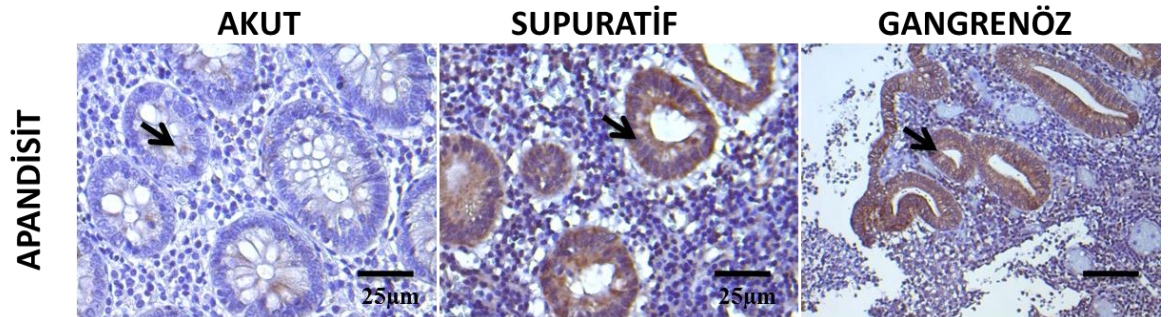
Grafik 5. Kaspaz 12'nin Aktin ile birlikte western blot grafik görüntüsü

Grafik 5. Kaspaz 12'nin Aktin İle Birlikte Western Blot Grafik Görüntüsü

Apendisit dokularında Kaspaz 12 antikorunun uygulanması sonrası Kaspaz 12/AKTİN ekspresyon sonuçları (n=3). ER stres markerı Kaspaz 12'nin apandisit dokularına uygulanması sonrası gangrenöz, akut ve supuratif grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

4.2. İmmünohistokimya Boyama Sonuçları

4.2.1. ATF-6



Şekil 15. ATF-6 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları

ATF-6'nın apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında oklarla glandlerdeki pozitiflikleri görmekteyiz.

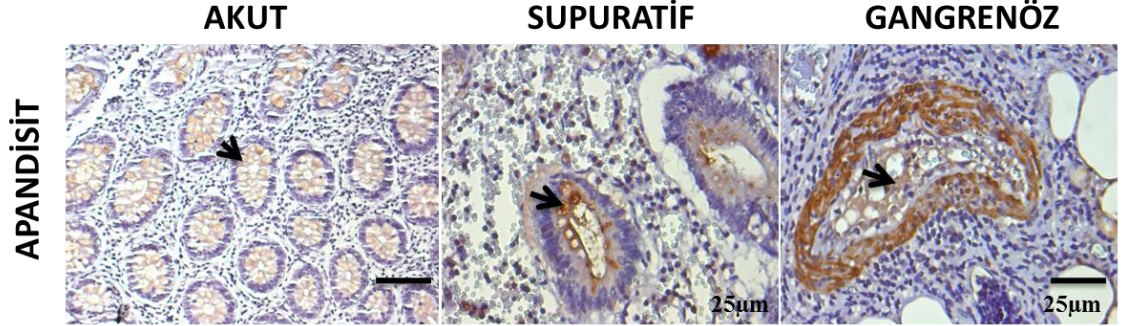
ATF-6'nın apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları kıyaslandığında pozitiflik giderek artmakta olduğunu görmekteyiz. Oklarla pozitiflikleri görmekteyiz. (40X)

Tablo 4. ATF-6'nın apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama skor sonuçları

	HASTA 1	HASTA 2	HASTA 3	ORTALAMA DEĞER
AKUT	0	2	1	1
SUPURATİF	4	2	3	3
GANGRENÖZ	4	3	4	3,6

Grade 0: <5% ; Grade 1: >5% ; Grade 2: >25% ; Grade 3: >50% ; Grade 4: >75%

4.2.2 .PERK



Şekil 16. PERK İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları

PERK'in apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında oklarla glandlerdeki pozitiflikleri görmekteyiz.

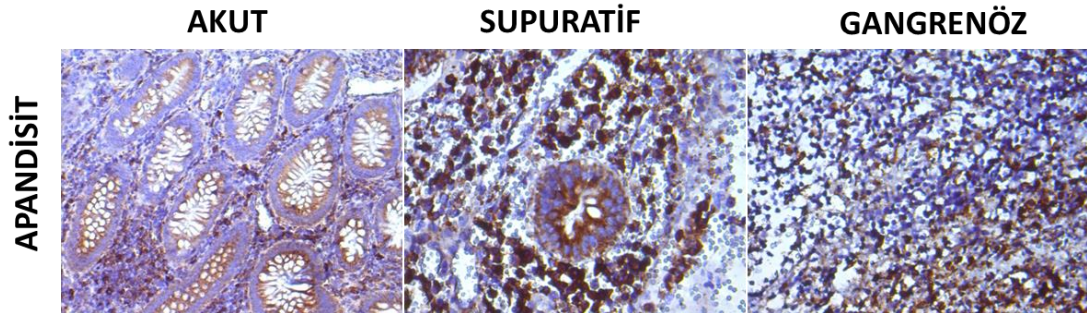
PERK'in apandisit dokularında akut, supurative ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları kıyaslandığında pozitiflik giderek artmakta olduğunu görmekteyiz. Oklarla pozitiflikleri görmekteyiz. (40X)

Tablo 5. PERK'in apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama skor sonuçları

	HASTA 1	HASTA 2	HASTA 3	ORTALAMA DEĞER
AKUT	1	1	2	1,3
SUPURATİF	2	3	2	2,3
GANGRENÖZ	3	3	4	3,3

Grade 0: <5% ; Grade 1: >5% ; Grade 2: >25% ; Grade 3: >50% ; Grade 4: >75%.

4.2.3 GRP78



Şekil 17. GRP78 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları

GRP78' in apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında oklarla glandlerdeki pozitiflikleri görmekteyiz.

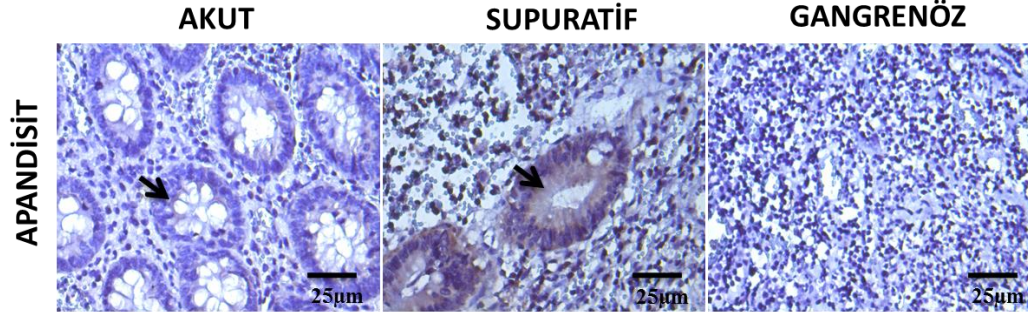
GRP78'in apandisit dokularında akut, supurative ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları kıyaslandığında pozitiflik giderek artmakta olduğunu görmekteyiz. Oklarla pozitiflikleri görmekteyiz. (40X) gangrenöz grubunda yapısal bozulmalar dikkat çekmektedir.

Tablo 6. GRP78'in apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları skorları.

	HASTA 1	HASTA 2	HASTA 3	ORTALAMA DEĞER
AKUT	2	2	2	2
SUPURATİF	3	3	4	3,3
GANGRENÖZ	4	4	4	5,3

Grade 0: <5%; Grade 1: >5% ;Grade 2: >25% ; Grade 3: >50% ; Grade 4: >75%.

4.2.4. LC3



Şekil 18. LC3 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları

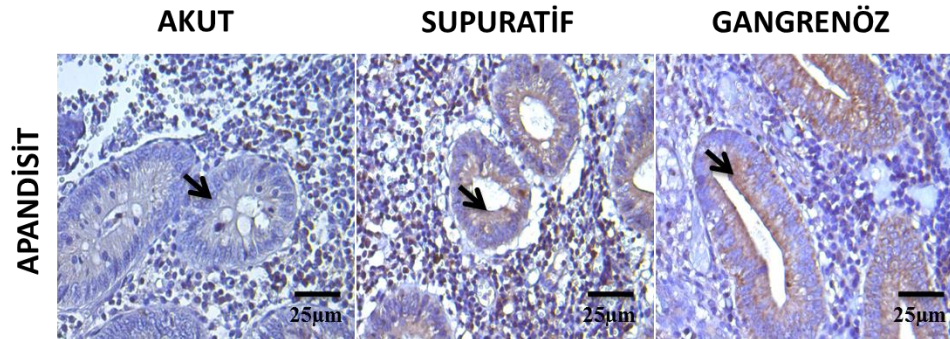
LC3'ün apandisit dokularında akut, supurative ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları kıyaslandığında pozitiflik giderek artmakta olduğunu görmekteyiz. Oklarla pozitiflikleri görmekteyiz. (40X) gangrenöz grubunda yapısal bozulmalar dikkat çekmektedir.

Tablo 7. LC3'ün apandisit dokularında akut, supurative ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları skorları

	HASTA 1	HASTA 2	HASTA 3	ORTALAMA DEĞER
AKUT	1	1	1	1
SUPURATIVE	2	3	2	2,33
GANGRENOZ	1	3	3	2,33

Grade 0: <5% ; Grade 1: >5% ; Grade 2: >25% ; Grade 3: >50 ; Grade 4:>75%.

4.2.5. Kaspaz 12



Şekil 19. Kaspaz 12 İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları

Kaspaz 12'nin apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında oklarla glandlerdeki pozitiflikleri görmekteyiz.

Kaspaz 12'nin apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları kıyaslandığında pozitiflik giderek artmakta olduğunu görmekteyiz. Oklarla pozitiflikleri görmekteyiz. (40X)

Tablo 8. Kaspaz 12' nin apandisit dokularında akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında immünohistokimyasal boyama sonuçları skorları.

	HASTA 1	HASTA 2	HASTA 3	ORTALAMA DEĞER
AKUT	2	1	1	1,33
SUPURATİF	3	2	3	2,6
GANGRENÖZ	2	3	4	3

Grade 0: <5%; Grade 1: >5% ;Grade 2: >25% ; Grade 3: >50% ; Grade 4: >75%.

5. TARTIŞMA

Apandisit, tüm özellikleri ve cerrahi tedavisi yıllar önce tanımlanmasına rağmen halen en yüksek yanlış tanı oranına sahip acil cerrahi patolojidir. En sık yaşamın ikinci dekatında görülür [20,76,77]. Cerrahide olanaklar hızla ilerlemesine rağmen, apandisit tanısında günümüzde hala laboratuvar testleri, klinik bulgular ve görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır. Akut apandisiti kuvvetle destekleyen semptom ve klinik bulguları olan hastalarda ilave tanısal testlere dahi ihtiyaç duyulmamaktadır. Apandisit olma ihtimali zayıf olan klinik durumlarda ise ek tanısal testlere ihtiyaç vardır. Hastalığın tek tedavisi cerrahi olarak apendiksini total olarak çıkarılıp güdüğün bağlanmasıdır [78].

ER hücre içi homeostasiyi düzenlemekten sorumludur. ER çeşitli hücresel işlemlerin iskeletini oluşturmaktadır. ER, hücredeki diğer membran yapılarıyla da yakından ilişki kurmaktadır. Bu fiziksel ve işlevsel birliktelik ER'ye hücresel homeostaside merkezi bir rol yüklemiştir. ER'de yeni sentezlenmiş salgı ve transmembran proteinlerinin modifikasyonu, katlanması ve taşınması sağlanır. Ayrıca ER başlıca kalsiyum deposudur.

ER protein sentezinde kalite-kontrol merkezidir. Birçok düzensizlik ER lümeninde katlanmayan proteinlerin birikmesine neden olur. ER fonksiyon kapasitesini aşan durumlarda katlanamamış ya da yanlış katlanmış protein birikimi gözlenir. Bu durumda ER stresi oluşur [11]. Stresin hücrede hissedilmesi ve ardından bu strese karşı bir cevap verilmesi gerekir. Stres nedenleri arasında enfeksiyon, besin eksikliği, mutasyon sayılabilir [12]. ER stresle karşılaştığında homeostazi sağlamak için bu stresle başa çıkmak için katlanmamış protein cevabı (UPR) yolağını kullanır. Yanlış katlanan proteinler yıkıma gidecektir. Hücre yine de homeostaza erişemez ise apoptozise yönlendirilir [13].

UPR üç ana stres sensörü tarafından aktive edilmektedir. Bunlar IRE1, ATF-6 ve PERK sensörleridir [30]. Bu üç sensör stresle karşılaştıktan sonra BIP' den ayrılırlar ve aktive olurlar. Ancak bu üç sensörün tam olarak aktive olma süreleri birbirinden farklıdır [79]. GRP78, yeni sentezlenmiş proteinlerin katlanmasında ve biraraya getirilmesinde, hatalı katlanmış proteinlerin ERAD' a yönlendirilmesinde,

kalsiyum homeostasisinin düzenlenmesinde ve ER stres sensörlerinin harekete geçmesi dahil bir çok hücrel işlemde rol oynamaktadır [80-82]. ER'de bulunan şaperonlar, ER'nin normal fonksiyonlarını yerine getirmesini sağlarlar [83]. En iyi karakterize edilmiş ER şaperonu, GRP78'dir. Bu şaperon proteini BIP olarak da adlandırılır. Bu üç yolağın aktivasyonundaki ortak nokta BIP sensöründen ayrılmalarıdır. Bu üç yolakta ancak bu sensörden ayrılınca aktive olmaktadırlar. Bu iki yolaktan hangisi artarsa artsın BIP' de stres varlığında artmaktadır [84]. IRE1 ve PERK tip 1 transkripsiyon faktör iken ATF-6 tip 2 transkripsiyon faktördür [26].

Hücresinin kendini yok etmesi anlamına gelen apoptoz, içsel bir programı aktive ederek, ölümün programlı bir şekilde gerçekleşmesidir. Her saniye yüzbinlerce hücre ürerken, bir o kadar da apoptozla ölmektedir [45,85]. Apoptoz belirli bir dengede olmaktadır. Bu dengenin bozulması bazı rahatsızlıklara sebep olmaktadır. Apoptoz arttığında nörodejeneratif rahatsızlıklar (Alzheimer, Parkinson, Huntington, Amyotrophic lateral sclerosis), AIDS, iskemi, otoimmünite problemler apoptoz az olduğunda ise kanser, sürekli enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir [50-53]. Apoptoz DNA fragmantasyonu [54] ve bir dizi kaspazın aktivasyonu [55,56] olarak tanımlanmaktadır [57].

Otofaji kelime anlamı olarak kendi kendini yok etmek, yemek anlamına gelmektedir. Auto (kendisini) ve phagy (yemek) kelimelerinden oluşmaktadır. Hücre hayatta kalmak için açlık gibi bazı koşullarda iç dengesini sağlamak için, hücre içindeki yapıların parçalaması gerekir [62].

Savunma mekanizması olan UPR yanlış katlanmış ya da katlanamamış proteinlerle karşılaştığında stres durumuna bağlı olarak iki yok etme sisteminden birini seçerek homeostaziye sağlamaya çalışır. Bunlardan biri apoptoz iken diğeri otofajidir [86].

Harding ve arkadaşlarının 2001'de yaptığı çalışmada diyabette PERK yolağının etkili olduğunu bulmuşlardır. ER stresinin tip 1 ve tip 2 diyabete olan etkilerinden bahsetmişlerdir. Üç farklı UPR sensörü vardır: Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK), iş yükü protein sentezini azaltır. ER' azalır. İnositol-requiring enzyme-1 α (IRE1 α), activating transcription factor 6 (ATF-6), ER

biyogenezinde hatalı protein yıkımında görev alır. Pankreatik β -hücreleri fizyolojik olarak endoplazmik retikulum stresi ile karşı karşıya kalır bu durum insülin sentez ve sekresyonunda fluktasyon gösteren ihtiyaç durumunda endoplazmik retikulumun kapasitesini ayarlamak için gereklidir. Bu stresi ortadan kaldırmak için ER bir sinyal kaskadını (unfolded protein response) (UPR) tetikler. ER fonksiyonunun adaptasyonunu ve yeniden kazanılmasını sağlar. Eğer bu sistem bozulursa apoptoz tetiklenir. Artan glikoz, FFA ve insülin sentez ihtiyacı β -hücre ve adipositlerde oksidatif ve ER stresine neden olur. Bu durum adacıklarda inflamasyona ve insülin direncine neden olur. Uzun süreli ve aşırı β -hücre UPR si tip 2 DM'de β -hücre disfonksiyonuna ve hücre ölümüne neden olur.

Thilmann ve arkadaşlarının 1999'da yaptıkları bir çalışmada Alzheimer ve Parkinsonda biriken agregatların UPR ve apoptozla ilişkili bulmuşlardır. Amiloid hipotezi: Beyinde amiloid proteinlerin hatalı katlanması ve amiloid plakları şeklinde birikmesi (β -amiloid) sonucu gelişebilir. β -amiloid, daha büyük amiloid öncül proteinlerinin proteolitik enzimler ile kesilmesinden oluşur.

Chakrabarti ve arkadaşlarının 2011'de yaptıkları çalışmada kanser tedavisinde PERK ve IRE1 aktivitelerinin düzenlenmesinin önemli olduğunu bulmuşlardır. Hipoksi, besinsel açlık, oksidatif stres ve diğer metabolik bozukluklara maruz kalan kanser hücreleri ER stresine ve UPR aktivasyonuna neden olur. ER stresinin durumuna ve derecesine bağlı olarak, UPR' ya antiapoptotik yolları aktive ederek yaşam sinyalleri gönderir ya da hücre ölüm yollarını indükleyerek ölüm sinyalleri sağlar. UPR' nin indüksiyonu ya da baskılanmasının sağlanması kansere karşı yararlı ve terapötik bir etki sağlamaktadır.

Bizim çalışmamızda ise akut apandisit patofizyolojisinde temel etki mekanizmasının apoptoz artışına bağlı olarak enflamasyonla ilişkili olduğudur. Akut apandisit patofizyolojisinde ER stres, apoptoz ve otofaji markerları incelenmiş olup, ER stres markerlarından ATF-6, GRP78, PERK yollarında ve otofaji markerlarından LC3 yollarında anlamlı farklar elde edilmiştir. Apoptoz markerı olan Kaspaz 12'de ise anlamlı bir fark elde edilememiştir.

6. SONUÇ

Bu çalışma; akut apandisit patofizyolojisinde ER stres markerlarının, apoptoz ve otofaji markerlarının araştırılması bakımından bir ilk olma özelliği taşımaktadır. ER'nin adaptasyon için kullandığı UPR yollarından ATF-6, GRP78 ve PERK moleküllerinin bulunduğunu gösterdik. Akut apandisit hastalarında ait farklı üç evre hasta grubunda bu moleküllerin ekspresyonlarında farklılık gözlenmiştir. Akut, supuratif ve gangrenöz gruplarında bu moleküllerden ATF-6, GRP78, ve PERK moleküllerinin gangrenöz, supuratif ve akut gruplarına kıyasla artış gözlenmiştir.

Apoptoz markerlarından Kaspaz 12'de ise grafik olarak anlamlı bir değişiklik bariz iken istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Otofaji markerlarından LC3 'de ise gangrenöz ve akut grupları arasında anlamlı bir fark yok iken, akut ve supuratif grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmiştir.

Bizim çalışmamız bu hususta bir ön çalışma olup, bundan sonraki çalışmalara ışık tutmasını ümit ediyoruz. Yıllar önce tüm özellikleri bilinmesine rağmen hala en yüksek yanlış tanı oranına sahip bu hastalıkta ER stres, apoptoz ve otofaji markerlarına bakarak, mekanizmasının aydınlatılması noktasında farklı bir bakış açısı kazandırmak amaç edinilmiştir.

7. KAYNAKLAR:

1. **H, A.** (1975) Cerrahi Ders Kitabı. Ankara.
2. **Sayek, i.** (2004) Temel Cerrahi. 3rd ed.
3. **Hoffmann, J. ve Rasmussen, O. O.** (1989). Aids in the diagnosis of acute appendicitis. *Br J Surg*, **76**: 774-779
4. **Blomqvist, P. G., Andersson, R. E., Granath, F., Lambe, M. P. ve Ekblom, A. R.** (2001). Mortality after appendectomy in Sweden, 1987-1996. *Ann Surg*, **233**: 455-460
5. **Flum, D. R. ve Koepsell, T.** (2002). The clinical and economic correlates of misdiagnosed appendicitis: nationwide analysis. *Arch Surg*, **137**: 799-804; discussion 804
6. **Tehrani, H. Y., Petros, J. G., Kumar, R. R. ve Chu, Q.** (1999). Markers of severe appendicitis. *Am Surg*, **65**: 453-455
7. **Eldrup-Jorgensen, J., Hawkins, R. E. ve Bredenberg, C. E.** (1997). Abdominal vascular catastrophes. *Surg Clin North Am*, **77**: 1305-1320
8. **Drazan KE, C. M.** (1998) Current Surgical Therapy. St. Louis: Mosby.
9. **Dobson, C. M., Šali, A. ve Karplus, M.** (1998). Protein Folding: A Perspective from Theory and Experiment. *Angewandte Chemie International Edition*, **37**: 868-893
10. **Horwich, A.** (2002). Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J Clin Invest*, **110**: 1221-1232
11. **Rutkowski, D. T. ve Kaufman, R. J.** (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, **14**: 20-28
12. **Lai, E., Teodoro, T. ve Volchuk, A.** (2007). Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)*, **22**: 193-201
13. **Conn, K. J., Gao, W. W., Ullman, M. D., McKeon-O'Malley, C., Eisenhauer, P. B., Fine, R. E. ve Wells, J. M.** (2002). Specific up-regulation of GADD153/CHOP in 1-methyl-4-phenyl-pyridinium-treated SH-SY5Y cells. *J Neurosci Res*, **68**: 755-760
14. **Kouame, D. B., Garrigue, M. A., Lardy, H., Machet, M. C., Giraudeau, B. ve Robert, M.** (2005). [Is procalcitonin able to help in pediatric appendicitis diagnosis?]. *Ann Chir*, **130**: 169-174
15. **Smink, D. S., Finkelstein, J. A., Garcia Pena, B. M., Shannon, M. W., Taylor, G. A. ve Fishman, S. J.** (2004). Diagnosis of acute appendicitis in children using a clinical practice guideline. *J Pediatr Surg*, **39**: 458-463; discussion 458-463
16. **Craig S, Lober W, Talevera F, Hardin E ve J., H.** 2015 Acut appendicitis. 2013; <http://emedicine.medscape.com/article/773895-overview#a0101>. Accessed 26.05.2015, 2015.
17. **Viallon, A., Zeni, F., Lambert, C., Pozzetto, B., Tardy, B., Venet, C. ve Bertrand, J. C.** (1999). High sensitivity and specificity of serum procalcitonin levels in adults with bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*, **28**: 1313-1316

18. **Martin, R. F.** 2015 Acute appendicitis in adults: Clinical manifestations and diagnosis. 2014; <http://www.uptodate.com/contents/acute-appendicitis-in-adults-clinical-manifestations-and-differential-diagnosis>. Accessed April 2015, 2015.
19. **in't Hof, K. H., van Lanckeren, W., Krestin, G. P., Bonjer, H. J., Lange, J. F., Becking, W. B. ve Kazemier, G.** (2004). Surgical validation of unenhanced helical computed tomography in acute appendicitis. *Br J Surg*, **91**: 1641-1645
20. **Jaffe, B. M. ve D.H, B.** (2005) The Appendix. In: Schwartz's Principles of surgery. Vol 29. 8th ed. New York: McGraw-Hill.
21. **Tu, B. P., Ho-Schleyer, S. C., Travers, K. J. ve Weissman, J. S.** (2000). Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science*, **290**: 1571-1574
22. **Ellgaard, L., Molinari, M. ve Helenius, A.** (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science*, **286**: 1882-1888
23. **Stevens, F. J. ve Argon, Y.** (1999). Protein folding in the ER. *Semin Cell Dev Biol*, **10**: 443-454
24. **Wormald, M. R. ve Dwek, R. A.** (1999). Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure*, **7**: R155-160
25. **Buck, T. M., Wright, C. M. ve Brodsky, J. L.** (2007). The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol*, **18**: 751-761
26. **Schroder, M. ve Kaufman, R. J.** (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, **74**: 739-789
27. **Ellgaard, L. ve Helenius, A.** (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**: 181-191
28. **Zhang, K. ve Kaufman, R. J.** (2004). Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, **279**: 25935-25938
29. **Mori, K.** (2000). Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **101**: 451-454
30. **Ron, D. ve Walter, P.** (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**: 519-529
31. **Kaufman, R. J.** (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*, **13**: 1211-1233
32. **Douthel, J., Treiman, M., Oschlies, U. ve Paschen, W.** (1999). Recovery of neuronal protein synthesis after irreversible inhibition of the endoplasmic reticulum calcium pump. *Cell Calcium*, **25**: 419-428
33. **Thilmann, R., Xie, Y., Kleihues, P. ve Kiessling, M.** (1986). Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus. *Acta Neuropathologica*, **71**: 88-93
34. **Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T. ve Youle, R. J.** (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J*, **18**: 2330-2341
35. **Wei, M. C., Zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B. ve**

- Korsmeyer, S. J.** (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**: 727-730
36. **Harding, H. P., Zeng, H., Zhang, Y., Jungries, R., Chung, P., Plesken, H., Sabatini, D. D. ve Ron, D.** (2001). Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in *perk*^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival. *Mol Cell*, **7**: 1153-1163
37. **Chakrabarti, A., Chen, A. W. ve Varner, J. D.** (2011). A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng*, **108**: 2777-2793
38. **Zhang, K. ve Kaufman, R. J.** (2008). From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*, **454**: 455-462
39. **Koritzinsky, M., Magagnin, M. G., van den Beucken, T., Seigneuric, R., Savelkoul, K., Dostie, J., Pyronnet, S., Kaufman, R. J., Weppler, S. A., Voncken, J. W., Lambin, P., Koumenis, C., Sonenberg, N. ve Wouters, B. G.** (2006). Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *The EMBO Journal*, **25**: 1114-1125
40. **Bodsch, W., Takahashi, K., Barbier, A., Ophoff, B. G. ve Hossmann, K. A.** (1985). Cerebral protein synthesis and ischemia. *Prog Brain Res*, **63**: 197-210
41. **Naidoo, N.** (2009). ER and aging-Protein folding and the ER stress response. *Ageing Res Rev*, **8**: 150-159
42. **Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. ve Mori, K.** (2001). Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, **21**: 1239-1248
43. **Ron, D.** (2002). Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest*, **110**: 1383-1388
44. **Polager, S., Ofir, M. ve Ginsberg, D.** (2008). E2F1 regulates autophagy and the transcription of autophagy genes. *Oncogene*, **27**: 4860-4864
45. **Kerr, J. F., Wyllie, A. H. ve Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**: 239-257
46. **Başaran, A.** (1999) Tıbbi Biyoloji Bursa: Nobel& Güneş Tıp Kitabevi.
47. **D, G.** (1996) Apoptosis and the immune response. Vol 46: Bioscience.
48. **Ellis, R. E., Yuan, J. Y. ve Horvitz, H. R.** (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*, **7**: 663-698
49. **N, H.** (1997). Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, **6**: 196-197
50. **Fadeel, B., Orrenius, S. ve Zhivotovsky, B.** (1999). Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochem Biophys Res Commun*, **266**: 699-717
51. **Hetts, S. W.** (1998). To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA*, **279**: 300-307
52. **Renehan, A. G., Booth, C. ve Potten, C. S.** (2001). What is apoptosis, and why is it important? *BMJ : British Medical Journal*, **322**: 1536-1538

53. **G., B.** 2015 Cell suicide: the birth of a mega- market. 1995; http://archive.fortune.com/magazines/fortune/fortune_archive/1995/05/15/202913/index.htm. Accessed 26.05.2015, 2015.
54. **Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N. ve Bizzaro, D.** (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*, **66**: 1061-1067
55. **Grunewald, S., Paasch, U., Said, T. M., Sharma, R. K., Glander, H. J. ve Agarwal, A.** (2005). Caspase activation in human spermatozoa in response to physiological and pathological stimuli. *Fertil Steril*, **83 Suppl 1**: 1106-1112
56. **Grunewald, S., Paasch, U., Wuendrich, K. ve Glander, H.-J.** (2005). SPERM CASPASES BECOME MORE ACTIVATED IN INFERTILITY PATIENTS THAN IN HEALTHY DONORS DURING CRYOPRESERVATION. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, **51**: 449-460
57. **Tesarik, J., Mendoza-Tesarik, R. ve Mendoza, C.** (2006). Sperm nuclear DNA damage: update on the mechanism, diagnosis and treatment. *Reprod Biomed Online*, **12**: 715-721
58. **Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. ve Wang, X.** (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**: 269-290
59. **Bruce Albert, Alexander Johnson ve Lewis, J.** (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed: Garland Science.
60. **Cooper, G. M. ve Hausman, R. E.** (2006) *The Cell: A Molecular Approach*. 3rd ed: ASM Press.
61. **Earnshaw, W. C., Martins, L. M. ve Kaufmann, S. H.** (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**: 383-424
62. **Ohsumi, Y.** (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**: 211-216
63. **Kang, R. ve Tang, D.** (2012). Autophagy in pancreatic cancer pathogenesis and treatment. *Am J Cancer Res*, **2**: 383-396
64. **Kroemer, G., Marino, G. ve Levine, B.** (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*, **40**: 280-293
65. **Mizushima, N. ve Levine, B.** (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol*, **12**: 823-830
66. **Ballif, B. A. ve Blenis, J.** (2001). Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. *Cell Growth Differ*, **12**: 397-408
67. **Song, G., Ouyang, G. ve Bao, S.** (2005). The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med*, **9**: 59-71
68. **Levine, B. ve Kroemer, G.** (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, **132**: 27-42
69. **Noble, C. G., Dong, J. M., Manser, E. ve Song, H.** (2008). Bcl-xL and UVRAG cause a monomer-dimer switch in Beclin1. *J Biol Chem*, **283**: 26274-26282

70. **Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T. ve Simon, H. U.** (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol*, **8**: 1124-1132
71. **Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., D'Amelio, M., Criollo, A., Morselli, E., Zhu, C., Harper, F., Nannmark, U., Samara, C., Pinton, P., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., Moll, U. M., Madeo, F., Paterlini-Brechot, P., Rizzuto, R., Szabadkai, G., Pierron, G., Blomgren, K., Tavernarakis, N., Codogno, P., Cecconi, F. ve Kroemer, G.** (2008). Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol*, **10**: 676-687
72. **Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L. ve Elazar, Z.** (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J*, **26**: 1749-1760
73. **Sherr, C. J.** (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**: 731-737
74. **Cuervo, A. M.** (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol*, **14**: 70-77
75. **Iaquinta, P. J. ve Lees, J. A.** (2007). Life and death decisions by the E2F transcription factors. *Curr Opin Cell Biol*, **19**: 649-657
76. **Ein, S. H.** (2000) Pediatric Surgery. Vol Philadelphia. 3rd ed: W. B. Saunders Company.
77. **Hakkı Ata Erdener, B. E., Ulman İ, İlhan H.** (1989). Çocuklarda akut apandisit. *Pediyatrik Cerrahi Dergisi*, **3**: 167-170
78. **Kwok, M. Y., Kim, M. K. ve Gorelick, M. H.** (2004). Evidence-based approach to the diagnosis of appendicitis in children. *Pediatr Emerg Care*, **20**: 690-698; quiz 699-701
79. **Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Jungreis, R., Harding, H. P. ve Ron, D.** (2003). Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J*, **22**: 1180-1187
80. **Hendershot, L. M.** (2004). The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med*, **71**: 289-297
81. **Imai, Y., Soda, M., Inoue, H., Hattori, N., Mizuno, Y. ve Takahashi, R.** (2001). An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, **105**: 891-902
82. **Li, J. ve Lee, A. S.** (2006). Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med*, **6**: 45-54
83. **Ni, M. ve Lee, A. S.** (2007). ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett*, **581**: 3641-3651
84. **Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. ve Prywes, R.** (2002). ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell*, **3**: 99-111
85. **Steller, H.** (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, **267**: 1445-1449
86. **Sozen, E., Karademir, B. ve Ozer, N. K.** (2015). Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med*, **78**: 30-41