T. Oft. Gaz. 30, 587-591, 2000

Apoptozis ve Göz

Sinan Tatlıpınar (*), Hayyam Kıratlı (**)

ÖZET

Apoptozis; fizyolojik ve/veya patolojik uyaranlara sekonder genetik kontrol altında gerçekleşen ve stereotipik morfolojik kriterleri olan programlanmış hücre ölümüdür. Apoptotik hücre ölümü günümüzde önemi daha çok anlaşılan bir konu olup oftalmolojide de apoptozisin tespit edildiği hastalıkların (glokom, oftalmik tümörler, retina dekolmanı, herediter retina distrofileri, koroidal neovasküler membranlar) sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu yazıda, apoptozisin temel özelliklerinden bahsedilmiş ve apoptozisin oftalmolojideki yeri özetlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, göz.

SUMMARY

Apoptosis and Eye

poptosis is programmed cell death that occurs under genetic control in response to physiological or pathological stimuli, and has stereotypical morphological criteria. Today, the importance of apoptotic cell death is even more appreciated and opthalmological diseases in which apoptosis is determined are increasing continuously. In this review, basic aspects of apoptosis are presented, and place of apoptosis in opthalmology is summarized.

Key Words: Apoptosis, eye.

GİRİŞ

Hücre ölümü, 2 temel mekanizma olan nekroz ve apoptozis ile gerçekleşmektedir. Nekroz; iskemi, hipertermi, fiziksel veya kimyasal bir travma gibi şiddetli ve ani gelişen bir hasarın yolaçtığı bir hücre ölümüdür (1). Morfolojik olarak, hücre zarı esas hasar gören organeldir ve osmotik basıncı dengeleyemez hale gelir. Sonuçta hücre şişer ve parçalanır. Bu tip hücre ölümü her zaman patolojiktir.

Apoptozis ise; fizyolojik ve/veya patolojik uyaranlara sekonder olarak genetik kontrol altında gerçekleşen stereotipik morfolojik kriterleri olan programlanmış hücre ölümüdür (1).

Apoptozis, sözcük kökeni olarak " eksilmek, düşmek" anlamındadır. Bu tabir ilk kez Kerr ve ark. (2) tarafından 1972 yılında kullanılmıştır. Apoptozis sıklıkla programlanmış hücre ölümü ile eşanlamlı olarak algılanmaktadır. Halbuki; programlanmış hücre ölümü bu hücre ölüm prosesini tanımlamaktayken, apoptozis meydana gelen morfolojik değişiklikleri tanımlamaktadır (3).

Fizyolojik uyaranlara sekonder gelişen apoptozisin klasik pekçok örneği mevcuttur (Tablo 1). Bunların dışında patolojik durumlarda (nörodejeneratif hastalıklar, tümörler gibi) veya patolojik stimuluslara ikincil (radyoterapi, kemoterapi, hipertermi gibi) apoptozis sıklıkla ortaya çıkar (3).

Apoptozisin üç temel adımı vardır (4).

1) Hücre ölümünü indükleyen bir uyaran (fizyolojik veya patolojik)

(*) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Arş. Gör. Dr.
(**) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, Doç. Dr.

Mecmuaya Geliş Tarihi: 29.12.1999
Kabul Tarihi: 18.02.2000

Tablo 1. Apoptozis örnekleri

Doku	Uyaran/ örnek
Embriyo	Parmak gelişimi
Timus	T lenfosit negatif seleksiyonu
Prostat	Androjen ablasyonu
Meme	Prolaktinin azalması (Laktasyonu takiben)
Müller kanalları	MIS (Müller inhibe edici madde)

2) Hücre içinde mevcut olan endojen ölüm mekanizmasının aktivasyonu

3) Hücrenin fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılması.

Apoptozisi indükleyen pekçok sinyal sistemi vardır (5). Bu sistemlerin en önemli örnekleri şunlardır:

1) Trofik faktörlerin yokluğu: Örneğin sinir büyüme faktörü (NGF) yokluğunda nöronal apoptozis gerçekleşmektedir.

2) Timusta T-lenfositlerin negatif seleksiyonu: Burada MHC antijenleri önemli rol oynamaktadır.

3) CD 95 / Apo-1 / Fas yüzey reseptör sistemi: Bu reseptör tümör nekroz faktör (TNF) ailesindendir ve bir ligand (FasL) ile uyarıldığında apoptozisi indükler.

4) Hücre siklusu düzenleyicileri (örneğin bir onkogen olan c-myc ve bir tümör süpresör gen olan p53)

Apoptozis Morfolojisi

Apoptotik süreç, morfolojik olarak tamımlanabilen belli adımları izlemektedir (3). İlk fazda, hücre komşu hücrelerden ayrılır. Buradaki mekanizma dezmozom gibi hücrelerarası bağlantıların kopmasıdır. Daha sonra hücre büzüşmesi başlar. Hücreiçi suyun hücredışı ortama transportu sonucu sitoplazma kondanse olur ve hücre dansitesi artar. Bu esnada hücreiçi organellerin çoğu intaktır. Eşzamanlı olarak nükleer kromatin de kondanse olur ve nükleer zar altında tipik kresentik tarzda yoğunlaşır. Sonraki adım ise hücre zarındaki ameboid uzantıların gelişimidir (zeiosis). Bu adımı takiben hücrenin fragmantasyonu gerçekleşir ve apoptotik cisimcikler oluşur. Çevre hücreler ve makrofajlar açığa çıkan apoptotik cisimcikleri reseptör bağımlı mekanizma ile fagosite ederler.

Apoptotik süreç oldukça hızlıdır ve yaklaşık 3-4 saat içinde hücre ortamdan kaybolur. Apoptotik hücrelerden dış ortama hücreiçi elemanlar sızmadığı için enflamasyon oluşmaz. Yani apoptotik hücre ölümü çevre hücrelere zarar vermez ve skar oluşumuna yolaçmaz.

Apoptozisin biyokimyasal kriterleri

Apoptotik süreçte gerçekleşen önemli bazı biyokimyasal değişiklikler mevcuttur (6). Öncelikle apoptozis enerji bağımlı aktif bir olaydır ve bu yönüyle nekrozdan belirgin bir şekilde ayrılır. Apoptotik hücrelerde RNA ve protein sentezine rastlanmaktadır. Diğer önemli bir olay ise hücre içi kalsiyum (Ca) artışıdır. Bu şekilde bazı önemli enzim sistemleri aktive olmaktadır. Hücreiçi su ve iyonlar dış ortama transport edilmekte ve bu yolla hücre kondanse olmaktadır. Tüm bu biyokimyasal değişiklikler arasında apoptozis için en tipik olan ise; kromatinin internükleozomal fragmantasyonudur. Bundan sorumlu enzim ise Ca - Mg bağımlı endonükleazdır ve bu enzim kromatini 180 bazçifti (bç) ve bunun katları olacak şekilde parçalamaktadır (7). Diğer önemli bir enzim ise Ca bağımlı transglutaminazdır. Bu enzim proteinlerde çapraz bağlar oluşturur ve bu şekilde apoptotik cisimciklerden dış ortama sızıntı olmasını engeller (3). Apoptotik hücrelerde yüzey değişiklikleri de izlenmektedir. Örneğin; immatür glikanlar ekspoze olur ve bu moleküller reseptör bağımlı fagositoz için reseptör görevi görürler.

Apoptozisin spesifik genler tarafından regülasyonu

Apoptozisin genetik kontrolü ile ilgili bilgilerin çoğu bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'dan elde edilmiştir (8). Bu nematodda toplam 1090 hücre vardır ve bunlardan 131'i genetik olarak programlanmış şekilde ölür.

C. elegans'da apoptozisle ilgili üç gen tespit edilmiştir. Bunlar ced-3, ced-4 ve ced-9'dur. Ced-3 ve ced-4 aptotik genler iken ced-9 ise; apoptozisi inhibe eden bir gendir. Daha sonra memelilerde yapılan çalışmalarda bu genlerin analogları tespit edilmiştir. Ced-3'ün analoğu ICE (Interleukin 1 beta converting enzyme) genidir. Ced-9'un analoğu ise; bcl-2 genidir (5).

Bir protoonkogen olan bcl-2, "B cell lymphoma" kelimelerinin baş harflerinden kısaltılmıştır. Bu gen bir iç mitokondrial membran proteini kodlamaktadır. Bcl-2 lenfomalarda sıklıkla tespit edilen t (14;18) translokasyonunda yeralır. Bu gen apoptozisi inhibe etmektedir.

Memelilerde apoptozisi regüle eden diğer bir gen ise bax'tır. Bu gen apoptozisi indüklemektedir. Bu iki gen (bcl-2, bax), kaspaz sistemini aktive veya inhibe ederek apoptozisi kontrol altında tutmaktadırlar.

Burada bahsi geçmesi gereken diğer bir gen de önemli bir tümör süpresör gen olan p53'tür (9). Hücre hasarı sonrası p53 ve genin protein ürünü ortamda birikir ve öncelikle hücre siklusunu G1 fazında durdurup

hücrenin kendini tamiri için zaman sağlar. Ancak hücre hasarının tamiri mümkün değilse, p53 hücreyi apoptozise sürükler. Bunu bax'ı indükleyip bcl-2'yi bloke etmek suretiyle gerçekleştirir.

Kaspazlar

C. elegans'ın ced-3 geninin, aktif merkezinde sistein taşıyan ve proteinleri aspartik asit rezidülerinin karboksil terminal ucundan kesen bir proteaz kodladığı anlaşılmıştır. Bu proteazlara kaspaz (caspase; cysteine containing aspartase) ismi verilmiştir (10). Bunun insandaki ilk örneği ICE' tır. Daha sonra kaspaz ailesinden diğer proteazlar da tespit edilmiştir. Bu enzimler hücrede normalde hücrede mevcuttur ancak aktivasyonları aktif olarak inhibe edilmektedir. Bu aktif inhibisyon mekanizmasından bcl-2 sorumludur. Öte yandan bax geni kaspaz aktivasyonunu arttırarak apoptozisi indüklemektedir.Kaspazların aktivasyonu apoptozis sürecindeki terminal olaydır ve bu enzimler pekçok hücreiçi proteini (aktin, lamin, retinoblastom proteini gibi) yıkıma uğratırlar.

Apoptozisin tespiti

Apoptozisin tespiti 3 temel metodla mümkündür. Bunlardan ilki morfolojik bulguların mikroskopla gözlenmesidir (11). Ancak bu pratik değildir ve apoptotik hücrelerin tespiti güçtür. İkinci metod ise DNA'nın agaroz jel elektroforezine tabi tutulmasıdır. Apoptotik hücrelerde endonükleaz enzimi DNA'yı 180 bç ve katları olacak şekilde parçalamaktadır. Jel elektroforezinde bu tazda parçalanmış DNA fragmanları belli bir düzende sıralanmaktadır ve tipik bir "merdiven paterni" oluşmaktadır. Bu metodla tek hücre apoptozisini göstermek mümkün değildir. Ancak bir dokuda apoptozisin mevcut olup olmadığı ortaya konabilir. Sonuncu ve en yeni teknik ise TUNEL (in situ terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling) metodudur (11). Bu metodla parafine yatırılmış histolojik kesitlerde tek hücre apoptozisini göstermek mümkün olmuştur. Burada yapılan internükleozomal olarak kesilen DNA parçalarının serbest uçlarına biotinle konjüge edilmiş dUTP ekleyip daha sonra ortama avidin-peroksidaz katılmasıdır. Son adımda kromojen madde eklenir ve bu madde peroksidaz tarafından parçalanıp renk değişikliğine yolaçar. Böylece in situ olarak internükleozomal DNA parçalanması tespit edilmektedir.

Buraya değin apoptozisin nekrozdan ne kadar farklı bir ölüm mekanizması olduğundan bahsedilmiştir. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklar Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Apoptozis-nekroz farkları

Morfolojik Kriterler	
Tek hücre ölümü	Bir hücre grubunun ölümü
Membran intakt, zeiosis	Membran hasarı (+)
Hücre büzüşmesi, apoptotik cisimcikler	Hücre şişmesi
Enflamasyon (-)	Enflamasyon (+)
Komşu hücre tarafından fagositoz	Makrofajlar tarafından fagositoz
Lizozomlar intakt	Lizozomal sızıntı
Kresentik kromatin kondansasyonu	Düzensiz kromatin kondansasyonu
Biyokimyasal Kriterler	
Enerji bağımlı	Enerji bağımlı değil
Makromolekül sentezi (+)	Maromolekül sentezi (-)
De novo gen transkripsiyonu	Yeni gen transkripsiyonu
İnternükleozomal DNA fragmantasyonu	DNA'nın düzensiz yıkımı
Fizyolojik/ patolojik	Her zaman patolojik

Apoptozis ve göz

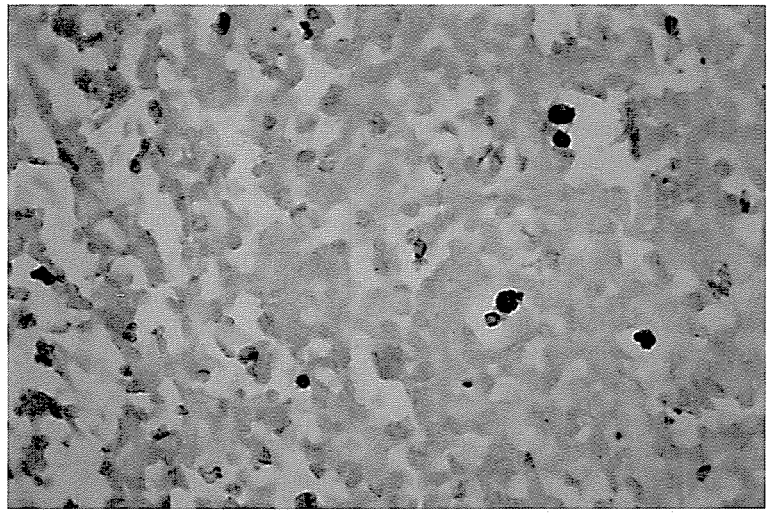
Embriyoloji: Gözün embriyolojik gelişimi sırasında apoptozisin önemli rolü vardır. Örneğin; lensin oluşumu sırasında ektodermden ayrılma, hyaloid sistemin ve pupiller membranın regresyonu apoptozisin aktif olarak katıldığı olaylardır (4).

Glokom: Multifaktöryel ve progresif bir optik nöropati olan glokomdan sorumlu retinal ganglion hücre ölümünde apoptozisin rolü vardır. Glokomda apoptozisi indükleyen 2 mekanizma öne sürülmüştür. İlki NGF azalması, ikincisi ise glutamat gibi eksitatuar amino asitlerin fazlalığıdır. Bunlar ganglion hücrelerinde hasara yolaçıp p53'ü arttırmakta ve p53 de bcl-2 azaltmakta, bax'ı ise arttırmaktadır. Bu yolla mitokondrilerden sitokrom c salınmakta ve kaspazlar aktive olmaktadır. Sonuç ganglion hücre apoptozisidir (12).

Oftalmik tümörler: Bugüne değin pekçok tümörde apoptozis tespit edilmiştir (13). Tümör hücrelerinde gelişen apoptozisten sorumlu faktörler hipoksi, TNF ve sitotoksik T lenfositler olabilir. Öte yandan tümör dokusunda apoptozisi indüklemek de mümkündür. Örneğin radyoterapi, kemoterapi, hipertermi, Apo-1, hormonal değişiklikler tümörde apoptozisi indükleyebilmektedir. Göz tümörleri içinde apoptozis en çok retinoblastomda çalışılmıştır (Şekil1). Yapılan bir çalışmada retiniblastomda apoptozis oranı %2.5-7.2 arasında tespit edilmiştir (14).

Herediter retina distrofilerinde apoptozis: Tso ve ark. (15) tarafından ratlarda yapılan bir çalışmada, retina

Şekil 1. TUNEL metodu ile hazırlanmış bir retinoblastom kesitinde kahverengi boyanmış apoptotik hücreler izlenmektedir (zemin, metil yeşili).



pigment epitelinin (RPE) fagositik aktivitesinde genetik bir defekte bağlı olarak fotoreseptör tabakasında gelişen dejenerasyondan apoptozisin sorumlu olduğu tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada fototransdüksiyon mekanizmasındaki bir defektin (fosfodiesteraz enzim defekti) apoptozisi indükleyerek fotoreseptör dejenerasyonuna yolaçtığı tespit edilmiştir (16). Hayvan modelindeki bu çalışmalar retinitis pigmentoza ve benzer herediter retina distrofilerine ışık tutabilecektir.

Retina dekolmanında apoptozis: 75 travmatik retina dekolmanı olgusunu inceleyen bir çalışmada apoptotik fotoreseptör hücre ölümü tespit edilmiştir (17). Bu tip hücre ölümü özellikle erken evredeki hücre kaybından sorumlu bulunmuş, dört hafta ve sonrasında enüklüe edilen gözlerde apopitozise rastlanmamıştır. Fotoreseptör tabakasındaki apoptotik hücre ölümü dekolman cerrahisi sonrası anatomik başarı yüksek olsa bile fonksiyonel başarının düşük olmasında önemli rol sahibi olabilir.

Koroidal neovasküler membranlarda (KNVM) apoptozis: KNVM'lar aktif, vaskülarize ve hücresel bir yapıdan inaktif bir skar dokusuna doğru progresif bir geçiş göstermektedir. Apoptozisin bu süreçteki rolünü inceleyen bir çalışmada 10 yaşa bağlı maküla dejenerasyonu olgusundaki KNVM'larda apoptozis araştırılmıştır (18). Aktif, vaskülarize membranlarda apoptozis tespit edilirken inaktif skarlarda apoptozise çok nadir rastlanmıştır. Apoptotik hücrelerin çoğunu transdiferansiye RPE olduğu tespit edilmiştir ve bu hücreler VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) salgılamaktadır. Apoptozisle bu hücrelerin kaybı anjiojenik faktörlerin azalmasına yolaçmakta ve membranlar inaktif skar haline dönüşmektedir.

Kornea ve konjonktivada apoptozis: Kornea dokusunda apoptotik faktörlerin varlığını araştıran bir çalışmada Fas / FasL, bcl, bax ve ICE tespit edilmiştir (19). Bu faktörlerin gözün immün ayrıcalığında rolü olduğu öne sürülmüştür.

Uzun süreli antiglokomatöz ilaç kullanan hastalarda konjonktiva epitelinde apoptozis yoğun olarak tespit edilmiş ve bundan özellikle prezervan maddelerin sorumlu olduğu gösterilmiştir.

Sonuç ve terapötik yaklaşımlar

Apoptotik hücre ölümü günümüzde önemi daha çok anlaşılan bir konudur. Bu konudaki yoğun çalışmalar neticesinde araştırma boyutunun ötesinde olası terapötik yaklaşımlar mümkün olabilecektir. Bu amaçla apoptotik süreç iki türlü manipüle edilebilir. Örneğin glokomda apoptotik sürecin inhibisyonu ile retinal ganglion hücrelerini korumak mümkün olabilir. Bunun aksine, tümörde apoptozisin indüklenmesiyle tümöral regresyon sağlanabilir.

KAYNAKLAR

1. Cohen JJ: Apoptosis. Immunol Today. 1993. 14. 126-130.
2. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972. 26. 239-57.
3. Fesus L, Davies PJA, Piacentini M: Apoptosis: molecular

mechanisms in programmed cell death. Eur J Cell Biol. 1991. 56. 170-77.

4. Milligan C, Schwartz L: Programmed cell death during animal development. Brit Med Bull. 1997. 52. 570-90.
5. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. Brit Med Bull. 1997. 52. 451-65.
6. Bursch W, Kleine L, Tenniswood M: The biochemistry of cell death by apoptosis. Biochem Cell Biol. 1990. 68. 1071-74.
7. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: The role of the endonuclease. Amer J Pathol. 1990. 136. 593-608.
8. Hengartner MO, Ellis RE, Horvitz HR: Caenorhabditis elegans gene ced-9 protects cells from programmed cell death. Nature.1992. 356. 494.
9. Bellamy COC. p53 and apoptosis. Brit Med Bull. 1997. 52. 522-538.
10. Thornberry NA: The caspase family of cysteine proteases. Brit Med Bull. 1997. 52. 478-490.
11. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via spesific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol. 1992. 119. 493-501.
12. Nickells RW: Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. Surv Opthal. 1999. 43. 151-161.
13. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis. Cancer. 1994. 73. 2013-26.
14. Madigan MC, Penfold PL: Human retinoblastoma: a morphological study of apoptotic, leukocytic, ad vascular elements. Ultrastruc Pathol. 1997. 21. 95-107.
15. Tso MOM, Zhang C, Abler AS et al: Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats. IOVS. 1994. 35. 2693-99.
16. Lolley RN, Rong H, Craft CM: Linkage of photoreceptor degeneration by apoptosis with inherited defect in phototransduction. IOVS. 1994. 35. 358-62.
17. Chang CJ, Lai WW, Edward D, Tso MOM: Apoptotic photoreceptor cell death after traumatic retinal detachment in humans. Arch Opthalmol. 1995. 113. 880-6.
18. Hinton DR, He S, Lopez P: Apoptosis in surgically excised choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. Arch Opthalmol. 1998. 116. 203-9.
19. Wilson SE, Li Q, Weng J et al: The fas-fas ligand system and other modulators of apoptosis in the cornea. IOVS. 1996. 37. 1582-92.