

T.C.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SPONTAN DÜŞÜK SONUCU ELDE EDİLEN İNSAN DİŞİ VE ERKEK
FETUSLERİNDE 2.TRİMESTER SÜRESİNCE KARACİĞER DOKUSUNDA
MEYDANA GELEN HİSTOLOJİK DEĞİŞİMLER, p53 EKSPRESYONU VE
APOPTOZİS

EMİNE DAHAM

HİSTOLOJİ – EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. MURAT TOSUN

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından
08.TIP.05 Proje Numarası İle Desteklenmiştir.

Tez No: 2009-015

2009 - AFYONKARAHİSAR

II

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez Savunma Tarihi: 10.06.2009



Doç. Dr. Hakan MOLLAOGLU
ÜYE

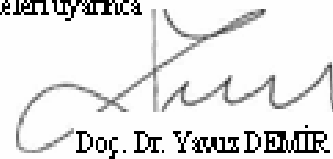


Doç. Dr. Mirat YAĞMURCA
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Mirat TOSUN
ÜYE

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programı öğrencisi Ezime D. AHAM*ın "Sporun Düşük Sorucu Elde Edilen İnan Dışı ve Ekkele Peleşlerinde 2. Trimester Siresince Karaciğer Dokusunda Meydana Gelen Histolojik Değişimler, p53 Ekspresyonu ve Apoptozis" başlıklı tezi 15 / 06 / 2009 günü saat 16 : 00'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Doç. Dr. Yavuz DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimime başladığım günden itibaren derslerimde ve tez konumun belirlenmesinde, planlanmasında ve yürütülmesinde bana yol gösteren ve yardımını esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Murat TOSUN'a, düşünceleriyle tezimin olgunlaşmasında bana yardım eden, manevi desteğini benden esirgemeyen çok değerli hocam Ana Bilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Murat YAĞMURCA'ya, çalışmamın laboratuvar bölümünde bilgilerini ve tecrübelerini benden esirgemeyen laborant arkadaşlarım Ayfer AĞDAK ve Şule YİĞİT'e, tez çalışmamın örneklerinin hazırlanmasında emeğini esirgemeyen değerli yüksek lisans arkadaşım Serpil ERDEM'e, tezime ve bana olan desteklerinden dolayı kıymetli arkadaşlarım Sibel BÜYÜKŞİMŞEK, Züleyha ATEŞÇİ ve Dudu ŞAHBAZ'a, değerli kardeşim Sevda DAHAM'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Şevket Demirel Kalp Merkezi Kalp Damar Cerrahisi Yoğun Bakım Ünitesinde çalışan çok değerli iş arkadaşlarıma ve saygıdeğer tüm yöneticilerime; eğitimim boyunca bana göstermiş oldukları anlayış, fedakarlık ve toleranstan dolayı kendilerine sonsuz saygı ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca eğitim hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim çok değerli, sevgili aileme teşekkür ederim.

Emine DAHAM

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
RESİMLER ve ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar ve GRAFİKLER DİZİNİ	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Karaciğer	4
2.1.1. Karaciğerin Embriyolojisi.....	5
2.1.1.1. Sindirim Sistemi ve Karaciğerin Gelişimi	5
2.1.1.2. Karaciğer ve Safra Yolları Gelişimi	7
2.1.2. Karaciğerin Fetal Dolaşımı:	9
2.1.3. Karaciğerin Anatomisi.....	9
2.1.4. Karaciğerin Histolojisi.....	11
2.1.5. Karaciğerin Hücreleri ve Fonksiyonları	16
2.1.5.1. Hepatositler	16
2.1.5.2. Kupffer Hücresi	18
2.1.5.3. Satellit Hücreleri.....	20
2.1.6. Karaciğerin Fizyolojisi:	21
2.1.6.1. Karbonhidat Metabolizması	21
2.1.6.2. Yağ Metabolizması.....	22
2.1.6.3. Protein Metabolizması	22
2.1.6.4. Safra Salınımı	22
2.1.6.5. Pıhtılaşma Faktörleri ile İlişkisi.....	22
2.1.6.6. Karaciğerin Diğer Fonksiyonları.....	23
2.2. p53 Geni	23
2.3. Apoptozis.....	24
2.3.1. Apoptozis Tanımı ve Tarihçesi	24

2.3.2. Apoptozisin Önemi.....	25
2.3.3. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar.....	26
2.3.4. Apoptozis Mekanizmaları.....	27
2.3.5. Apoptozis Düzenleyici Genler	28
2.3.6. Apoptozisi Tetikleyen Ölüm Faktörleri ve Reseptörleri	29
2.3.7. Apoptozis Sinyalinin iletim Kaskadı.....	30
2.3.8. Sinyal Yolunun Diğer Regülatörleri.....	31
2.3.9. Efektör Sitotoksik T Hücreleri ve Natural Killer (NK) Hücrelerin Apoptoziste Rolü.....	32
2.3.10. Apoptozis Süresince Hücrede Oluşan Biyokimyasal, Morfolojik ve Metabolik Değişiklikler.....	32
3. MATERYAL ve METOT	35
3.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması:.....	35
3.2. Histolojik İnceleme	36
3.2.1. Doku Takibi Metodu	36
3.2.2. İmmunohistokimyasal Metot	37
3.2.2.1. Apoptozis belirleme metodu	37
3.2.2.2. P53 Ekspresyonu Belirleme Metodu	40
3.2.3. Görüntü Değerlendirme	41
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	42
5. BULGULAR.....	43
6. TARTIŞMA.....	53
7. SONUÇ.....	59
8. KAYNAKLAR.....	60

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Bcl	: B Cell Leukemia / Lymphoma
BP3	: Binding Protein 3
CE	: Caenorhabditis
CTL	: Sitotoksik T Lenfositler
CV	: Santral Ven
FADD	: Fas Adapter Protein Death Domain
FasL	: Fas Ligant
HIV	: Human Immuno Deficiency Virus
IAP	: Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE	: Interleukin-1 β Converting Enzyme
IGF	: Insulin Like Growth Factor
NK	: Naturel Killer
RES	: Retikuloendotelyal Sistem
RNA	: Ribonükleik asit
TNF	: Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroze Edici Faktör)
TNFR-1	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör-1
TNFR-2	: Tümör Nekrozis Faktör Reseptör-2
TRAIL	: TNF ilişkili Apoptozisi İndükleyen Ligand
TRADD	: TNFR Associated Death Domain (TNFR ilişkili Ölüm Bölgesi)

RESİMLER ve ŞEKİLLER DİZİNİ

Resim 1. Karaciğer lopçuğunun (lobül) histolojik ve fonksiyonel sınıflandırılması (5 No'lu kaynaktan alınmıştır).....	15
Resim 2. Yetişkin dişi sıçan karaciğer dokusunda vena santralisten, perifere ışınal olarak uzanan hepatositler. HE x 66 (33 No'lu kaynaktan alınmıştır).	17
Resim 3. Elektron mikroskobu ile görüntülenmiş bir kupffer hücresi (37 No'lu kaynaktan alınmıştır).	20
Resim 4. Erkek fetuslerden alınan karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısının tespit edilemediği bir görüntü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.....	45
Resim 5. Erkek fetuslerden alınan karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısının tespit edilemediği bir görüntü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.....	45
Resim 6. Erkek fetuslerden alınan karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısının tespit edilemediği bir görüntü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.....	46
Resim 7. Erkek fetuslerden alınan karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısının tespit edilemediği bir görüntü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.....	46
Resim 8. Dişi fetuslerden alınan karaciğer dokusunda az sayıda tespit edilen apoptotik hücre görünümü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.....	47
Resim 9. Dişi fetuslerden alınan karaciğer dokusunda az sayıda tespit edilen apoptotik hücre görünümü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.....	47
Resim 10. Dişi fetuslerden alınan karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işaretlenmiş iki adet apoptotik hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.	48
Resim 11. Dişi fetuslerden alınan karaciğer dokusunda az sayıda tespit edilen apoptotik hücre görünümü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.....	48
Resim 12. Dişi fetuslerden alınan karaciğer dokusunda az sayıda tespit edilen apoptotik hücre görünümü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.....	49
Resim 13. 19 haftalık erkek fetus karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işaretli dört adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.	49
Resim 14. 19 haftalık erkek fetus karaciğer dokusunda yeşil kutuyla işaretli bir adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.....	50
Resim 15. 19 haftalık erkek fetus karaciğer dokusunda yeşil kutuyla işaretli bir adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.....	50

Resim 16. 15 haftalık dişi fetus karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işretli iki adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.	51
Resim 17. 17 haftalık dişi fetus karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işretli dört adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.	51
Resim 18. 20 haftalık dişi fetus karaciğer dokusunda p53 pozitif hücre görünümü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.	52
Resim 19. 21 haftalık dişi fetus karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işretli dört adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.	52
şekil 1. Karaciğerin fötal kan dolaşım şeması (24 No’lu kaynaktan alınmıştır).	9
şekil 2. VCI vena cava inferior, lig teres ligamentum teres, rhv sağ hepatik ven, mhv orta hepatik ven, lhv sol hepatik ven (27 No’lu kaynaktan alınmıştır).....	11
şekil 3. Karaciğerin poligonal şekilli parankim hücreleri santral venden (CV) lobülün çevresine doğru her doğrultuda kordlar (LC) şeklinde yayılmışlardır. Bu kordların içinde duvarları karaciğer hücreleri tarafından oluşturulan tüp boşluklar halinde safra kanal	14
şekil 4. Apoptozis ve nekrozis arasındaki farklar (15 No’lu kaynaktan alınmıştır). .	26
şekil 5. Apoptozisin morfolojik görünümü (14 No’lu kaynaktan alınmıştır).....	27
şekil 6. Fas ve TNFR-1 reseptörleri ile tetiklenen apoptozis mekanizması A: Fas bağımlı apoptozis. FasL’in, Fas reseptörüyle bağlanması ile FADD/MORT1 ölüm bölgelerinin aktivasyonu sonucu kaspaz sisteminin aktive olması ve kromozomal DNA yıkımı. B: TNF bağımlı apoptozis. TNF’nin TNFR1 reseptörüyle bağlanması ile TRADD ve FADD/MORT1 ölüm bölgelerinin aktivasyonu sonucu kaspaz sisteminin aktive olması ve kromozomal DNA yıkımı (14 No’lu kaynaktan alınmıştır).	31

TABLolar ve GRAFİKLER DİZİNİ

Tablo 1. Apoptozisi etkileyen hücre dışı ve hücre içi etkenler (14 No'lu kaynaktan alınmıştır)	28
Tablo 2. Çalışmada kullanılan fetuslerin yaşları ve sayıları.....	35
Grafik 1. Fetuslerde apoptotik hücrelerin sayılarının karşılaştırılması.....	44
Grafik 2. Fetuslerde p53 pozitif hücrelerin sayılarının karşılaştırılması	44
Grafik 3. Erkek ve Dişi fetuslerde apoptotik ve p53 pozitif hücrelerin sayılarının karşılaştırılması.....	44

ÖZET

Spontan Düşük Sonucu Elde Edilen İnsan Dişi ve Erkek Fetuslerinde 2. Trimester Süresince Karaciğer Dokusunda Meydana Gelen Histolojik Değişimler, p53 Ekspresyonu ve Apoptozis.

Giriş: Embriyolojik gelişim uzun yıllardır insanoğlunun ilgisini çekmekle birlikte son 30 yıla kadarki dönemde yeterli miktarda araştırılmamıştır. Bununla birlikte, son yıllarda gelişen teknolojilere paralel olarak fetal dönem gözle bile izlenebilir hale gelmiştir. Ancak bu süreçte görülen birçok hücre ve doku düzeyindeki değişiklikler halen oldukça yetersizdir ve araştırılmaya devam edilmektedir ve sürekli yeni verilere ulaşılmaktadır. Çalışmamız bu amaç doğrultusunda planlanmış olup fetal dönemin ve doğum sonrası dönemin en büyük batın içi organı olan karaciğerin fetal gelişiminin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada kullanılacak olan fetuslar gelişimin 2. trimesterine ait dişi ve erkek fetuslar olup bu döneme ait olarak elde edilecek önemli veriler literatüre katkı sağlayabilecektir. Bununla birlikte, bugüne kadar üzerinde hemen hiç çalışılmayan fetal dönemde karaciğer dokusunda artan proliferasyona paralel olarak gelişmesi beklenen apoptozis ve varsa bu apoptozis yolağının tespiti bize çok önemli veriler verecektir.

Materyal Metot: Bu çalışmada kullanılan insan fetusları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalında mevcut fetus koleksiyonundan elde edilmiştir. Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim Dalı ve Konya Doğum evinde normal rutin gebelik takipleri sırasında spontan abortus sonucu toplanan ve morfolojik olarak herhangi bir konjenital malformasyonu ve riskli gebelik hikayesi olmayan ve ailelerinden yazılı izin alınmış, fetal yaşları 15-22 hafta arasında değişen 13 dişi ve 18 erkek insan fetus kullanılmıştır. Alınan örnekler %10 nötral formalinde fikse edildikten sonra klasik histolojik takip metotlarıyla takip edilerek parafine gömülmüştür. Örneklerden alınan 5µ kalınlığındaki kesitler öncelikle dokudaki apoptozisin tespiti için immunohistokimyasal olarak Tunel uyumlu bir immun boya ve p53 ekspresyonunu göstermek için anti-p53 primer antikor boyama yapıldı. p53 boyama için sekonder antikor olarak Horse radish peroksidaz (Labvision, Fremont,CA) sistemi ve

kromojen olarak AEC kromojen (Labvision, Fremont,CA) kullanıldı. Zıt boyama için Mayers Hematoksilen (Sigma, İnterlab, Turkey) kullanıldı. Kapatma solüsyonu olarak özel su bazlı mounting medium (Labvision, Fremont,CA) kullanıldı. Preparatlar ışık mikroskobu (Nikon Eclipse E600) altında incelenerek p53 pozitif ve apoptotik hücreler sayıldı. Elde edilen veriler grafiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Hepatositlerde apoptozisin değerlendirilmesinde erkek fetuslerin 19. haftalık fetuslerden alınan örneklerde hepatositlerde toplam 3 tane apoptotik hücre tespit edilirken 19 haftalık dişi fetuslerde apoptotik hücre sayısının arttığı görüldü. P53 ekspresyonunun incelenmesinde erkek fetuslerde p53 pozitif hücre sayısının 18. haftaya kadar belirgin derecede arttığı 19. haftada bu artışın azaldığı fakat devam ettiği tespit edildi. Dişi fetuslerde p53 pozitif hücre sayısının 15. haftadan 17. haftaya kadar arttığı ancak 20. hafta civarında azaldığı tespit edildi. Bununla birlikte 21. haftadan sonra tekrar ekspresyonun artması ilgi çekici bir olaydı.

Sonuçlar: Çalışmamızda elde edilen veriler bize insan karaciğerinin fetal gelişiminde p53 ekspresyonu ve apoptozisin etkin olduğunu ancak bu iki sürecin birbirinden bağımsız olarak geliştiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler:

1. Karaciğer
2. Embriyoloji
3. İkinci trimester
4. Apoptozis
5. Fetal gelişim
6. p53

SUMMARY

Histological Evaluation, p53 Expression and Apoptosis in Human Male and Female Liver Which is Collected by Spontan Abortus During Second Trimester.

Introduction: Embryological growing has been attracting the human's interest but it hadn't been searched enough until the last thirty years. Besides, while the technology is growing up, the fetal period can be watched with naked eyes. But in this period, the changes-seen on many cells and tissues-are stil not enough and they are stil being searched and the new datas are being found contirously. Our study has been planned on this drection and we aimed to examine the liver which is the biggest organ in stomach in the fetal period and after birth period. The fetus which will be used in this study, are male and female fetus that belong to the second trimester of the grwing. And the important datas of this period which will be reached, will help the literature. Moreover, the apoptosis-which is supposed to grw as a paralel with the proliferasion increasing on the liver tissue in the fetal period-hasn't been examined up to now. To find the apoptosis and the apoptosis canal (if there is) will give us a lot of datas.

Meterial Method: The human fetus which are used in this study have been taken from the fetus collection belongs to Selçuk University, Meram Medical Faculty, Anatomy Science Department. In this study, 13 female, 18 male human fetus have been used. Their fetal ages change between 15 and 22 weeks. They were collected during the normal routine pregnancy followings as a result of spontaneous abortus in Selçuk University, Meram Medical Faculty, Woman Birth Science Department and Konya Maternity Hospital. And they were taken from the families with written permissions and they haven't got a congenital malformation as a morphological and they haven't got a risky pregnancy past. After the taken patterns are are fixed on the %10 neutral formal, they were buried in to parafin by following the classic histological methods. The parts with 5 μ thickness that taken from the patterns were painted firstly to find the apoptosis in the tissue. They were painted as an immunohistochemical tred based immune painting and anti-p53 primer anticor painting to show the p53 expression. The horse radish peroksidaz (Labvision,

fremont, CA) has been used as a seconder antikor fort he p53 painting and AEC cromogen (Labvision, fremont, CA) has been used as a cromogen. For the contrary painting, Mayers Hemotocsilen (Sigma, Interlab, Tukey) has been used. As a covering solision, special water based mounting medium (Labvision, fremont, CA) has been used. By searching under the prepharats light microscope (Nikon Eclipse E600), p53 positive and apoptotic cells were counted. The obtained datas were evaulated as a graphical.

Findings: While evaulating hepatocytes apoptosists, three apoptotic cells were found in the hepatocytes of patterns taken from the 19- weeks fetus. On the other hand, it was seen that the apoptotic cells number is increasing in female fetus on the 19. week. While searching the hepatocytes p53 expression, it was found that in the male fetus, p53 positive cell number is increasing obviously until the 18. week and this increase starts to reduce on the 19. week but it continues. It was found that in the famele fetus, the p53 positive cell number is increasing from the 15. week to 17. week but it reduces around the 20. week. Besides it is an interesting event that the expression is increasing again after the 21. week.

Results: The datas obtained from this study, show that, p53 expression and apoptosis is efective on the fetal growing of human liver but those two process are growing up independently from each other.

Key Words:

1. Liver
2. Embryology
3. Second trimester
4. Apoptosis
5. Fetal development
6. p53

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Karaciğer vücudun en büyük bezi ve deriden sonra gelen en büyük organıdır (1,2). Batın içinde büyük oranda sağ üst kadranda ve sol üst kadrana kadar uzanır. Karaciğerin büyük bir bölümü peritonla örtülüdür ve intraperitoneal organlardan biridir (2,3). Sindirim sisteminin hemen hemen bütün venöz kanının sistemik dolaşıma geçmeden önce karaciğere uğraması, bu organın fonksiyonel önemini yeterince ortaya koymaktadır (4).

Karaciğer primordiumu, ön barsağın distal ucunda bir endodermal epitelyum çıkıntısı şeklinde 3. hafta ortasında belirir. Gelişimin daha sonraki dönemlerinde, epitelyal karaciğer kordonları vitellin ve umbilikal venlere karışarak hepatik sinuzoidleri meydana getirir. Karaciğer kordonları parankime farklı ve safra kanallarının döşemesini meydana getirir. Hematopoetik hücreler, kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri septum transversum mezoderminden köken alır (5,6,7).

Karaciğerin ağırlığı intrauterin yaşamın 10. haftasında, toplam vücut ağırlığının %10'u kadardır. Organın ağırlığındaki bu fazlalık, kısmen sinuzoid sayısının yüksekliğine atfedilse de, bir başka önemli etken de, gördüğü hematopoietik fonksiyonlardır. Hepatik hücrelerde damar duvarları arasında, beyaz ve kırmızı kürelerin üretildiği, proliferasyonla karakterize geniş bir hücre ağı vardır. Karaciğerde hematopoez 6. haftada başlar. Hematopoietik aktivite, gebeliğin son iki ayında yavaş yavaş azalır ve doğumda geride ancak birkaç hematopoietik hücre adası kalır. Doğumda karaciğerin ağırlığı toplam vücut ağırlığının %5'i kadardır (3,8,9).

Karaciğerin bir başka önemli işlevi de, 12. haftadan itibaren hepatik hücrelerin safra üretmeye başlamasıdır. Bu sırada safra kesesi ve sistik kanal da oluşmuş; sistik kanal hepatik kanalla birleşerek koledok kanalını meydana getirmiş olduğundan, üretilen safra barsağa akabilme imkanı bulmuş olur (5,10).

Karaciğeri çıkarılan bir canlının birkaç saat yaşayabilmesi de bu organın önemini ortaya koymaktadır. Pek çok önemli fonksiyonu bulunmakla birlikte temel görevleri şöyle sıralanabilir; sekresyon, ekskresyon, depo, fagositoz, detoksikasyon, konjugasyon, esterleştirme, metabolizma ve hematopoez. Karaciğer tüm bu görevleri; karaciğer parankimini oluşturan epitel hücreleri aracılığıyla gerçekleştirir.

Karaciğer parankiminde çeşitli nedenlerle dejenerasyon oluşurken aynı zamanda rejenerasyon da oluşur (4,11).

Canlıların temel karakterlerinden birisi olan ölüm gerek hücre bazında, gerekse organizma bazında kaçınılmaz bir sonuçtur. Programlı hücre ölümüne eşdeğer olarak kabul edilen apoptozis, çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan “hücre intiharı” programlarının gelişimsel ve/veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik hücre ölümü olarak kabul edilmektedir. Yunanca’da “ağaçların yapraklarını dökmesi” anlamına gelen apoptozis, ilk kez biyomedikal literatürde 1972 yılında Kerr tarafından “mitozun karşıt anlamı” olarak kullanılmıştır (12,13).

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (14,15,16).

Tümör baskılayıcı bir gen olan p53 geni hücre siklusunda normal koşullarda inaktif halde bulunur. Hipoksi, UV ışınları, radyasyon kimyasal ajanlar gibi stres ajanlarına bağlı DNA’da hasar oluştuğunda hızla eksprese olur ve hücre siklusunda DNA tamiri için hücreye zaman kazandırır (17,18). Ardından, ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apoptozise yol açan proteinleri indükler (19,20).

Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptozis, hücrenin yaşam çemberi boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Örneğin kemik iliğinden devamlı olarak hücre üretimi devam ederken, günde yaklaşık 5×10^{11} kan hücresi apoptozis yolu ile yok edilmektedir. Barsak epitel hücrelerinin devamlı yenilenmesi, menstruasyon esnasında uterusun iç yüzündeki hücrelerin öldürülerek uzaklaştırılması apoptozise örnektir (14,15,21).

Embriyogenez sırasında bazı canlılarda parmaklar arasındaki perdenin ve damak füzyonu sonrası kalıntı epitel hücrelerin ortadan kaldırılmasında olduğu gibi, organogenez sırasında apoptozis, fazla üretilen hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır (22).

Embryolojik gelişim uzun yıllardır insanoğlunun ilgisini çekmekle birlikte son 30 yıla kadarki dönemde yeterli miktarda araştırılmamıştır. Bununla birlikte, son yıllarda gelişen teknolojilere paralel olarak fetal dönem gözle bile izlenebilir hale gelmiştir. Ancak bu süreçte görülen birçok hücre ve doku düzeyindeki değişiklikler halen oldukça yetersizdir ve araştırılmaya devam etmektedir ve sürekli yeni verilere ulaşılmaktadır.

Çalışmamız bu amaç doğrultusunda planlanmış olup fetal dönemin ve doğum sonrası dönemin en büyük batin içi organı olan karaciğerin fetal gelişiminin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmada kullanılacak olan fetuslar gelişimin 2. trimesterine ait dişi ve erkek fetuslar olup bu döneme ait olarak elde edilecek önemli veriler literatüre katkı sağlayabilecektir. Bununla birlikte, bugüne kadar insan deneklerde çok az çalışılan karaciğerin fetal gelişiminde karaciğer dokusunda artan proliferasyona paralel olarak değişmesi beklenen apoptotik indeksin ve bu apoptozisi uyaran yollardan biri olan p53 gen ekspresyonunun varlığı ve düzeyinin tespiti literatür açısından çok önemli verileri ortaya koyacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer

Karaciğer vücudun en büyük bezi olmakla birlikte deriden sonra gelen en büyük organdır aynı zamanda (1,2). Regio hypocondriaca dextra, regio epigastrica ve regio hypocondriaca sinistrada yer tutar. Başka bir deyişle batın içinde büyük oranda sağ üst kadranda ve sol üst kadrana kadar da uzanır (3). Dört adet zayıfça sıralanmış lobdan oluşan karaciğer, kollajen ve elastik lif içeren bir kapsül (glisson kapsülü) ile çevrelenmiş olup, periton ile kaplıdır (5).

Ağırlığı erişkin bir insanda yaklaşık 1,5kg'dır. Karaciğer yaşam için hayati bir organdır. Çünkü sindirim sistemi ile venöz drenaj arasında bir köprü görevi yapmaktadır. Karaciğer ürettiği safra nedeniyle ekzokrin bir bez, sentezlediği bazı maddeleri doğrudan kana vermesi özelliği nedeniyle de endokrin bir bez niteliği taşımaktadır (6,7).

Karaciğer, sindirim kanalından emilen besinlerin işlendiği ve vücudun diğer kısımları tarafından kullanılmak üzere depolandığı bir organdır. Bu yüzden sindirim sistemiyle kan arasında bir geçiş bölgesi oluşturur. Organa kanın %75-80'i portal venden gelir; geri kalan az bir bölümü hepatik arterle sağlanır. İnce barsaklardan emilen maddelerin çoğu portal ven yoluyla karaciğere ulaşır, sadece kompleks lipitler lenf damarlarıyla taşınır. Karaciğerin dolaşım sistemindeki konumu, metabolitlerin bir araya getirilmesi, dönüştürülmesi, biriktirilmesi ve toksik maddelerin etkisizleştirilmesi ve elenmesi için çok uygundur (9,10).

Karaciğeri çıkarılan bir canlının birkaç saat yaşayabilmesi de bu organın önemini ortaya koymaktadır. Pek çok önemli fonksiyonu bulunmakla birlikte temel görevleri şöyle sıralanabilir; sekresyon, eksresyon, depo, fagositoz, detoksikasyon, konjugasyon, esterleştirme, metabolizma ve hemopoezdir. Karaciğer tüm bu görevleri; karaciğer parankimini oluşturan epitel hücreleri aracılığıyla gerçekleştirir. Karaciğer parankiminde çeşitli nedenlerle dejenerasyon oluşurken aynı zamanda rejenerasyon da oluşur (11).

2.1.1. Karaciğerin Embriyolojisi

2.1.1.1. Sindirim Sistemi ve Karaciğerin Gelişimi

Embriyonun sefalokaudal ve lateral yönde katlanmasıyla endodermle döşeli boşluğun bir kısmı primitif barsağı oluşturmak üzere embriyonun içinde kalır. Endodermal boşluğun diğer iki kısmını meydana getiren yolk kesesi ve allantois ise, embriyonun dışında kalır (23).

Dördüncü haftanın başında barsak taslağının (primitif barsak) kranial ucunu membrana oropharyngealis, kaudal ucunu da membrana cloacalis kapatır. 4. hafta boyunca caput, kauda ve pliace laterales olarak gelişen barsak taslağı saccus vitelliusun dorsal parçasını embriyoya dahil eder. Sindirim kanalı epitelinin ve bezlerinin büyük kısmı primitif, barsağın endoderminden kaynaklanmaktadır. Sindirim kanalının kranial bölümünün epiteli stomatodeum (ağız taslağı) ektoderminden gelişmiştir. Sindirim kanalının duvarını oluşturan kas ve bağ doku tabakaları ile diğer tabakalar primitif barsağı saran splanknik mezenkimden kaynaklanmıştır (6).

Primitif barsak, embriyonun sefalik ve kaudal kısımlarında, sırasıyla ön barsak (foregut) ve son barsak (hindgut) adı verilen kör sonlanan bir tüp oluşturur. Bu tüpün orta kısmı, orta barsak (midgut) ise vitellin kanal yoluyla, yolk kesesiyle ilişkisini geçici olarak sürdürmeye devam eder (23).

Primitif barsak ve türevlerinin gelişimi 4 başlık halinde tartışılır;

1. Bukkofarengial membranda, trakeaobronşial divertiküle kadar uzanan faringeal barsak veya farinks.
2. Faringeal tüpün kaudalinde yer alan ve karaciğer tomurcuğuna kadar uzanan ön barsak.
3. Karaciğer tomurcuğunun kaudalinden başlayan ve yetişkinde transvers kolonun 2/3 proksimal ve 1/3 distal parçasının birleşim noktasına kadar devam eden orta barsak
4. Transvers kolonun sol üçte birinden kloakal membrana kadar uzanan son barsak (24).

Endoderm, gastrointestinal sistem epitelini, karaciğer ve pankreas gibi bezlerin parankimini oluşturur. Barsak, kas ve peritoneal elemanları ise splanknik mezodermden gelişir.

Ventral mezenter; sadece özofagusun son kısmında, midede ve duodenumun üst kısmında mevcuttur ve septum transversumdan köken almıştır. Karaciğerin septum transversum mezenşimi içine doğru büyümesi, ventral mezenteri;

1. özofagusun alt kısmı, mide ve duodenumun üst kısmından karaciğere uzanan küçük omentuma ve karaciğerden karın ön duvarına uzanan falsiform ligamente böler (24).

1. Pre-Enteron (Ön Barsak)'tan Gelişen yapılar

- a. Pharynx primitivus ve türevleri (cavitis oris, pharynx, lingua, tonsillae, glandula salivariae, systema respiratoriumun üst kısmı)
- b. Systema respiratoriumun alt kısmı (alt solunum yolu)
- c. Oesophagus, gaster
- d. Ductus choledocusun açıldığı deliğin proksimalindeki duodenum
- e. Hepar safra yolları (ductus hepaticus, vesca fellae, ductus cholodechus) ve pankreas (24).

2. Mesenteron (Orta Barsak)'tan Gelişen yapılar

- a. Duodenumun büyük kısmı,
- b. ince barsaklar,
- c. caecum,
- d. appendix vermiformis,
- e. colon asendens
- f. colon transversumun sağ yarısı (veya 2/3'ü) (24).

3. Metenteron (Son Barsak)'tan Gelişen Yapılar

- a. colon transversumun sol 1/3 kısmından ortasına kadar olan parçası
- b. colon descendens,

- c. colon sigmoideum,
- d. rectum
- e. canalis analisin üst kısmı
- f. vesica ürinarinin epiteli
- g. üretranın büyük bir kısmı metenterondan türemiştir (24).

2.1.2.2. Karaciğer ve Safra Yolları Gelişimi

Karaciğer primordiumu, ön barsağın distal ucunda bir endodermal epitelyum çıkıntısı şeklinde 3. hafta ortasında belirir. Hepatik divertikül veya karaciğer tomurcuğu olarak bilinen bu çıkıntı, perikard boşluğu ve yolk sapı arasındaki mezodermal plağı, yani septum transversumu penetre eden, hızlı proliferasyon gösteren hücre dizilerinden meydana gelir. Karaciğer hücreleri septumun içine girmeye devam ederken, hepatic divertikül ile ön barsak (duodenum) arasındaki bağlantı olarak safra kanallarını oluşturur. Safra kanalından kaynaklanan küçük bir ventral çıkıntı safra kesesi ve sistik kanal haline gelir (23,25).

Gelişimin daha sonraki dönemlerinde, epitelyal karaciğer kordonları vitellin ve umbilikal venlere karışarak hepatic sinüzoidleri meydana getirir. Karaciğer kordonları parankime farklılar ve safra kanallarının döşemesini meydana getirir. Hematopoietik hücreler, kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri septum transversum mezoderminden köken alırlar (23).

Karaciğer hücreleri, organ kaudale, karın boşluğuna çıkıntı yapacak şekilde septum transversumun tümünü işgal ettiğinde, karaciğerle ön barsak ve karaciğerle karın ön duvarı arasındaki septum transversum mezodermi membranöz hale gelerek, sırasıyla, küçük omentumu ve falsiform ligamenti oluşturur. Birlikte ön barsakla karın ön duvarı arasındaki peritoneal bağlantıyı oluşturur ve ventral mezogastrium adını alır (23).

Karaciğer yüzeyindeki mezoderm farklılaşarak, üst yüzdeki küçük bir alan dışında visseral periton haline gelir. Bu alanda, orijinal septum transversum ile olan temasını devam ettirir. Septumun bu parçası, yoğun mezenşimal bir doku halindedir ve ilerde diyaframın tendinöz parçasını oluşturacaktır. Gelecekteki diyaframla temas

eden karaciğerin bu yüzeyi peritonla hiçbir zaman örtülmez ve karaciğerin çıplak bölgesi olarak bilinir (3,23).

Karaciğer hızla gelişir ve 5. haftadan 10. haftaya kadar karın boşluğunun büyük bir kısmını kaplar. Vena umbilikalisten karaciğere akan oksijenli kanın miktarı, karaciğerin gelişimini ve fonksiyonel segmentasyonunu belirler. Başlangıçta karaciğerin sağ ve solloblarının büyüklüğü aynı iken, kısa bir sonra sağ lob daha fazla büyür. Altıncı haftada başlayan hematopoiesis karaciğere parlak kırmızı bir renk verir; karaciğerin 7. ve 9. haftalar arasındaki büyüklüğünden de bu hemapoietik aktivite sorumludur (24).

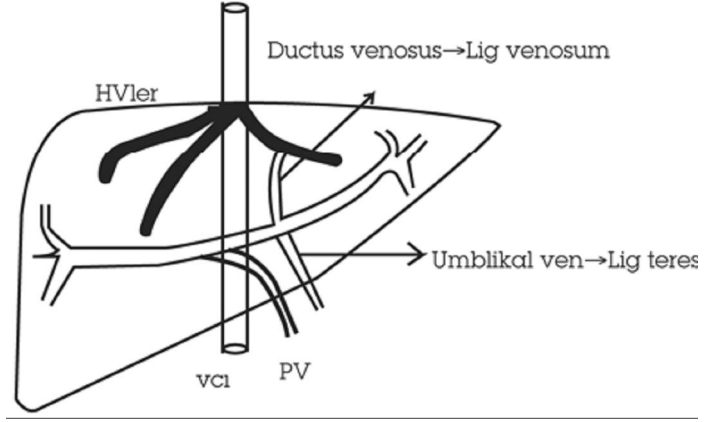
Karaciğerin ağırlığı intrauterin yaşamın 10. haftasında toplam vücut ağırlığının %10'u kadardır. Organın ağırlığındaki bu fazlalık kısmen sinüzoid sayısının yüksekliğine atfedilse de, bir başka önemli etken de, gördüğü hematopoietik fonksiyonlardır. Hematopoietik aktivite, gebeliğin son iki ayında yavaş yavaş azalır ve doğumda geride ancak birkaç hematopoietik hücre adası kalır. Doğumda karaciğerin ağırlığı toplam vücut ağırlığının %5'i kadardır (3,26).

Karaciğerin bir başka önemli işlevi de, 12. haftadan itibaren hepatik hücrelerin safra üretmeye başlamasıdır. Bu sırada safra kesesi ve sistik kanal da oluşmuş; sistik kanal hepatik kanalla birleşerek koledok kanalını meydana getirmiş olduğundan, üretilen safra barsağa akabilme imkanı bulmuş olur (23,24).

Sonuç olarak, sindirim kanalının içeriğinin rengi koyu yeşil bir hal alır. Duodenumun pozisyonunda meydana gelen değişiklikler sonucu, koledokun duodenuma giriş yeri başlangıçtaki anterior pozisyonundan posteriora doğru yer değiştirir ve sonuçta koledok duodenumun arkasından geçer duruma gelir (24).

2.1.2. Karaciğerin Fetal Dolaşımı:

Plasentadan dönen kan umblikal ven yoluyla sol ana portal vene ve duktus venosus ile direkt olarak sol hepatic ven ve vena cava inferior (VCI)'a geçer. Umblikal ven ve duktus venosus bu kanı taşıyan geçici damarlardır. Doğumda vazospasm ile kapanır. Tromboze olarak sırasıyla lig. teres ve lig. venosumu oluştururlar (27).



Şekil 1. Karaciğerin fetal kan dolaşım şeması (24 No'lu kaynaktan alınmıştır).

2.1.3. Karaciğerin Anatomisi

Abdomen boşluğunun üst bölümünde sağ hipokondriak ve epigastrik bölgenin büyük bir kısmını kapsar. Sol lobu çeşitli dereselerde sol hipokondriuma uzanır.

Normal sağlıklı bireylerde alt kenarı toraks kafesinin altına kadar uzanır. Parmaklara düz yüzeyli bir direnç gösterir.

Karaciğerin üst yüzü diafragma ile çok yakın ilişkidir. Sağ lobun en yüksek noktası dördüncü interkostal aralık veya beşinci kostaya kadar yükselir. Bu nokta pratik olarak sağ medio –klavikular hat üzerinde, sağ meme başından 1cm aşağıdadır.

Sol lobun üst sınırı altıncı kostanın üst sınırına kadar uzanır. Burada karaciğer sol ucu diagrafma ile tamamen kapatılmıştır.

Kostalar sağ lobun büyük bir kısmını kaplarlar. Ön yüzün küçük bir bölümü ise karın ön duvarı ile doğrudan temastadır.

Karaciğer solunum sırasında diyafragmanın hareketlerini izleyerek, ön kenarda üç cm kadar bir yükselme ve ivme görülür (28,29).

Karaciğerin, diafragmatik ve visseral olmak üzere iki yüzü alt ve arka olmak üzere iki kenarı vardır. Diafragmanın alt yüzünde ve karın içi visseral organların üst yüzünde oturmuştur.

Karaciğeri en dıştan saran seröz zara visseral periton adı verilir. Tek katlı yassı bir epitel türü olan mezotelyum ve altındaki ince bir bağ dokusundan oluşur. Karaciğer diafragmatik yüzündeki arenuda (bare area) adı verilen bölgesi dışında tümüyle visseral peritonla örtülmüştür. Visseral peritonun hemen altında sıkı bağ dokusundan yapılmış, bol kollajen lif ve az oranda elastik lif içeren özel bir kapsül vardır, bu kapsüle Glisson kapsülü adı verilir.

Karaciğere kan, iki kan damarı yolu ile gelmektedir.

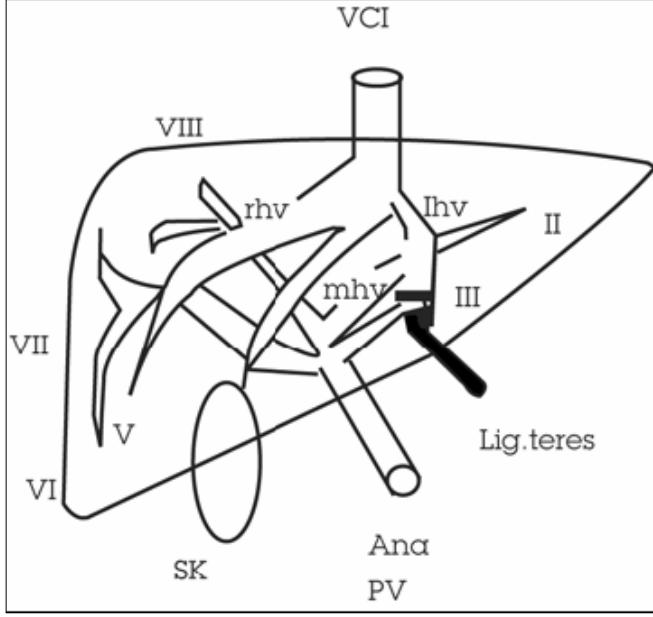
1. Portal ven (gelen kan hacminin %75-80'i), sindirim yolu, dalak ve pankreastan gelen kanı taşımaktadır.

2. Çölyak hattın bir dalı olan hepatik arter, oksijenlenmiş kanın %20-25'ini interlobar arter ve interlobüler arter yolu ile portal alana ulaşmadan önce karaciğere ulaştırır (5,8).

Portal ven ve hepatik arterin dallarından gelen kan, lopçukların sinüzoidlerinde birbirlerine karışmaktadır. Sinüzoid içerisindeki kan, karaciğer lopçuğunun merkezi venülünde toplanır. Merkezi venüller birleşerek sublobüler venleri oluştururken kan, toplayıcı venlerin ve hepatik venlerin yolunu izleyerek inferior vena cava'ya geri döner (5,10,25).

Sağ ve sol hepatik safra kanalları karaciğerden çıkarlar; daha sonra birleşerek hepatik kanalı oluştururlar. Hepatik kanal, ortak safra kanalını oluşturmasının hemen ardından, safra kanalını safra kesesine bağlayan ince bir tüp niteliğindeki kistik kanalı oluşturur (5).

Karaciğere ortalama bir dakikada giren 1500 ml kanın %20-25'i hepatik arter, %75-80'i ise portal ven yoluyla sağlanır. Hepatik arter tamamen oksijenlenmiş kanı taşır. Portal ve hepatik venöz sistemlerde ven kapakçıkları yoktur (25).



Şekil 2. VCI vena cava inferior, lig teres ligamentum teres, rhv sağ hepatik ven, mhv orta hepatik ven, lhv sol hepatik ven (27 No'lu kaynaktan alınmıştır).

sıvı bu bölgeler arasında serbestçe dolaşır. Portal alandan kör uçlar halinde başlayan karaciğer lenf damarları birleşerek en son duktus torasikusa direne olurlar (8).

Karaciğer hem sempatik hem de parasempatik sinirleri alır. Sinirle karaciğere porta hepatis girer. Portal alanın diğer üyeleriyle birlikte portal kanallarda karaciğere dağılır. Sempatik lifler kan damarlarını, parasempatik lifler duvarlarında düz kas içeren büyük safra kanallarını sinirlendirirler. Olasılıkla da kan damarlarını da inerve ederler. Parasempatik nöron hücre gövdeleri sıklıkla porta hepatis civarında görülür (29).

2.1.4. Karaciğerin Histolojisi

Karaciğer diğer pek çok organ gibi stroma ve parankimadan oluşur. Bir organın kendine özgü fonksiyonlarını yerine getiren hücre ve yapıların oluşturduğu organ içindeki küçük organizasyonların tümüne parankima adı verilir. Parankimayı oluşturan, destek sağlayan ve çoğu kez organın çatı ve iskeletini oluşturan kapsül ve trabekül gibi bağ noktasından oluşan yapılar ve bu yapılar içerisinde organın içerisine girip dağılan damar ve sinirlerin oluşturduğu destek yapılarının tümüne de stroma adı verilir (8,30).

Karaciğer lobülü içinde lenfatik bir damar bulunmaz. Hepatositler ile sinüzoidleri döşeyen endotel hücreleri arasındaki potansiyel boşluğa Disse aralığı denir. İşte bu Disse aralığı lenfin oluşmaya başladığı alandır. Disse aralığında hepatositler arasında aktif madde alışverişi için uygun bir ortam meydana gelmiş olur. Disse aralığı lenfatik bir kanal değildir ve intersellüler boşluktaki gibi retiküler fibriller

Karaciğer stroması hilumda kalınlaşan ince bir bağ dokusu kapsülü ile örtülüdür. Organa giren ve çıkan damarlar, sinirler ve safra kanalları hilumdaki bağ dokusu kılıfının içerisinde organa giriş ve çıkış yaparlar. Hilumdan organ içerisine giren bağ dokusu bölmeleri gittikçe incelerek içerisindeki damar ve sinirlerle beraber ilerler ve karaciğeri loblara ve en küçük morfolojik ünitesi olan lobüllere (lobçuklara) ayırır. Sonuçta karaciğer sayıları bir milyonu bulan, ortalama çapları 0.7-2 mm uzunlukta olan karaciğer lobüllerine ayrılmış olur. Bir karaciğer lobülünü komşu lobüllerle birleştiği köşelerde ince bağ dokusu artarak genişler ve kabaca üçgen yada dörtgen alanlar şeklinde izlenir. Lobüllerin kesiştiği bu genişlemiş bağ dokusu alanlarına Portal alan veya Portal aralık veya Kiernan aralığı adı verilir (8,10). Portal alanda lobülün içerisine dağılan üç önemli yapıya ait kesitler izlemek mümkündür:

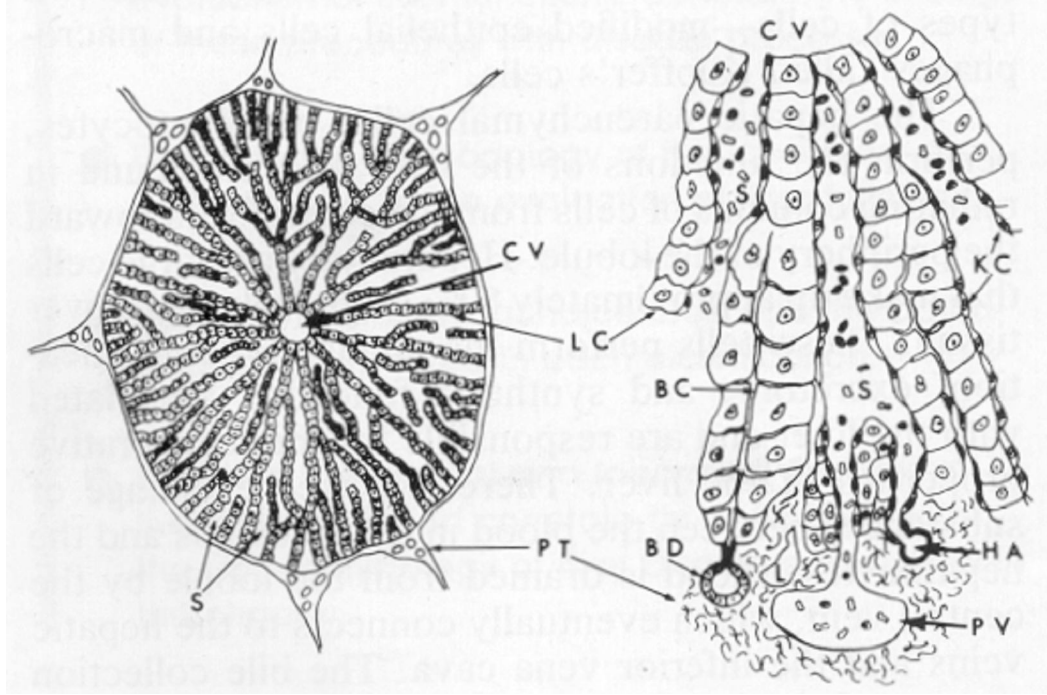
1. Vena portanın dalı olan vena interlobularis
2. Arteriya hepatikanın dalı olan arteriya interlobularis
3. Safra boşaltım kanalı

Portal alanda yerleşim gösteren bu üç önemli yapıya Portal triad adı verilir. Venül genellikle en büyük çaplı olanıdır. Duvarı ince ve lümeni düzensizdir. Arter venüle göre daha düzgün lümenli ve daha kalın duvarlıdır. Çapı venüle göre daha küçüktür. Safra kanalının ise belirgin tek katlı kübik epitelidir. Bu üçlü yapının yanı sıra portal alanda lenf damarı ve sinir fibrilleri de bulunur. Portal alanda yer alan sempatik (postganglionik) sinir fibrilleri Çölyak gangliyonundan, parasempatik (preganglionik) sinir fibrilleri ise n. vagus'tan kaynaklanır. Her iki sistem de portal alandaki arteriyel kasların innervasyonunu sağlar (8).

Karaciğer parankiması hepatositlerden meydana gelir. Karaciğer parankiminin organizasyonu ile ilgili olarak kabul edilen üç önemli histofizyolojik karaciğer lobül modeli vardır.

1. Klasik Karaciğer Lobülü: köşelerinde portal alanlar, ortada ise vena santralisin yer aldığı kabaca altıgen şekilli yapılardır. Hepatositler, merkezden periferine doğru hücre kordonları şeklinde kümeler oluşturarak uzanırlar. Kordonlar arasındaki bölgede ise sinüzoidler yer almaktadır. Kan akımı periferden merkeze doğrudur.

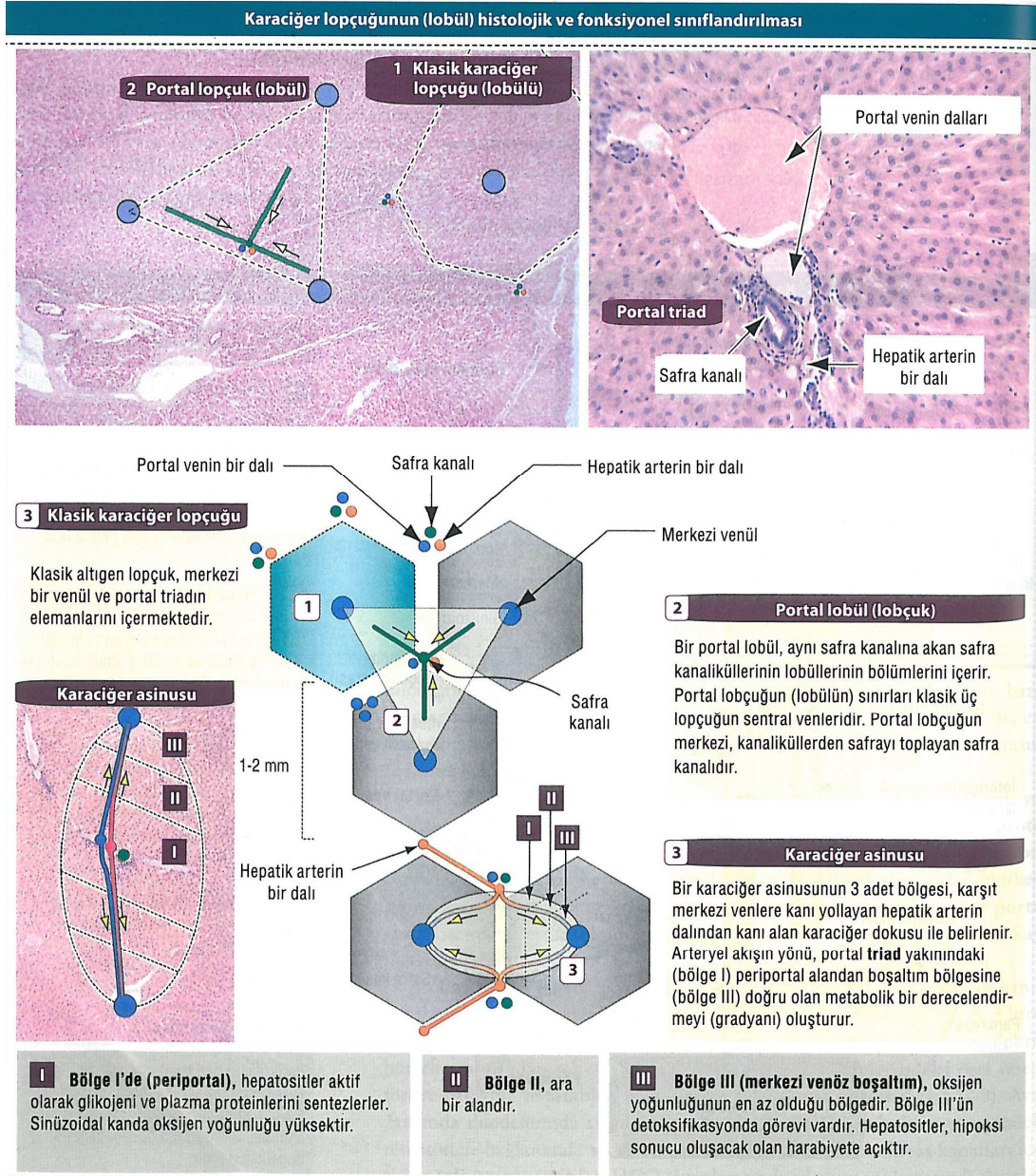
2. Portal Lobül: Bu model, hepatositler tarafından salgılanan safranın salgılanışı dikkate alınarak tasarlanmıştır. Bu modelin iyi anlaşılabilmesi için safranın salgılandıktan sonra izlediği yolun bilinmesinde fayda vardır. Safra hepatositlerce sentezlenir ve iki hepatosit komşuluğundaki küçük hücreler arası boşluğa salgılanır. Buraya safra kanalikülü adı verilir. Bu kanalın duvarı hepatosit membranlarınca oluşturulur. Rutin ışık mikroskopik preparatlarda gözlenemez, ancak histokimyasal olarak göstermek mümkündür. Elektron mikroskopik mikroskoplarda görmek mümkündür. Birbirlerine komşu iki hepatosit arasında 1-2 mm çapında küçük bir boşluk olarak izlenir. Bu kanaliküllerin küçük mikrovilluslar içerdiği gözlenebilir. Daha sonra hepatositler arasında yer alan bu küçük kanaliküller bir lobül içindeki hücrelerin arasından kanla temas etmeksizin içerdiği zonula okludensler sayesinde bir labirent ağ oluştururlar. Daha sonra her bir lobülün periferinde portal alana girmeden önce, çapı ortalama 0.5-2 mm olan Hering kanalı (safra kanalcığı) adı verilen daha genişçe bir kanal oluştururlar. Hering kanalları da sonuçta portal alandaki ortalama çapları 15-40 mm olan interlobüler safra kanallarına açılırlar. Görüldüğü gibi safranın akışı kan akımının tersine merkezden periferedir. Bu kanalı tek katlı kübik kanal hücreleri döşer. Portal alanlardaki safra kanalları birleşerek genişlerler sağ ve sol ana safra kanalını oluşturarak karaciğeri terk ederler. Karaciğerden çıkan duktus hepaticus communis safra kesesinden gelen sistik kanalla birleşir ve duktus koledokus adını alarak duodenuma açılır.



Şekil 3. Karaciğerin poligonal şekilli parankim hücreleri santral venden (CV) lobülün çevresine doğru her doğrultuda kordlar (LC) şeklinde yayılmışlardır. Bu kordların içinde duvarları karaciğer hücreleri tarafından oluşturulan tüp boşluklar halinde safra kanal

Hepatositte üretilen safranın akışı dikkate alınarak geliştirilen portal lobül üç klasik karaciğer lobülünün vena santralislerinin birleştirilmesi ile oluşan üçgenden meydana gelmektedir. Bu üç lobülde oluşan safra ortada yer alan portal alandaki safra kanalına ortak olarak akmaktadır.

3. Portal Asinüs: Diğer iki modele göre daha fonksiyonel ve daha fazla kabul gören bir modeldir. Portal asinüs lobül yapısı, dejenerasyon, rejenerasyon, vasküler perfüzyon ve bazı maddelerin spesifik toksik etkilerini açıklayabilmek açısından önemlidir. Portal asinüs, iki komşu klasik lobül içerisindeki dağıtıcı arteriyol ve venülden kanlanan hücre gruplarından oluşur. Sınırları komşu iki lobülün portal alanları ve vena santralislerinin birleştirilmesi ile çizilir ve enine kesitte baklava dilimi biçiminde izlenir. Bu modele göre, bir lobüldeki hepatositler dağıtıcı damarlardan aldıkları farklı içerik ve miktardaki kanlanmaya göre üç ayrı zona ayrılır (5,10,31).



Resim 1. Karaciğer lopçuğunun (lobül) histolojik ve fonksiyonel sınıflandırılması (5 No'lu kaynaktan alınmıştır).

Periferik Zon (Zon D): Kan lobülün periferinden merkezine doğru ilerlediğinden glikojen, oksijen ve diğer maddelerden en zengin kanla karşılaşan bu zondaki hepatositler sürekli aktivite gösterirler. Glikojen en çok bu hücrelerde depolanır ve açlık durumunda kana glikozunu ilk olarak bu hücreler salar. Bu zondaki hücreler dolaşım bozulduğu sırada en geç ölen ve rejenerasyonun ilk izlendiği hücrelerdir (5,30,32).

Ara Zon (Zon II): Kana ikinci derece cevap veren orta bölgedeki hücrelerdir. Orta düzeyde aktivite gösterirler. Bu zonun sınırlarını keskin olarak ayırmak mümkün değildir (5,8,10).

Santral Zon (Zon III): Vena santrali çevreleyen en içteki hepatosit hücre gruplarından oluşur. Periferik zondaki hücelere göre daha az aktiftirler. Organelleri daha az gelişmiştir. Hücreler özellikle düz endoplazmik retikulumdan (DER) zengindir. Bu zondaki hücreler, perfüzyon azaldığı zaman ilk iskemik nekroza uğrayan ve patolojik ve fizyolojik yağ birikiminin ilk olarak izlendiği hücrelerdir.

Bu şekilde tanımlanan zonal düzenlenme sayesinde hepatositlerin çeşitli toksik maddelere karşı ya da değişik hastalıklarda farklı derecelerde hasar görmelerinin nedeni açıklanmaya çalışılır (5,32).

2.1.5. Karaciğerin Hücreleri ve Fonksiyonları

2.1.5.1. Hepatositler

Hepatositler bir hepatik lobülün fonksiyonel olan ekzokrin ve endokrin hücreleridir, polihedral, altı ya da daha fazla yüzeyli ve 20-30 µm çapındadır. Ürettiği safra nedeniyle ekzokrin, sentezlediği bazı maddeleri kana vermesi özelliği nedeniyle endokrin bir hücre niteliğini taşımaktadır. Karaciğer hücre popülasyonunun %80'ini meydana getirirler. Hepatositler, sinüzoid boşlukları ile çevrili, birbirleri ile anastomoz yapan bir hücre kalınlığında plaklar oluşturur. Perisinüzoidal disse aralığı hepatositleri sinüzoiddeki kandan ayırır (5,8,10).

Portal triadı oluşturan yapılar, bağ dokusuna gömülü vaziyette, hepatik lobülden sınırlayıcı hepatosit plakları ile ayrılır. Hepatik arterden ve portal venden gelen kan sinüzoidlerin içerisine akar ve sonra merkezi venüle boşalır. Yukarıda belirtildiği üzere, safra akışı hepatositlerden portal alandaki safra kanalına olacak şekilde ters yöndedir (5,32). Bir hepatositin;

1. bazolateral bölge

2. apikal bölge

olmak üzere iki adet hücresel bölgesi bulunmaktadır. Bazolateral bölge çok sayıda mikrovillus içerir ve yüzü disse aralığına doğrudur. Hepatosit ile sinüzoidleri

döşeyen endotel hücreleri arasındaki potansiyel boşluğa disse aralığı denir. Disse aralığındaki fazla sıvı, hepatik lobülün dış kısmında bulunan Mall aralığı tarafından toplanır. Birbirine komşu hepatositlerin yan yüzeylerinde bulunan gevşek bağlantı kompleksleri (neksuslar), fonksiyonel açıdan hücreler arası işbirliğini sağlamaktadır. Bazolateral bölge kandan kaynaklanan maddelerin emilimine ve plazma proteinlerinin (albumin, fibrinojen, protrombin ve koagülasyon faktörleri V, VII, IX gibi) salgılanmasına katkıda bulunur. Hepatositlerin, kanın pıhtılaşması için gerekli olan çok sayıda plazma proteinini sentezlediği de unutulmamalıdır (5,8). Apikal bölge, mikrovilluslarla çevrelenmiş bir girinti şeklinde, hepatositin ekzokrin bir ürünü olan safranın dışarı kaçışını önlemek üzere kenarları tıkayıcı bağlantılarla sıkıca kapatılmış olan safra kanalikülünün kenarını çevrelemektedir. Hepatositler bir



Resim 2. Yetişkin dişi sıçan karaciğer dokusunda vena santralisten, perifere ışınal olarak uzanan hepatositler. HE x 66 (33 No'lu kaynaktan alınmıştır).

çok sayıdadır. Hematoksilen-Eozin ile boyanmış karaciğer preparatlarında çok sayıda mitokondri nedeniyle sitoplazma genel olarak asidofilik boyanır.

Lizozomlar, yaşlanmış olan plazma glikoproteinlerini, bazolateral bölgede hepatik lektin membran reseptörü ile asialoglikoprotein reseptörü içine alarak yıkıma uğratar. Bu reseptörün bağlanma afinitesi, sialik asitin ortadan kaldırılmasını takiben terminal galaktoza karşı oluşmaktadır. Hepatositlerdeki lizozomlar, ferritinin yıkım

ya da iki tipik nükleolus içeren bir ya da iki yuvarlak nükleusa sahiptir. Hepatositlerin %25'i binükleerdir. Binükleer hepatositler, nükleus volümü ve DNA içeriğinin artması ile gerçekleşen endomitosis sonucu meydana gelir. Yüksek enerji gereksinimi olan her bir hepatositin vital veya enzim boyamaları ile ortalama 800-2000 adet mitokondri içerdiği gösterilmiştir. Yuvarlak ya da oval biçimli mitokondrilerin kristalleri

ürünü olan ve eriyebilir ferritin ile eriyemeyen hemosiderin şeklinde bulunan demiri depolamaktadırlar (6,9,11,34).

Her bir hepatosit ortalama 200-300 adet peroksizom içermektedir. Bunların çapları 0.2-1 μ arasında değişebilir. Peroksizomlar, membran ile sarılmış olup, hidrojen peroksit açığa çıkartan yüksek miktarda oksidazlar içermektedirler. Hidrojen peroksitin toksik bir metabolit olması nedeni ile katalaz enzimi bu ürünü oksijen ve su açığa çıkartacak şekilde yıkıma uğratar. Bu katalitik olay, hepatositlerde ve böbrek hücrelerinde meydana gelmektedir. Peroksizomlar, daha önceden var olan peroksizomlardan tomurcuklanma yolu ile oluşmaktadırlar. Böylece bu organel, peroksizomal matriks proteinlerini taşır. Bir peroksizom, değişik metabolik yollarda kullanılacak olan yaklaşık olarak 50 adet enzimi içermektedir (5,8).

Sinuzoidler hepatosit hücre kordonlarının aralarını dolduran, içerisi arteriyovenöz kan içeren özelleşmiş geniş çaplı kapillerlerdir. Portal alanda yerleşen inter lobüler arter ve venin dalları olan dağıtıcı arteriyol ve venülden kanlanırlar. Bu damarlar hücre kordonları arasındaki seyri boyunca yer yer genişlemeler ve daralmalar gösterir. Birbirleriyle anastomozlaşan sinüzoidler en sonunda klasik karaciğer lobülünün merkezinde yer alan vena santrale açılırlar. Karaciğer sinüzoidlerini döşeyen endotel hücreleri arasında ya da lümene bakan yüzünde başka bir hücre tipine daha rastlanır. Kupffer hücreleri olarak bilinen bu hücreler, organizmada yaygın dağılm gösteren mononükleer fagositik sistemin üyesidir (5,8,10).

2.1.5.2. Kupffer Hücresi

Kupffer hücresi ilk kez 1876 yılında von Kupffer isimli araştırmacı tarafından, karaciğer perisünizoidal bağ dokusu içerisinde, özel altın klorid boya tekniği kullanılarak gösterilmiş ve yıldıza benzetilerek "Sternzellen" adı ile (stern; yıldız) histoloji literatürüne girmiştir. Aynı araştırmacı daha sonra bu hücrelerin mürekkep boyasını hücre içine aldığı bulmuş ve bir çeşit endotelial hücre olduğu kanaatine varmıştır. Aschoff, 1924 yılında "Retikuloendotelial sistem" kavramını geliştirmiş ve koloidal boyaları hücre içine alan hücrelerin tümünün aynı kökten geldiğini savunmuştur. 1980'li yıllarda von Kupffer'in tanımladığı hücrelerin karaciğerde A vitamini ve yağ depolanması ile ilgili olduğu bulunmuştur. Genel

olarak fagositoz özelliği ile bilinmekle birlikte günümüzde aydınlanmaya başlanan bazı hücrelerarası etkileşimlerde bulunduğu da anlaşılmıştır (30,35).

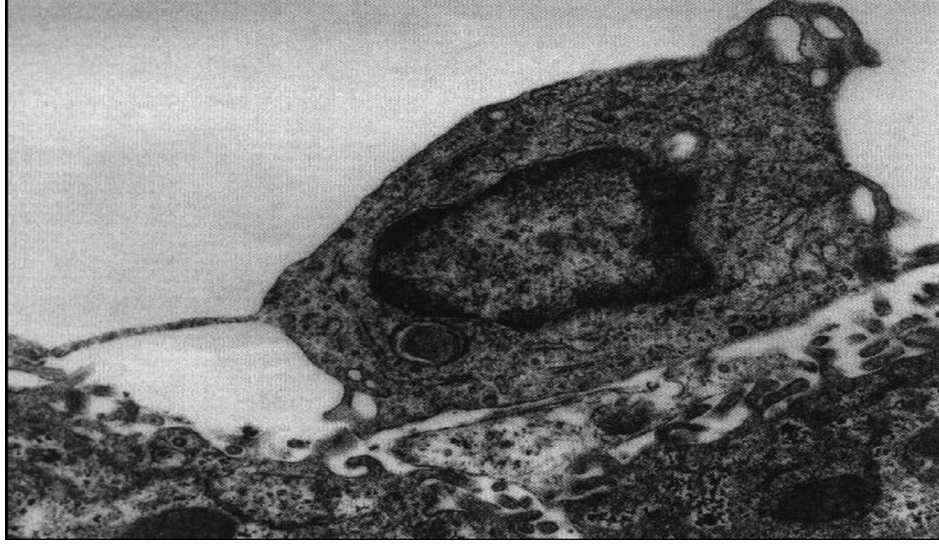
Karaciğer sinüzoidleri içerisinde çok değişik şekil ve yerleşimde bulunabilirler. Bu özellik onları endotelyal ve yağ depolayan hücrelerden belirgin şekilde ayırmaktadır ve hareketli hücre oldukları fikrini daha ilk elektron mikroskopik gözlemlerden sonra vermiştir. Kupffer hücreleri ile endotel hücrelerinin membranları yüz yüze komşuluk yapabilirler ancak bu iki hücre membranı arasında özel kontakt noktaları veya desmozom gibi yapıların varlığı rapor edilmemiştir. Ancak endotelyal hücrelerin fenestrasyonlarından Kupffer hücrelerinin mikrovillus uzantılarının Disse aralığına doğru çıkıntı yaptığı ve bu şekilde hepatosit mikrovillusu ile temasta olduğu gözlenmiştir. Kupffer hücresi, uzantıları aracılığı ile sinüzoid içerisinde bulunan tüm hücreler (pit hücreleri, endotel hücreleri) ve endotelde bulunan fenestrasyonlar yolu ile hepatosit ve yağ depolayan hücreler ile temas eden membranlara sahiptir (5,10,35).

Karaciğer dokusunda normal fizyolojik koşullarda bu hücrelerin hacmi, fagositik ve enzimatik aktivitesine göre homojen değil heterojenik bir özellik taşır. Genelde, ebatça büyük ve daha yüksek aktiviteye sahip olanlar lobül periferinde portal sahalara yakın yerleşim gösterirken küçük ebatlı olanları santral ven'e yakın lokalize olur (35,36).

Hücre çok değişik şekillerde, membranı girintili çıkıntılı özellikte olup annüler lamella ve endositozis ile ilgili gelişmiş yapılardan dolayı kolayca ayırt edilebilmektedir. Bir membranla çevrili mikropinositotik veziküller, makropinositotik vakuoller, solucanımsı injavinyasyonlar dikkat çekici özelliklerdir. Hücre içi çok zengin lizozomal yapılar hücre içi sindirim kapasitesini yansıtmaktadır. Çok iyi gelişmiş granüler endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi hücrede aktif bir protein sentezi olduğunu göstermektedir (10,35).

Kupffer hücrelerinin iki kökeni olduğu kabul edilir. Kemik iliğinden gelen monositer seriye ait hücreler kan yolu ile karaciğere taşınır ve böylece ilk kaynak oluşmuş olur. Buradaki yerleşik monositler Kupffer hücreleri olarak adlandırılırlar. Gerekli durumlarda (karaciğer doku kaybı veya patolojilerinde) bu hücrelerin kendilerini yenileme hızları ve gücü önemli bir lokal kaynak olma durumunu

doğurur. Kısacası intra ve ekstrahepatik Kupffer hücre kaynağı vardır. Karaciğer içerisinde bu hücrelerin gerekli yere göçü ile sayıca artması da söz konusudur (35).



Resim 3. Elektron mikroskobu ile görüntülenmiş bir kupffer hücresi (37 No'lu kaynaktan alınmıştır).

Karaciğerde kupffer hücreleri olarak adlandırılan makrofajlar endotel hücrelerinin lümenine bakan yüzeyinde bulunur. Başlıca fonksiyonları yaşlı eritrositleri metabolize etmek, hemoglobini sindirmek, immünolojik olaylarla ilgili proteinleri salgılamak ve kalın barsaktan portal kana geçen bakterileri ortadan kaldırmaktadır. Karaciğer hücre topluluğunun %15'ini kupffer hücreleri oluşturur. Bu hücrelerin çoğu fagositozda çok aktif oldukları peri portal lopçuk lümenlerinde yerleşmiştir (10).

2.1.5.3. Satelit Hücreleri

Karaciğer yıldızsı hücresi, ito hücresi olarak da bilinen bu hücreler, ilk kez Von Kupffer tarafından 1876 senesinde tanımlanmıştır (36). Mezenşimal kaynaklı olan bu hücreler endotel hücre tabakası altında, disse aralığına yerleşmiştir. Yağ içerirler ve vitamin A'nın metabolizması ve depolanmasında rol oynamaktadır (29,36). Endotel hücrelerine bitişik veya hepatositlerin mikrovillusları içerisine gömülüdür. Endotelin altında ve sinüzoidlerde uzun stoplazmik uzantıları bulunan hepatositler arasında bağlantıyı sağlayan hücrelerdir. Aynı zamanda birbirleriyle ve sinir sonlanmalarıyla da bağlantı yaparlar (36).

Satellit hücrelerinin elektron mikroskopik görünümü; çekirdeği sıkıştırmış yağ damlacıkları, kısmen gelişmiş GER, hücre iskeletini oluşturan yapılarda azalma, az sayıda mitokondriyon ile karakterizedir. Satellit hücreleri rutin yöntemler ile (hemotoksilen-eozin) boyanmış kesitlerde tanımlamak kolay değildir. Özel boyama olarak toluidin mavisi, bazik fuksin gibi histolojik boyalar kullanarak gözlemek mümkündür. Gümüşleme tekniği ile insan karaciğer doku kesitlerinde sentrolobuler alanlarda çok sayıda satellit hücresi gözlenmiştir. Satellit hücrelerinin gözlenmesi A vitaminin boyanmasına bağlıdır (29,36).

Satellit hücreleri ve bunlardan türeyen miyofibroblast benzeri hücrelerin değişik işlevleri vardır; retinoidleri çözüp serbestleştirirler, içlerine alırlar ve depolarlar. Özellikle miyofibroblast benzeri hücreler, ekstrasellüler matriks proteinlerini (kollojen tip 1, 3, 4, 5 ve 6, fibronektin, laminin, tenaskin, undulin, hiyaluron ve proteoglikanlar) sentezler ve salgılar (36).

2.1.6. Karaciğerin Fizyolojisi:

Karaciğer vücutta diğer sistemlere olan etkileri yanında kendi oluşturduğu düzenekler ile de karmaşık bir çok fonksiyonun düzenleniminden sorumludur. Bu fonksiyonlar esas olarak üç ana başlık halinde incelenebilmektedir.

1. Depolama görevi ve barsaktan dönen kanın filtrasyonu,
2. Gastrointestinal yolla safra salgılama görevi dolayısıyla salgı fonksiyonları,
3. Metabolik fonksiyonları.

2.1.6.1. Karbonhidat Metabolizması

Karbonhidrat metabolizması birçok değişik metabolik işlemi kapsamaktadır. Bunlar;

1. Glikojenin depolanması,
2. Galaktozun fruktoz ve glikoza dönüşümü,
3. Glikoneogenezis,
4. Karbonhidrat metabolizmasının ara ürünlerinden çok sayıda önemli kimyasal türevlerinin formasyonu.

2.1.6.2. Yağ Metabolizması

Yağlar karaciğer ile birlikte organizmadaki hemen her organda metabolize edilmektedirler. Ancak karaciğer hücrelerinde temel olarak;

1. Yağ asitlerinin enerji sağlayabilmek amacıyla daha küçük bileşenlere yıkımı,
2. Esas olarak karbonhidratlardan ve daha az oranda proteinlerden trigliserid sentezi,
3. Kolesterol ve fosfolipid gibi diğer lipidlerin yapımı ile spesifik fonksiyonlar gerçekleştirilmektedir.

2.1.6.3. Protein Metabolizması

Proteinler genel olarak vücudun %75'lik bölümünü oluşturur. Karaciğer protein sentezinde en aktif organlardan biridir. Organizmada protein metabolizması için karaciğer son derece önemlidir. Bu metabolizmaya ait fonksiyonların kısa süreli kaybı dahi ölümlerle sonuçlanabilir. Karaciğerde temel olarak;

1. Aminoasitlerin deaminasyonu,
2. Üre yapımı,
3. Plazma proteinlerinin sentezi,
4. Çeşitli aminoasitlerin ve vücut metabolik süreçlerinde önem taşıyan diğer bileşimlerin birbirine dönüşümlerini sağlamak fonksiyonları gerçekleştirilmektedir.

2.1.6.4. Safra Salınımı

Yağların emilim ve sindirim faaliyetlerinde önemli bir rol almaktadır. Safra yine kandan bazı önemli ürünlerin sekresyonunda görev almaktadır. Bunlar; bilirubin, hemoglobin yıkım ürünleri ve karaciğer hücreleri tarafından aşırı sentezlenen kolesteroldür.

2.1.6.5. Pıhtılaşma Faktörleri ile İlişkisi

Karaciğer aynı zamanda bazı pıhtılaşma faktörlerinin sentezinde de görev alır. Bunlar; fibrinojen, protrombin, faktör V, VII, IX ve X'dur. Fibrinojen

dışındakiler aktif hale gelebilmeleri için K vitaminine ihtiyaç duyarlar. Karaciğer fibrinolitik faktörlerin hem sentezinden hem de yıkımından sorumludur. Aynı zamanda dolaşımında aktif halde bulunan pıhtılaşma faktörlerini de uzaklaştırmaktadır(28,30).

2.1.6.6. Karaciğerin Diğer Fonksiyonları

1. Vitaminlerin depolanması.
2. Demirin depolanması.
3. İlaçların, hormonların ve diğer zararlı ajanların detoksifiye edilip atılması (9,36).

Hücreleri yavaş yenilenmesine karşın karaciğer rejenerasyon için uygun bir organdır. Karaciğer dokusunun cerrahi yolla ya da toksik maddelerin etkisiyle kaybı, karaciğer hücrelerinin bölmesini başlatan ve dokunun orijinal kitlesi oluşuncaya kadar süren bir mekanizmaya neden olur. Sıçanlar karaciğer ağırlığının %75'lik kaybını 30 günde yenileyebilirler. İnsanlarda bu kapasite sınırlıdır. Rejenerasyon olayının chalon'lar adı verilen maddelerle kontrol edildiğine inanılmaktadır. Chalonlar bazı hücrelerin mitotik bölünmesini baskılar (30).

2.2. p53 Geni

P53 proteini 1970'li yılların sonlarında SV40 DNA virüsünün büyük transform antijenine bağlı nükleer fosfoprotein olarak bulunmuştur (39). Tümör baskılayıcı bir gen olan p53 geni 17. kromozomun kısa kolunda yer alıp moleküler ağırlığı 53 kD olması nedeni ile bu adı almıştır (17,40). Hücre siklusunda normal koşullarda inaktif halde bulunan p53 geni hipoksi, UV ışınları, radyasyon kimyasal ajanlar gibi stres ajanlarına bağlı DNA'da hasar oluştuğunda hızla eksprese olur ve hücre siklusunda G1-S fazları arası geçişi geciktirerek DNA tamiri için hücreye zaman kazandırır (41,42,43). Yani DNA lezyonu saptandığında, p53 hücre siklusunu G1 fazında durdurur, böylece hücrenin S fazına girişini önler. Ardından, ya tamir mekanizması proteinlerini ya da apoptozise yol açan proteinleri aktive eder (19).

P53; hücre siklusunun kontrolü, DNA sentezi ve tamiri, hücre differensiyasyonu ve programlı hücre ölümünde rol oynamaktadır. Mutant formları

resesif tümör supresör genin karakteristiklerine sahip olup, dominant onkogen olarak rol da oynayabilir (44,45).

2.3. Apoptozis

2.3.1. Apoptozis Tanımı ve Tarihçesi

Canlıların temel karakterlerinden birisi olan ölüm gerek hücre bazında, gerekse organizma bazında sıkça karşılaşılan bir olaydır (13). Genellikle programlı hücre ölümüne eşdeğer olarak kabul edilen apoptozis, çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan “hücre intiharı” programlarının gelişimsel ve/veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Bir başka deyişle, hücrelerin, populasyonun geri kalanının iyiliği gerektirdiğinde herediter olarak kendilerinde var olan intihar programını devreye sokarak programlı bir şekilde, çevreye hiç zarar vermeden yaşamlarını yitirmelerine denir (14).

Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Örneğin virüsle enfekte hücreler bu yolla ortadan kaldırılır. Hasarlı DNA’da apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA’sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi büyük önem taşımaktadır. Apoptozis, doku gelişimi esnasında istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde de rol alır. Örneğin fazla sayıda üretilen nöronların %50’den fazlası programlanmış hücre ölümü yoluyla ortadan kaldırılır. Ayrıca akut hücre hasarı durumunda da apoptozis rol almaktadır (14,15,21).

Yunanca’da “ağaçların yapraklarını dökmesi” anlamına gelen apoptozis, ilk kez biyomedikal literatürde 1972 yılında Kerr tarafından “mitozun karşıt anlamı” olarak kullanılmıştır (14,16). Yine bu tarihte Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanmış olan apoptozis, önceleri büzüşme nekrozu olarak tanımlanmış ama sonrasında sürecin nekrozdaki tamamen farklı olduğu ispatlanmıştır (12). Nitekim, apoptoziste görülen morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler nekrozdaki tamamen farklıdır. Bu farklar şekil 4’te karşılaştırılmıştır. Apoptotik hücre ölümünde temel morfolojik değişiklikler; hücre büzüşmesi, nükleer membranın altında kromatin

yoğunlaşması, hücre zar yüzeyinde cepçiklerin oluşması, DNA kırıklarının gözlenmesi, hücre iskeletinin yıkılması ve apoptotik cisimlerin oluşmasıdır (46,38).

Apoptozis sürecinin genetik temelleri ilk olarak bir metod olan *Caenorhabditis Elegans* (CE) üzerinde çalışılmış ve elde edilen veriler tıp alanında önemli açılımlar sağlamıştır (39). Bu çalışmada keşfedilen genler “*Caenorhabditis Elegans* Death” sözcüklerinin baş harflerinden dolayı “ced genleri” olarak isimlendirilmiştir.(40). CE’de görülen apoptozis modelinin insanlarda da benzer olduğu ancak bu sürecin çok daha kompleks bir yapıda işlediği görülür (41).

2.3.2. Apoptozisin Önemi

Embriyogenez sırasında bazı canlılarda parmaklar arasındaki perdenin ve damak füzyonu sonrası kalıntı epitel hücrelerin ortadan kaldırılmasında olduğu gibi, organogenez sırasında apoptozis, fazla üretilen hücrelerin ortadan kaldırılmasını da sağlamaktadır.

Apoptozisin homeostazis içindeki yeri:

1. Metamorfoza uğramış veya yaşlanmış ve bu nedenle fonksiyonlarını kaybetmiş hücrelerin ortadan kaldırılması,
2. Hormona bağımlı involüsyon (örn. prostat, endometrium ve meme dokusu hücrelerinde),
3. Sürekli çoğalan hücre gruplarının azaltılması (örn. Gastrointestinal sistem hücreleri, deri v.b.),
4. İmmün hücrelerin seçimi (örn. sitokin deplesyonundan sonra B ve T lenfositlerin ve timusta otoreaktif hücrelerin ortadan kaldırılması).

Apoptozisin patolojik süreçlerdeki rolü:

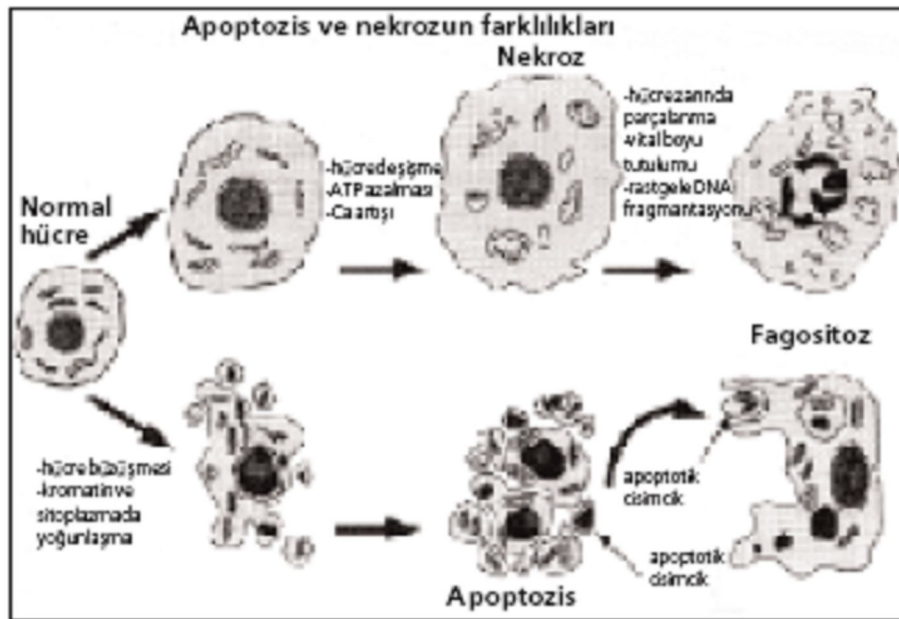
1. Tümörlerde, hem büyüme hem de regresyonda hücre ölümü (kemoterapi, radyoterapi, hormon tedavisiyle ve spontan regresyonda),
2. Hormona bağımlı dokularda patolojik atrofi,
3. Parankimatöz organlarda duktus tıkanmasına bağlı patolojik atrofi (örn, karaciğer),
4. Sitotoksik T lenfositleri ile oluşturulan hücre ölümü,

5. Bazı viral hastalıklarda hücre ölümü (örn. HIV-1, HCV, Adenovirüs enfeksiyonlarında),
6. Çeşitli zedeleyici etkenlerle oluşan hücre ölümü (hipertermi, radyasyon, sitotoksik kemoterapi, hipoksi gibi nekroz oluşturan etkenler) (42).

2.3.3. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar

Yıllardan beri klasik metodlarla apoptozisi nekrozdan ayırmak zor olmuştur. Hücre ölümünün hangi mekanizma ile olduğunu belirlemek her zaman mümkün olmamıştır (13). Apoptozis, klasik hücre ölüm şekli olan nekrozdan bir çok özelliği açısından oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmasıdır (14).

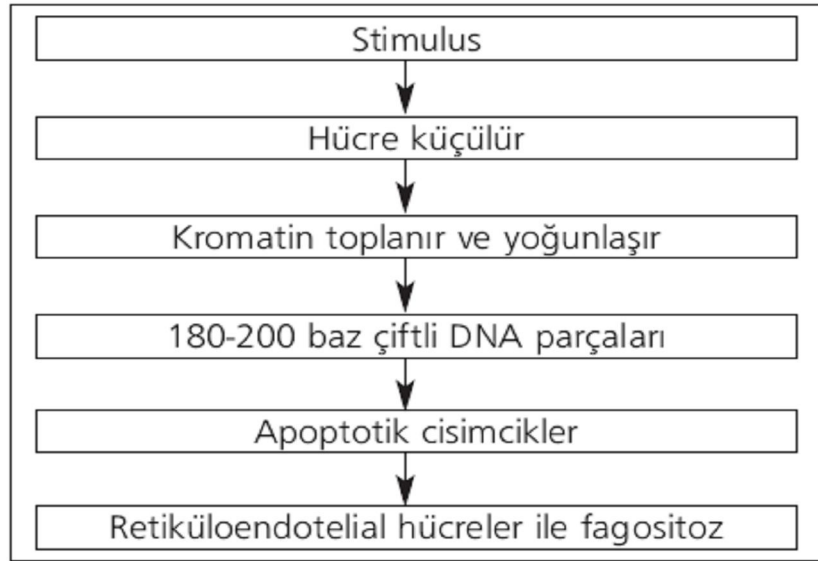
Nekroz, fizyolojik bir ölüm şekli değildir. Apoptozis ise hem fizyolojik hem patolojik şartlarda meydana gelmektedir. Apoptozis morfolojik olarak kendine özgü bir yapı içerir. Nekrozda, hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptoziste tam tersine hücre küçülür. Nekrozda, kromatin paterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ancak apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (chromatin aggregation) ve yoğunlaşır (chromatin condensation). Nekrotik hücrenin plazma membranı, bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına doğru hücre içi materyalinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı sağlamdır ve üzerinde küçük cepçikler oluşur. Nekrotik hücre, daha sonra



Şekil 4. Apoptozis ve nekrozis arasındaki farklar (15 No'lu kaynaktan alınmıştır).

lizise uğrar ancak apoptotik hücre küçük cisimciklere (apoptotic bodies) parçalanır. Apoptotik cisimcikler zar ile kaplıdır, değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içerir. Nekrozda hücre içeriği dış ortama salıverildiğinden enflamasyon reaksiyonu uyarılır. Ancak apoptoziste apoptotik hücre veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden enflamasyon oluşmaz (Şekil 4) (13,14,15,).

Apoptozisin en özgün yönü, hücre DNA'sının nükleozomlar arası bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru yer değiştirmesidir (phosphatidylserine translocation). Bu değişim, apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (14).



Şekil 5. Apoptozisin morfolojik görünümü (14 No'lu kaynaktan alınmıştır).

2.3.4. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis, hücre dışı ve hücresele seviyede oluşan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir. Hücresele düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligant (FasL) ve TNF isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir. Bunun dışında apoptozis viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon gibi bazı faktörler ile de başlatılabilir. Ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan

Fizyolojik aktivatörler	Hasara bağlı indüklenme	Tedavi ajanları	Toksinler
TNF ailesi (FasL, TNF)	Isı şoku	Kemoterapötikler Sisplatin, Bleomisin	Etanol
Transforming growth factor beta (TGF-β)	Viral infeksiyonlar	Gama Radyasyon	Beta-amiloid peptid
Nörotransmitterler; Glutamat, dopamin	Bakteriyel toksinler	UV radyasyon	
Büyüme faktörünün seviyesinde düşüş	Onkogenler (myc, rel, E1A)		
Kalsiyum	Tümör süpresör gen (p53)		
Glukokortikosteroidler	Sitotoksik T hücreler		
	Oksidanlar		
	Serbest radikaller Besin eksikliği ve antimetabolitler		

Tablo 1. Apoptozisi etkileyen hücre dışı ve hücre içi etkenler (14 No'lu kaynaktan alınmıştır).

p53 geni, reaktif oksijen radikalleri (hem mitokondri, hem plazma membranı, hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak) apoptozisi tetikleyebilmektedir. Apoptozisi tetikleyen diğer hücresel düzeyde ve hücre dışı ajanlar Tablo 1'de gösterilmiştir (14,15).

2.3.5. Apoptozis Düzenleyici Genler

2.3.5.a. Bcl-2: Lymphoma-leukemia-2 geninin kısaltılmış adıdır. İsminden de anlaşıldığı gibi ilk olarak insan folliküler B lenfomalarında kromozomal kırılma noktalarında keşfedilmiştir (51). Dış mitokondriyal zar, endoplazmik retikulum ve nükleer zarda yer alan zar bağlayıcı bir proteindir (52). Apoptozis düzenleyici genlerin içinde önemli bir grubu temsil eder. Bu grup içinde bir kısım apoptozisi indüklemesine karşın, bir kısmı da baskılayabilir (51).

2.3.5.b. p53: Nükleer fosfoprotein bir tümör baskılayıcı gen olup, transkripsiyon faktör gibi davranır (20). Hücre nükleusunda normal koşullarda inaktif halde bulunan p53 geni hipoksi, UV ışınları, radyasyon, kimyasal ajanlar gibi stres ajanlarına bağlı DNA'da hasar oluştuğunda hızla eksprese olur ve hücre siklusunda G1-S fazları arası geçişi geciktirerek DNA tamiri için hücreye zaman kazandırır (41,42,43). DNA hasarı tamir olursa hücre siklusundaki blok ortadan kalkar. Ancak hasar tamir edilmezse p53 geni Bax proteinini aktive ederek ve Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3'e (IGF-BP3) bağlanarak hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar. Bu sayede malignite gelişimini engellemiş olur (41,42).

2.3.5.c. Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Ailesi Genleri: Virüslerden memelilere kadar bir çok farklı organizmada bulunan ve bcl-2 ailesi gibi apoptozisin düzenlenmesinde, baskılanmasında görev alan bir anti apoptotik molekül ailesidir (53). prokaspazlara ve aktif kaspazlara (caspase 3,7 ve 9) bağlanarak inhibisyonlarını gerçekleştirirler (47).

2.3.5.d. C-myc: Bir protoonkojen olan c-myc geni “janus” geni olarak bilinir. Hücre çoğalması veya apoptozisi uyarabilir. Hücre siklusunda kritik yönleri vardır. Örneğin; büyüme faktörlerinin uyarımına bağlı olarak hücrenin mitozunu sağlarken bu faktörlerin veya sinyallerin yokluğunda apoptotik süreci tetiklerler (54).

2.3.6. Apoptozisi Tetikleyen Ölüm Faktörleri ve Reseptörleri

2.3.6.a. Fas Ligand (FasL) ve TNF

Sitokinler, protein yapısında olup hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eder. Sitokinler, yapısal özelliklerine göre; sitokin bağımlı büyüme faktörü, TNF ve helikal sitokinler olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. Önemli bir apoptotik faktör olan Fas Ligand (FasL), TNF ailesinin bir üyesidir.

TNF; limfotoksin, CD 30 ligand, 4-1BB ligand, CD40 ligand, CD 20 ligand, OX-40 ligand ve TRAIL (TNF ilişkili apoptozisi indükleyen ligand) olarak da adlandırılmıştır. TNF, hedef hücredeki TNFR-1 (Tümör nekrozis faktör reseptör-1) ve TNFR-2 (Tümör nekrozis faktör reseptör-2) adlı reseptörleri ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. FasL, sitotoksik T lenfositlerde (CTL) ve natural killer (NK) hücrelerde bulunur. Hedef hücrede bulunan reseptörü Fas ile bağlandığında apoptozisi aktive eder.

FasL, Tip-II membran proteini gibi sentezlenir. FasL’in N terminali sitoplazmadadır. C terminali ise ekstrasellüler alana doğru uzanmaktadır. Membrana bağlı TNF ve FasL’in metalloproteinaz enzimleri aracılığı ile proteolizi sonucunda membrandan ayrılıp serbest hale geçen formları mevcuttur. Bu serbest formlarına, solubl TNF ve solubl FasL adı verilmektedir. Solubl formda bulunan TNF ve FasL’da apoptozisi aktive etmektedir. Ancak membrana bağlı TNF ve FasL’in, spesifik reseptörlerini aktive etmekte solubl formlarından daha etkili oldukları saptanmıştır (14,15,55).

2.3.6.b. Fas ve TNF Reseptör Ailesi

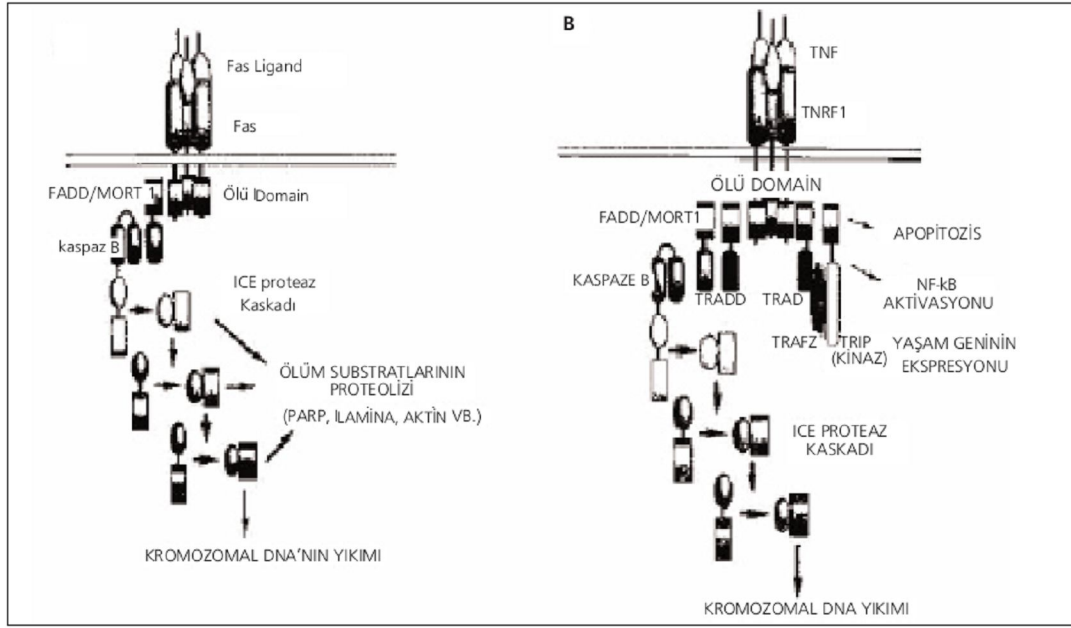
FasL ve TNF, apoptozisi başlatmak üzere hedef hücrede spesifik reseptörlere bağlanırlar. FasL'in reseptörü olan Fas, APO-1 veya CD-95 adıyla da bilinen bir tip-1 membran proteindir. Fas, TNF reseptör ailesinin bir üyesidir. Fas, lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı kanser hücrelerinde ve akciğerlerde bulunur. TNF reseptör ailesinin diğer üyeleri; TNFR-1, TNFR-2, lenfotoksinbeta, NGF-reseptör, CD40, CD27 ve CD30'dur. TNF ligandı, reseptörleri TNFR-1 veya TNFR-2 ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. TNFR-1, pek çok dokuda bu sinyalin aktivasyonundan ve iletiminden sorumlu iken TNFR-2, timositlerde TNF bağımlı sinyalden sorumludur. TNFR-1 ve Fas'ın sitoplazmik parçasında bulunan yaklaşık 80 aminoasitli homolog bölgeler, ölüm sinyalinin iletimini sağladıklarından ölüm bölgeleri olarak adlandırılmışlardır. Bu bölgeler, FADD (Fas ile ilişkili ölüm bölgesi) veya MORT1 ve TRADD (TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgesi) olarak adlandırılır. TRADD, TNFR-1 ve TNFR-2 reseptörlerinin, FADD ise Fas reseptörünün ölüm bölgesidir (14,56).

Şimdiye kadar anlattıklarımızı özetlersek; apoptozis FasL veya TNF ligandın hedef hücredeki ilgili reseptörleri ile bağlanması ile tetiklenir. Bu reseptörler, Fas, TNFR-1 ve TNFR-2'dir. Bu reseptörlerin aktive olan bölümlerine ölüm bölgeleri adı verilir. Ölüm sinyali bundan sonraki aşamada bu ölüm bölgeleri üzerinden hücre çekirdeğine kadar ileti kaskadı aracılığı ile iletilir (14).

2.3.7. Apoptozis Sinyalinin İletim Kaskadı

2.3.7.1. Kaskad Sistemi

FADD/MORT-1, Fas ile ilişkili, TRADD ise TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgeleridir. Aktive olan apoptotik sinyal, FADD/MORT-1 ölüm bölgelerine bağlanan kaspaz-8'e iletilir. Kaspaz-8, ölüm sinyali iletiminde rol alan



Şekil 6. Fas ve TNFR-1 reseptörleri ile tetiklenen apoptozis mekanizması A: Fas bağımlı apoptozis. FasL'in, Fas reseptörüyle bağlanması ile FADD/MORT1 ölüm bölgelerinin aktivasyonu sonucu kaspaz sisteminin aktive olması ve kromozomal DNA yıkımı. B: TNF bağımlı apoptozis. TNF'nin TNFR1 reseptörüyle bağlanması ile TRADD ve FADD/MORT1 ölüm bölgelerinin aktivasyonu sonucu kaspaz sisteminin aktive olması ve kromozomal DNA yıkımı (14 No'lu kaynaktan alınmıştır).

proteinazlardan biridir. Kaspaz-8'in aktive olması ile birlikte diğer proteinazlar kaskad halinde kendi kendine aktive olarak ölüm sinyalini nükleusa kadar iletirler ve sonuçta kromozomal DNA'nın yıkımına neden olurlar (22,57).

Sinyal iletim mekanizmasının önemli bir parçası olan Ca iyonunun bazı hücrelerde apoptozisi aktive ettiği ve ortamdaki Ca iyonu bloke edildiğinde apoptozis oluşmadığı görülmüştür (13,22).

2.3.8. Sinyal Yolunun Diğer Regülatörleri

Apoptozis sinyalini kontrol eden, baskılayan veya aktive eden bir çok regülatör mevcuttur. Bcl-2 ailesi bu regülatörlerden biridir. Bcl-2 ailesi, apoptozis sinyalini indükleyici ve baskılayıcı olabilen iki ayrı gruptan oluşmaktadır. İlk kez *C. elegans* üzerinde yapılmış genetik çalışmalarda Ced-9 adı verilen bir molekülün programlanmış hücre ölümünü engellediği bulunmuştur. Ced-9'un memelilerdeki eşdeğeri Bcl-2 olarak adlandırılmıştır. Bcl-2 ailesi, birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri proapoptotik yani apoptozisi indükleyici etkiye sahip iken diğeri antiapoptotik yani apoptozisi baskılayıcı etkiye

sahiptir. Örneğin Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W ve Mcl-1 apoptozisi inhibe ederken, Bax, Bik, Bak, Bad ve Bcl-xs apoptozisi aktive etmektedir. İnhibitör ve aktivatör üyelerin oranı apoptozisin dengesini sağlar (14,15,16).

2.3.9. Efektör Sitotoksik T Hücreleri ve Natural Killer (NK) Hücrelerin Apoptoziste Rolü

Sitotoksik T lenfositler (CTL), virüs veya bakteri ile enfekte olmuş hücreleri ve tümör hücrelerini tanır ve öldürürler. Aynı şekilde NK hücreleri de tümör hücrelerini öldürür. Perforin/granzim ve FasL sistemi CTL'ye bağlı sitotoksitede major yollardır. CTL, aktive olduğunda membran yüzeyindeki T hücre reseptörü virüs ile enfekte hücrenin MHC/antijeni ile etkileşir. İki ayrı yolla hedef hücre ortadan kaldırılır.

Birinci yolda; CTL membran yüzeyindeki FasL geni aktive olur ve çoğalır. Artmış FasL, hedef hücredeki Fas ile bağlanır ve ölüm emri verilir. Kaspazların da aktive olması ile hücre ölümü gerçekleştirilir.

İkinci yolda; CTL hücrelerinde meydana gelen uyarılma, perforin ve granzim içeren granüllerde sekresyona neden olur. Perforin/granzim ve FasL hücre ölüm programını bağımsız olarak tetiklenmektedir. Her iki süreçte apoptoziste rol oynar (14).

2.3.10. Apoptozis Süresince Hücrede Oluşan Biyokimyasal, Morfolojik ve Metabolik Değişiklikler

Morfolojik Değişiklikler: Apoptozis sürecinde meydana gelen birçok morfolojik değişiklik vardır. Bu hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybettikleri için küçülürler, büzülürler sitoplazmaların yoğunluğu artar ve organelleri birbirlerine yaklaşır.

Organellerde çok fazla bir değişiklik olmamakla birlikte; endoplazmik retikulumda geçici genişlemeler görülür.

Nükleer membran çevresinde kromatin toplanması ve kromatin yoğunlaşması görülür. Kromatinlerin buldukları bölgeye göre değişik şekil ve büyüklükte çöktüğü gözlenir (58). Çekirdeklerin piknotik oldukları gözlenir (59). Bütün bu süreçler sonrasında içlerinde sitoplazma ve organellerin de yer aldığı

membranla çevrili küçük parçalar oluşur ki apoptotik cisimler adı verilen bu yapılar apoptozisin belirgin morfolojik bulgusunu oluşturur (60).

Biyokimyasal Değişikler: Apoptotik süreç içinde hücrede birçok biyokimyasal değişiklikler görülür. Bunlar içinde DNA kırıkları oluşması, hücre iskeleti yıkılması, hücre zarı yapısı değişiklikleri ve hücre içi protein çapraz bağlanmaları gibi değişik özellikler bulunmaktadır (42).

DNA kırıklarının oluşması; apoptotik süreçte hedef proteinlerden bir tanesi DNA nükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazların bu proteini yıkacak endonükleazları serbestleştirmesi ile nükleus içine giren kalsiyum ve magnezyum bağımlı endonükleazlar DNA da kırıklara neden olur (58).

Hücre iskeletinin yıkılması; Özellikle aktinin yıkılması sonucu hücrenin normal konturlarında bozulma meydana gelir ve hücre normal görüntüsünü ve şeklini kaybeder (42).

Hücre membran değişiklikleri; Kaspazların litik etkisi ile hücre membran asimetrisi bozulur. Plazma zarının iç yüzeyinde bulunan anyonik fosfolipid olan phoshatidylserine yer değiştirir ve hücre zarının dış yüzeyine yerleşir (42,61). Hücre zarının dış yüzeyine yerleşen phoshatidylserine “eat me” sinyali vererek apoptotik hücrelerin tanınmasını ve fagositler tarafında temizlenmesini sağlar (62). Protein çapraz bağlanması; Transglutaminaz aktivasyonu ile protein çapraz bağlanması sağlanır ve apoptotik yapı sabitleştirilir. Böylece hücre içeriğinin dışarıya sızması ve olası enflamatuar cevap önlenmiş olur (58).

Metabolik Değişiklikler: Apoptozis sürecinde çoğu hücre tipin de erken dönemde sitozolde iyonize kalsiyumun sürekli arttığı gözlenir. Kalsiyum apoptozis sürecinde yapısal değişikliklere neden olan enzimleri aktive eder. Bu enzimler kalsiyum bağımlı nükleer endonükleaz, sitozolik proteinleri bağlayan transglutaminaz ve kalpain gibi kalsiyum bağımlı hücre iskeletini yıkabilen proteinaz ve lipid modifiye edici enzimlerdir (60).

Transglutaminaz sitoplazmik proteinlerin çapraz bağlanmasında görev alan enzimdir. Apoptoziste hücre içeriğinin dışarı sızmasını önleyerek, enflamasyonun tetiğinin çekilmesini engeller (63).

Lipid modifiye edici enzimler; apoptoziste membranın fosfolipid asimetrisinde görülen değişimler bazı hücrelerde ATP bağımlı fosfolipid translokaz tarafından sağlanır. Apoptozisin başlaması ile bu enzim aktifleşir ve fosfolipid asimetrisinin kaybolması sonucu makrofajlar apoptotik hücreyi tanır ve fagositoz gerçekleşir (63).

Kalsiyuma bağımlı proteaz; sitotoksik hücreler hedef hücrelerdeki endojen apoptotik programı tetikleyen granüllerdeki salgılar ile ölümü gerçekleştirirler (63).

Hücre zarında meydana gelen değişiklikler sayesinde apoptotik cisimler ve fragmanları, parankim hücreleri, fagositler ve doku makrofajları tarafından tanınırlar ve fagosite edilerek dokudan temizlenirler. Apoptotik cisimlerin sindiriminde fagositik hücrelerin lizozomal enzimlerinin rol aldığı görülür (42,64).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması:

Bu çalışmada fetal yaşları 15-22 hafta arasında değişen toplam 13 dişi ve fetal yaşları 14-22 arasında değişen toplam 18 erkek insan fetus karaciğer örnekleri kullanıldı. Fetuslerin yaşlarının hesaplanmasında CRL (=Crown Rump Length= Tepe Kıç Mesafesi) ölçümü yapıldı. Bu insan fetusları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Anatomi anabilim dalında mevcut fetus koleksiyonundan elde edilmiştir. Bu fetusların özelliği normal spontan düşük sonucu elde edilen morfolojik olarak tamamen sağlıklı yani malformasyon mevcut olmayan fetuslar olmasıdır. Bu fetuslar Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kadın Doğum Anabilim dalı ve Konya Doğumevinde normal rutin gebelik takipleri sırasında düşük gözlenen gebeliklerden elde edilmiştir. Bu fetusların ailelerinden gönüllü olur formları doldurulup etik kurul onayı ile alınmak suretiyle koleksiyon oluşturulmuştur. Bununla birlikte çalışmaya başlamadan önce tekrar çalışmamıza yönelik insan etik kurul onayı Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulundan alınmıştır(Etik Kurul No: 21.03.2008-081)

Kullanılan fetusların haftaları ve sayıları Tablo:2'de sunulmuştur.

Fetus haftaları	Dişi Fetusler	Erkek fetusler
14 hafta	0	1
15 hafta	1	0
16 hafta	0	0
17 hafta	3	3
18 hafta	2	3
19 hafta	1	4
20 hafta	2	2
21 hafta	2	3
22 hafta	2	2
Toplam	13	18

Tablo 2. Çalışmada kullanılan fetusların yaşları ve sayıları.

Fetuslerden karaciğer örnekleri Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Anatomi anabilim dalındaki öğretim üyelerinin disseksiyonu yoluyla elde edilmiş olup alınan örnekler %10 nötral formaline konmuştur. Fetusler daha önceden %10'luk formaldehidde fikse edildiği için temizlenme için 2 hafta süreyle 3 günde bir %10 nötral formalin solüsyonu değiştirilmek suretiyle fiksasyon yenilendi ve örneklerin temizlenmesi sağlandı. Fiksasyon tamamlandıktan sonra örnekler klasik histolojik takip metoduyla takip edilip parafine gömüldü. Parafin bloklardan klasik rotary mikrotomla alınan 5 µ kalınlığındaki kesitler immunohistokimyasal boyama için Poly-L-lysine kaplı lamlara (Labvision, Fremont, CA) alındı. Hazırlanan lamlar apoptosis belirleme için ticari bir kit olan TUNEL bazlı DNA fragmentasyonunu gösteren FRAGEL kiti (Calbiochem, Darmstadt) ve p53 ekspresyonunu göstermek için anti-p53 primer antikör (Labvision, Fremont, CA) ile boyandı. P53 boyama için sekonder antikör olarak Horse radish peroksidaz (Labvision, Fremont, CA) sistemi ve kromojen olarak AEC kromojen (Labvision, Fremont, CA) kullanıldı. Zıt boyama için Mayers Hematoksilen (Sigma, İnterlab, Turkey) kullanıldı. Kapatma solüsyonu olarak özel su bazlı mounting medium (Labvision, Fremont, CA) kullanıldı.

Preparatlar Işık mikroskobu (Nikon Eclipse E600) altında incelenerek p53 pozitif ve apoptotik hücreler sayıldı.

3.2. Histolojik İnceleme

3.2.1. Doku Takibi Metodu

%10 nötral formalinde fikse edilen örnekler aşağıdaki rutin histolojik takip metoduyla takip edildi ve parafine gömüldü.

A. Dehidratasyon

- a. %70 alkol 1 saat
- b. %80 alkol 1 saat
- c. %90 alkol 1 saat
- d. %96 alkol 1 saat
- e. Absolü alkol 2x1 saat

- B. Şeffaflandırma
 - a. Xylene 30 dakika
 - b. Xylene 1 saat
- C. Parafinde bekletme
 - a. Yumuşak parafin 15 dakika
 - b. Yumuşak parafin 3 saat
- D. Yumuşak parafine gömme

3.2.2. İmmunohistokimyasal Metot

3.2.2.1. Apoptozis belirleme metodu

1. Rehidratasyon
 - a. Lamlar 1x TBS'te oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
 - b. Yayma üstünde lamın orta kısımlarını içine alacak şekilde 2 cm çapında sınırlayıcı kalem ile işaretleme (Pappen, Sigma) yapıldı.
2. Örnek Permeabilizasyonu
 - a. 2 mg/ml Proteinase K 10 mM Tris pH8'le 1/100 oranda sulandırıldı.
 - b. Tüm örnek bu hazırlanan 50-100 µg/ml Proteinase K ile kaplandı ve oda ısısında 5 dk bekletildi.
 - c. 1 x TBS'de yıkandı.
 - d. Lam etrafındaki fazla sıvı dikkatlice silkelendi ve doku etrafı dikkatlice kurulandı.
3. Endojen Peroksidaz İnaktivasyonu
 - a. %30 H₂O₂ methanolle 1/10 oranda sulandırıldı.
 - b. Lamlar bu sıvıda oda ısısında 5 dk inkübe edildi.
 - c. 1 x TBS'de çalkalandı.

- d. Lam etrafındaki fazla sıvı dikkatlice silkelendi ve doku etrafı dikkatlice kurulandı.
4. Denge Ve İşaretleme Reaksiyonu
 - a. 5x TdT equilibration Buffer ile deiyonize su 1/5 oranda karıştırıldı.
 - b. Tüm örnek 100 µl bu 1x TdT equilibration Buffer'ı ile kaplandı. Oda ısısında 10-30 dk inkübe edildi.
 - c. Bu inkübasyon sırasında bir yandan da işaretleme reaksiyon karışımı hazırlandı.
 - d. TdT işaretleme reaksiyon karışımı aşağıdaki gibi hazırlandı.
 - i. TdT işaretleme reaksiyon karışım (TdT Labeling Reaction Mix) tüpü vortekste hafifçe çalkalandı.
 - ii. TdT enzim tüpü açmadan önce mikrosantrifüjle pulse-spin yapıldı.
 - iii. İşaretlenecek her örnek için temiz bir mikrosantrifüj tüpü buz üzerine kondu ve yavaşça karıştırıldı: 57 µl TdT işaretleme reaksiyon karışımı (TdT Labeling Reaction Mixture) +3 µl TdT enzim.
 - e. 1x TdT equilibration Buffer'ı örnekten dikkatlice uzaklaştırıldı.
 - f. Hemen sonrasında her örneğe yukarıda hazırladığımız 60 µl TdT işaretleme reaksiyon karışımını (TdT Labeling Reaction Mixture) konuldu.
 - g. Evaporasyona bağlı kaybı önlemek için örnek parafilm parçacığı (örnekten az büyük boyutta) ile örtüldü.
 - h. Lamlar nemli ortamda 37 santigrat derecede 1.5 saat bekletilerek enkübe edildi.
 5. İşaretleme Reaksiyonunu Sonlandırma
 - a. Enkübe edilmiş lamlardaki parafilm kaldırılıp ve lamlar 1x TBS'te çalkalandı.

- b. Tüm örnek 100 µl Stop Buffer'la kaplandı ve oda ısısında 5 dakika bekletildi.
 - c. 1 x TBS'de çalkalandı.
 - d. Lam etrafındaki fazla sıvı dikkatlice silkelendi ve doku etrafı dikkatlice kurulandı.
6. Belirleme (Detection)
- a. Tüm örnek 100 µl Blocking Buffer ile kaplandı. Oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
 - b. Diğer taraftan 50x Conjugate Blocking Buffer'da 1/50 oranda sulandırıldı ve 1x Conjugate oluşturulmuş oldu.
 - c. Blocking Buffer örnekten dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra 1x Conjugate örneğe uygulandı.
 - d. Lamlar nemli ortamda oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
 - e. 1 x TBS'de çalkalandı.
 - f. Lam etrafındaki fazla sıvı dikkatlice silkelendi ve doku etrafı dikkatlice kurulandı.
 - g. Tüm örnek 100 µl DAB solüsyonu ile kaplandı. Oda ısısında 10-15 dakika bekletildi.
 - h. Deiyonize su ile lamlar çalkalandı.
7. Zıt Boyama
- a. Tüm örnek 100 µl metil green counterstain ile kaplandı.
 - b. Oda ısısında 3 dk bekletildi.
 - c. Boya süzüldü.
 - d. %100 alkole 2-4 kez batırılıp çıkarıldı.
 - e. Emici havluyla kısa sürede temizleme yapıldı.
 - f. Xylene (Sigma) 2-4 kez batırıp çıkarıldı.
 - g. Lam arkası ve örnek etrafı xylene ile temizlendi.
 - h. Entellan (Sigma) ile kapatıldı.

3.2.2.2. P53 Ekspresyonu Belirleme Metodu

1. Parafin kesitleri 64 °C'de 1 gece bekletip deparafinize edildi
2. Sabah xylene'de 30 dk bekletildi ve tam deparafinizasyonu sağlandı
3. Dokuyu dehidrate edildi. Bu amaçla
 - a. %96 alkolde 5 dakika
 - b. %96 alkolde 5 dakika
 - c. %90 alkolde 3 dakika
 - d. %80 alkolde 3 dakika
 - e. %70 alkolde 3 dakika
4. Çeşme suyu ile bolca yıkandı
5. Su geçirmez kalemle doku etrafları çizerek sınırlandı
6. Sitrat buffer'a konan lamlar bir arada 20 dakika mikrodalgada kaynatıldı ve sonrasında 20 dk oda ısısında beklendi
7. TBS ile 2 kez yıkandı
8. 15 dk Hidrojen peroksitte bekletilerek endojen peroksidaz aktivitesi engellendi
9. TBS ile 2 kez yıkandı
10. Ultra V Block ile 5 dakika boyandı
11. Anti p53 antikoru damlatıldı ve 1 saat enkübe edildi
12. TBS ile iyice yıkandı
13. HRP uygulandı
 - a. 20 dk AntiGoat serum ile enkübasyon yapıldı
 - b. PBS
 - c. 20 dk Streptavidin ile enkübasyon yapıldı
 - d. TBS'te 4 kez yıkandı
14. AEC kromojende 8-10 dk bekletildi

15. Distile suda yıkandı
16. 1 dakika Hematoksilen (Mayers) bekletildi
17. Çeşme suyunda yıkandı
18. Özel mounting mediumla kapatma yapıldı

3.2.3. Görüntü Değerlendirme

Yapılan immunohistokimyasal boyamalar sonucu hazırlanan lamlar ışık mikroskobu (Nikon Eclipse E600, Nikon, Japan) altında incelendi. Preparatlarda x20 objektif büyütme altında 5 farklı alanda fotoğraflar çekildi. Çekilen resimler UTHSCSA Windows Image Tool 3.0 görüntü analizi programı ile incelenerek immunpozitif hücreler sayıldı. Elde edilen değerler Microsoft Office Excel programında eğri halinde hazırlandı.

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

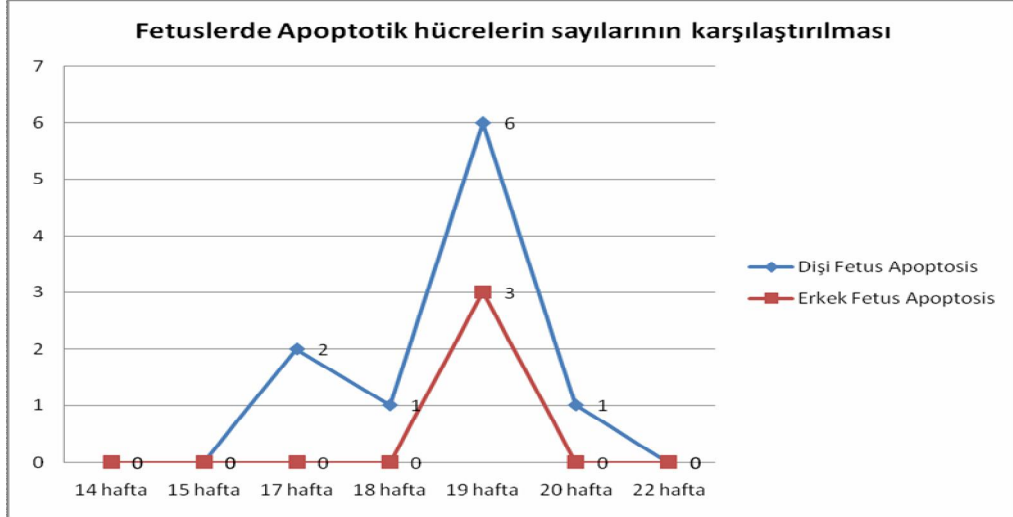
Bilindiği üzere insan fetuslerinin elde edilmesi oldukça uzun ve zahmetli bir süreçtir. Dolayısıyla tüm haftaları içine alacak geniş fetus serileri bulmak hemen hemen imkansızdır. Bu nedenle bu çalışmada istatistiksel olarak anlam ifade edecek sayıda fetus kullanılmadığı için istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır. Sadece elde edilen değerler intrauterin gelişim olarak aynı hafta içinde bulunan 1'den fazla fetusdan elde edilmişse aritmetik ortalamalar alınarak grafik oluşturmada bu değerler kullanılmıştır.

5. BULGULAR

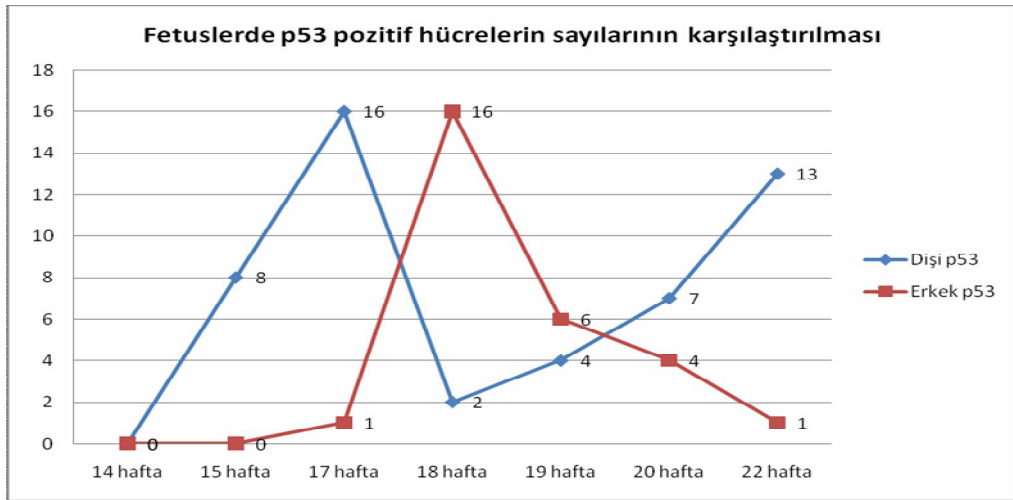
Yapılan ışık mikroskopik değerlendirmede intrauterin dönemde hemopoetik bir organ özelliği taşıyan karaciğerin histolojik incelemesinde birçok sıkıntılar ortaya çıkartmıştır. Bilindiği üzere hemopoetik sistemin gerek intrauterin ve gerekse doğum sonrası dönemde gelişiminde yoğun bir hücre proliferasyonu mevcuttur. Bu yoğunluk beraberinde hatalı hücrelerin oluşumuna da neden olduğu için bu hücreler apoptozisle ölmektedirler. Bu nedenle hepatositlerde apoptozis değerlendirmesinde karaciğer içinde mevcut olan bol kan hücrelerinin arasında mevcut olan apoptotik hücrelerin hepatositlerin üstünü örtmesi veya apoptotik hepatositler üzerine superpoze olması hücre sayımında önemli sıkıntılar yaratmıştır. Bu nedenle her preparat birkaç kez değerlendirilip ortalama değerler hesaplanmış ve grafik çizilmesinde bu değerler kullanılmıştır. Hücrelerin superpoze olduğu görüntülere bir örnek Resim:11'de görülmektedir.

Hepatositlerde apoptozisin değerlendirilmesinde erkek fetuslar üzerinde yapılan değerlendirmede, apoptotik hücre sayısının hemen hiç olmadığı tespit edildi (Resim: 4-7). Öte yandan dişi fetusların incelenmesinde de apoptotik hücre sayısının oldukça az olduğu belirlendi (Resim 8-11). Erkek fetusların incelenmesinde sadece 19 haftalık fetuslardan alınan örneklerde yukarıda tarif edilen sayım metoduna göre toplam 3 tane apoptotik hücre tespit edilirken, dişi fetuslarda 19 haftalık fetusda apoptotik hücre sayısında belirgin artış dikkati çekmekteydi.

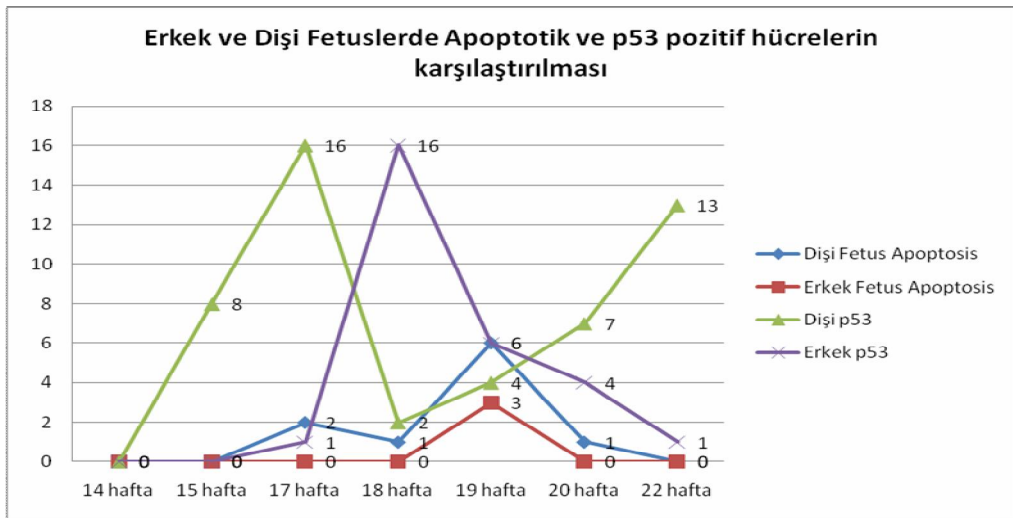
Hepatositlerde p53 ekspresyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan sayımda ise apoptotik hücre sayımında karşılaşılan superpozisyon problemiyle çok daha az karşılaşıldı. Bilindiği üzere hemopoetik hücrelerde ölüm her zaman p53 yolağı üzerinde olmamakta ve farklı yollar etkin olabilmektedir. Yapılan incelemede erkek fetusların incelenmesinde p53 pozitif hücre sayısının 18. haftada belirgin derecede arttığı (Resim:13) ama 19. haftadan sonra bu artışın azaldığı ama devam ettiği tespit edildi(Resim:14-15). Öte yandan dişi fetusların incelenmesinde p53 pozitif hücre sayısının daha 15. haftada görülmeye başladığı (Resim:16) 17. haftada oldukça belirginleştiği (Resim:17) ancak 20. hafta civarında oldukça azaldığı görüldü (Resim:18). Bununla birlikte 21. haftadan sonra tekrar ekspresyonun artması ilgi çekici bir özellikti (Resim:19). Elde edilen veriler Grafik:1-3'de belirtilmiştir.



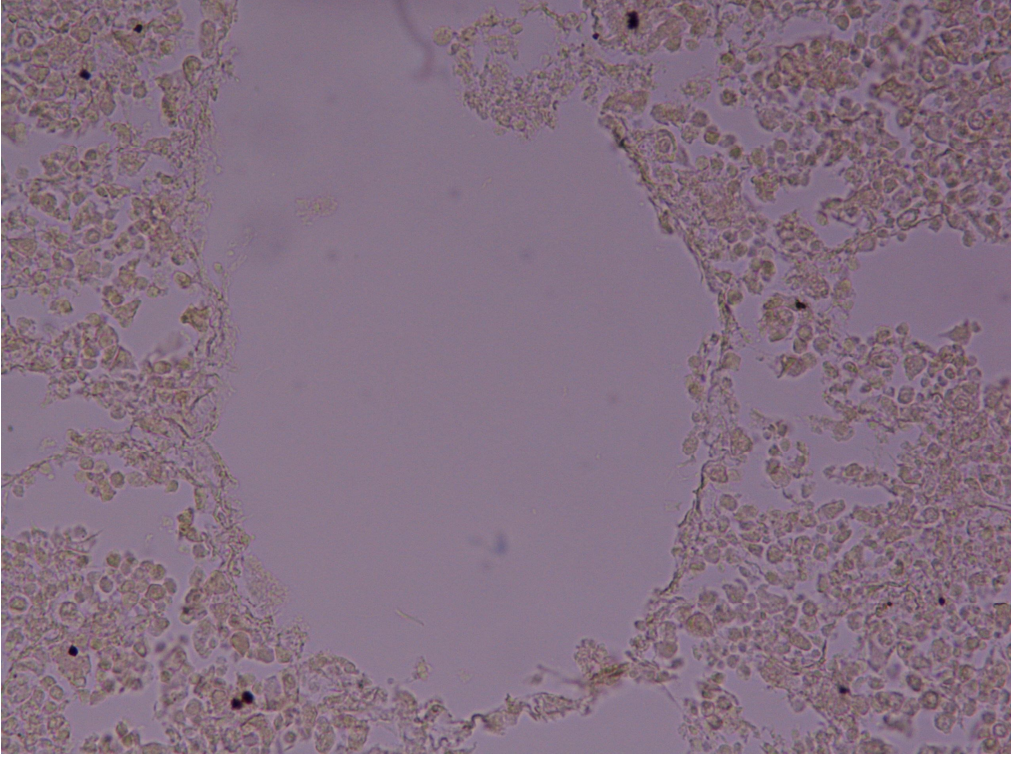
Grafik 1. Fetuslerde apoptotik hücrelerin sayılarının karşılaştırılması



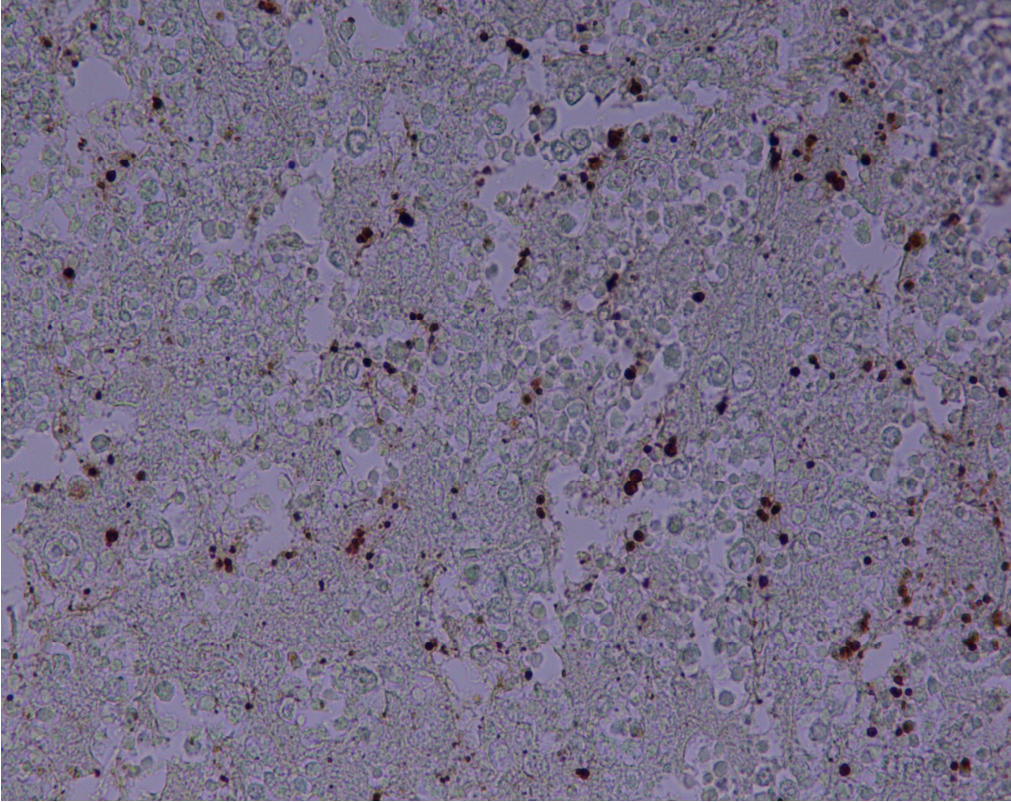
Grafik 2. Fetuslerde p53 pozitif hücrelerin sayılarının karşılaştırılması



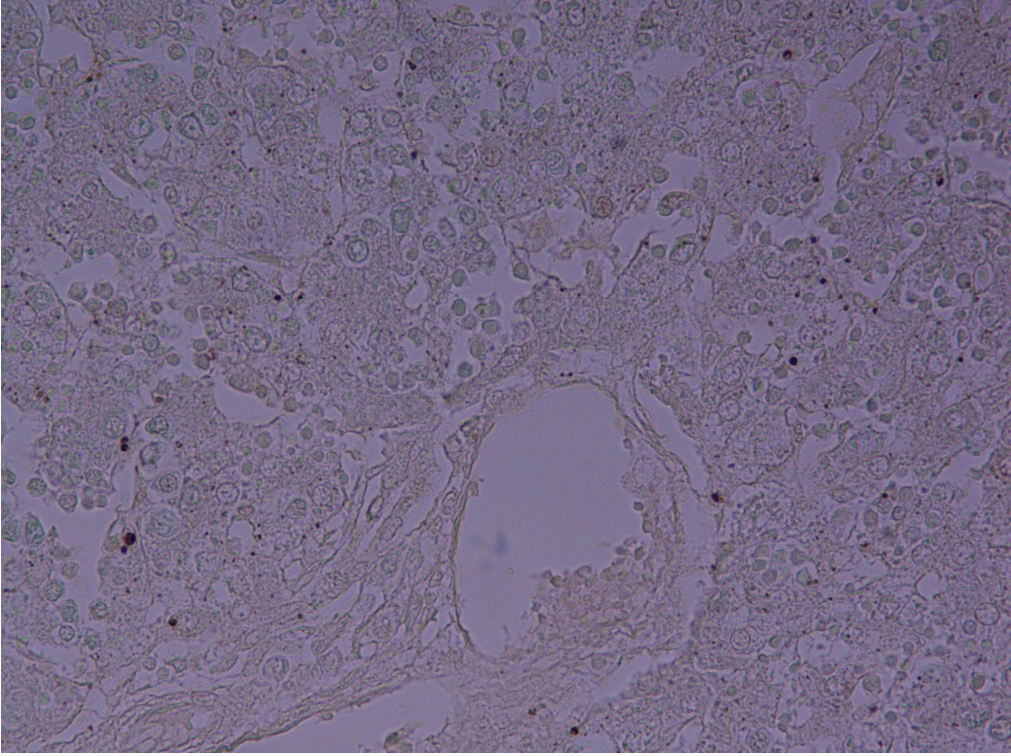
Grafik 3. Erkek ve Dişi fetuslerde apoptotik ve p53 pozitif hücrelerin sayılarının karşılaştırılması



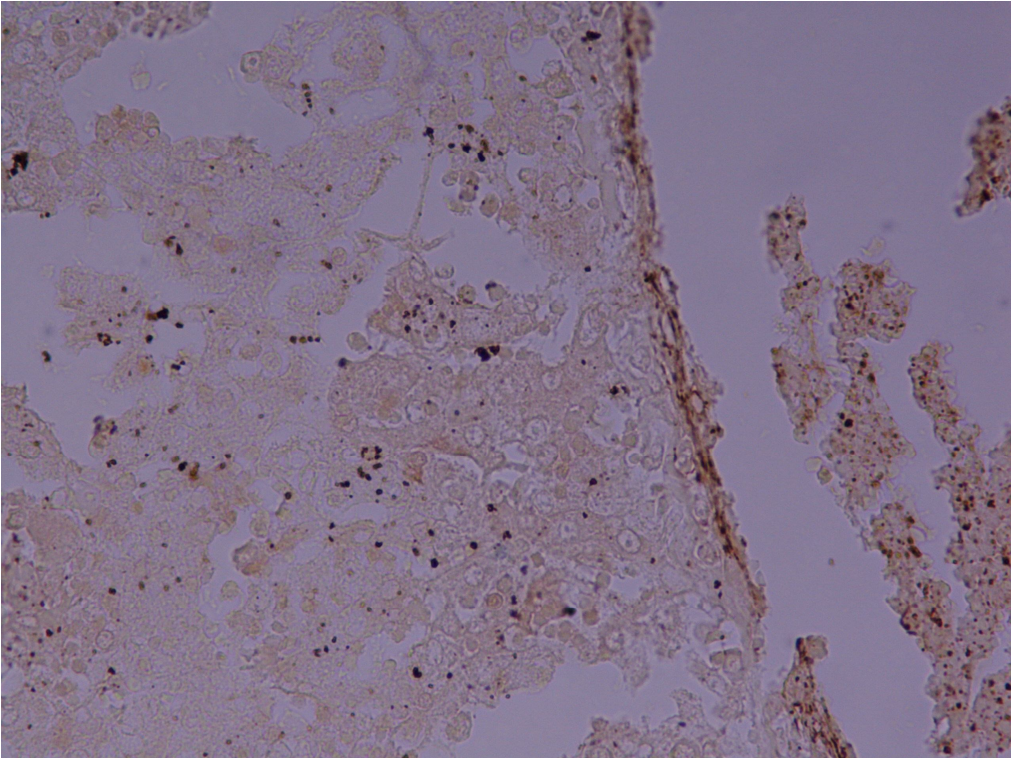
Resim 4. Erkek fetuslerden alınan karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısının tespit edilemediği bir görüntü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.



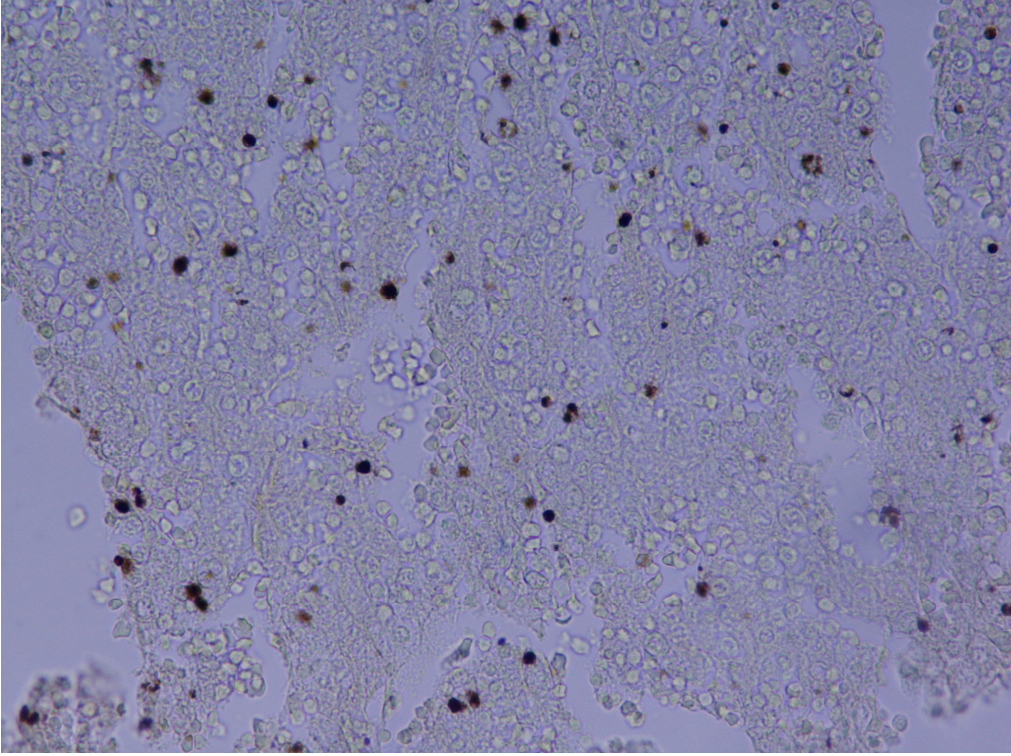
Resim 5. Erkek fetuslerden alınan karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısının tespit edilemediği bir görüntü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.



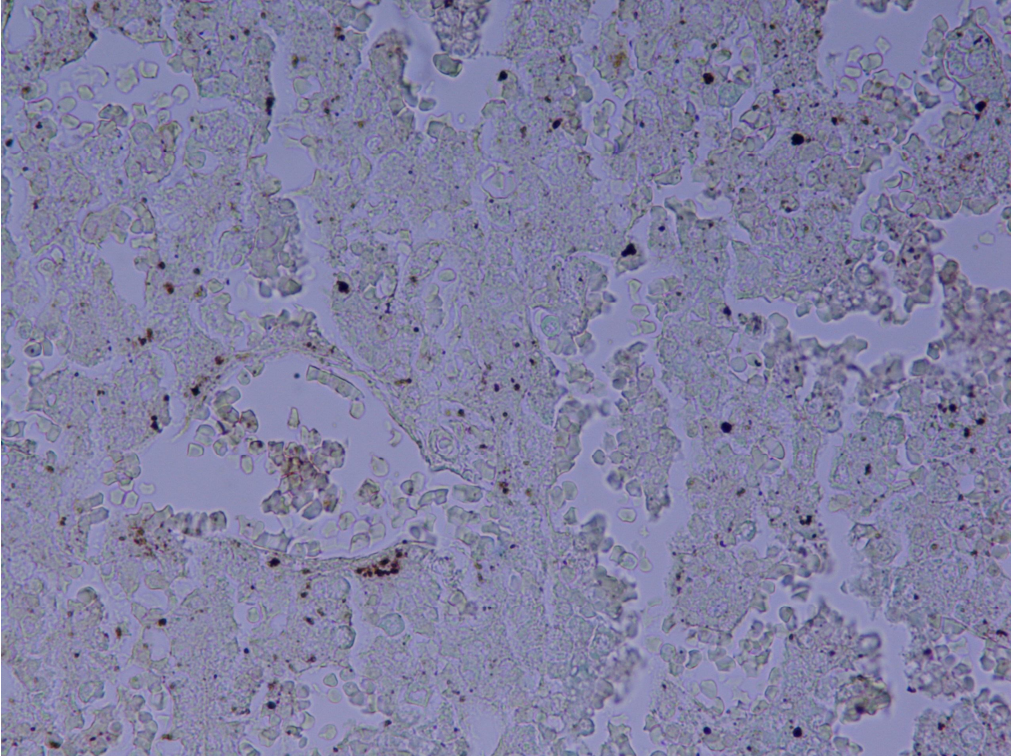
Resim 6. Erkek fetuslerden alınan karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısının tespit edilemediği bir görüntü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.



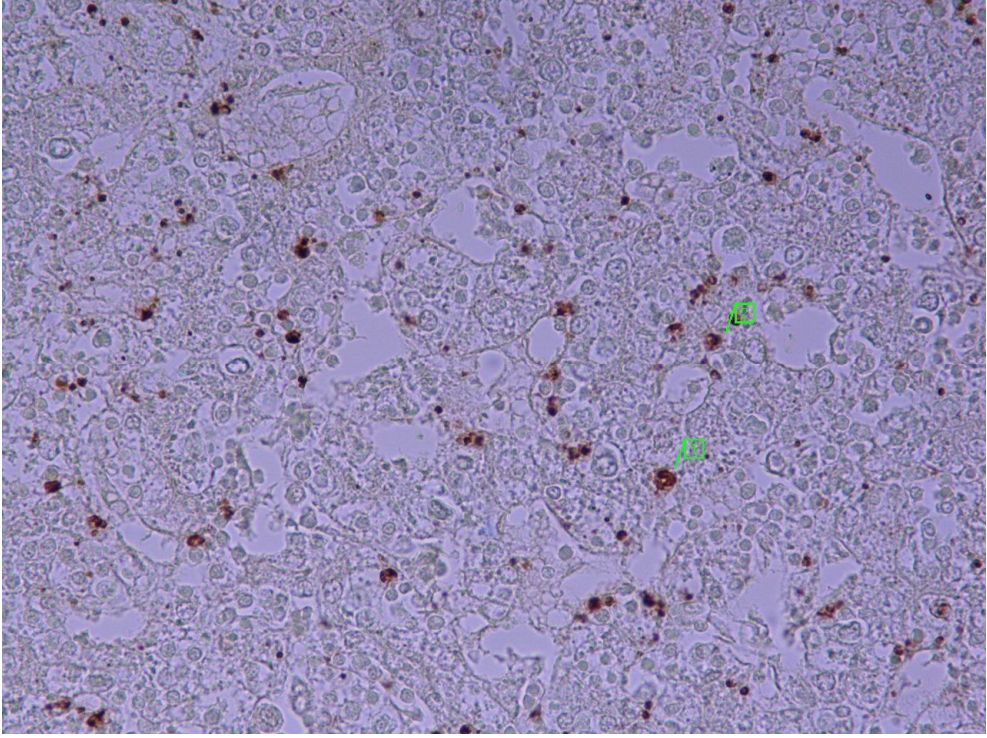
Resim 7. Erkek fetuslerden alınan karaciğer dokusunda apoptotik hücre sayısının tespit edilemediği bir görüntü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.



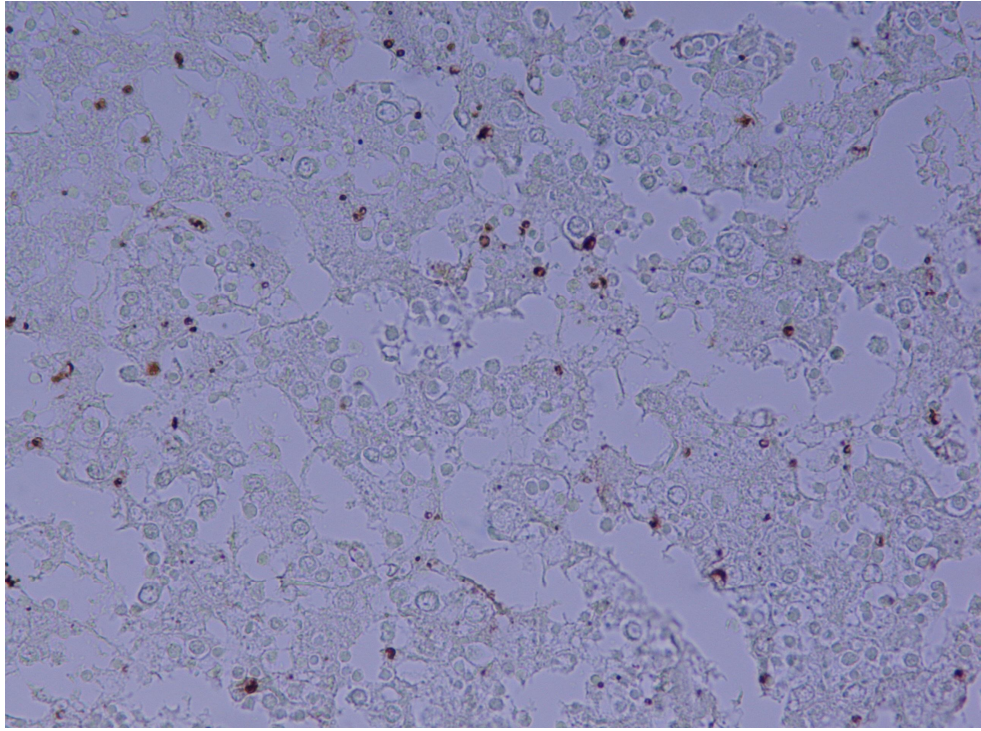
Resim 8. Dişı fetuslerden alınan karaciğer dokusunda az sayıda tespit edilen apoptotik hücre görünümü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.



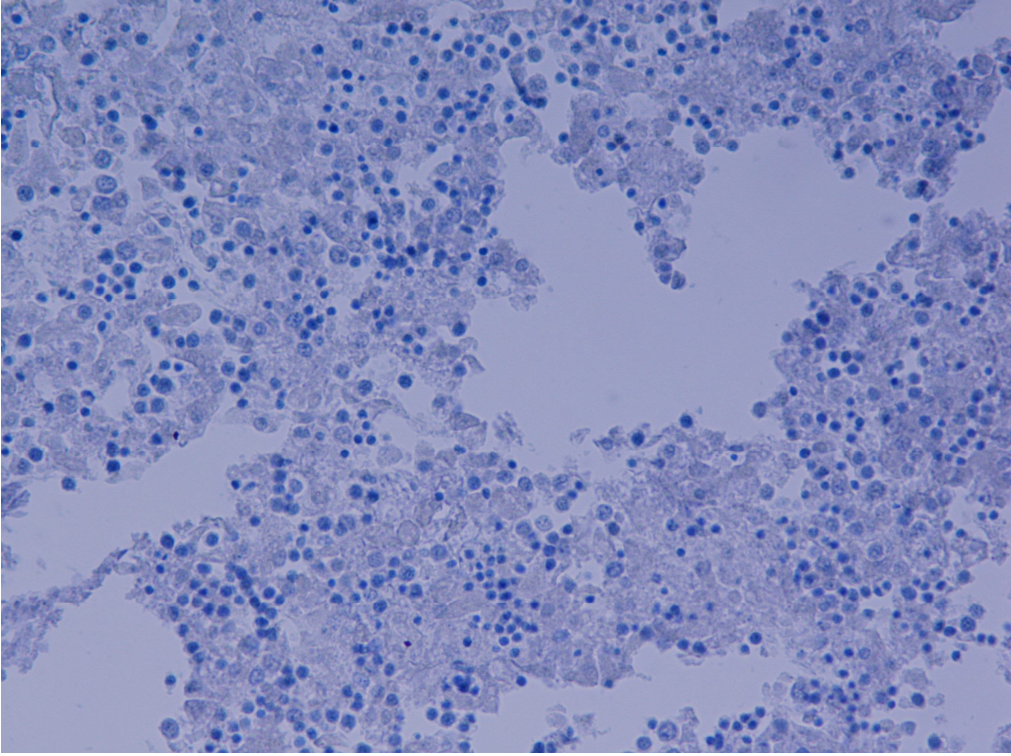
Resim 9. Dişı fetuslerden alınan karaciğer dokusunda az sayıda tespit edilen apoptotik hücre görünümü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.



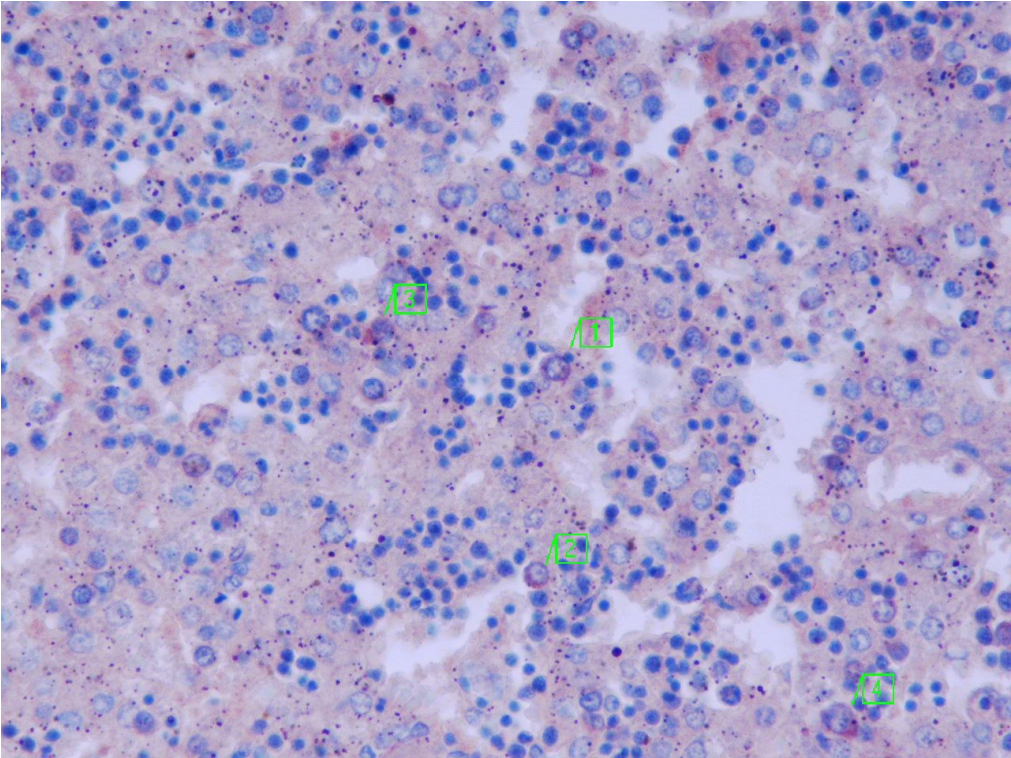
Resim 10. Dişi fetuslerden alınan karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işaretlenmiş iki adet apoptotik hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.



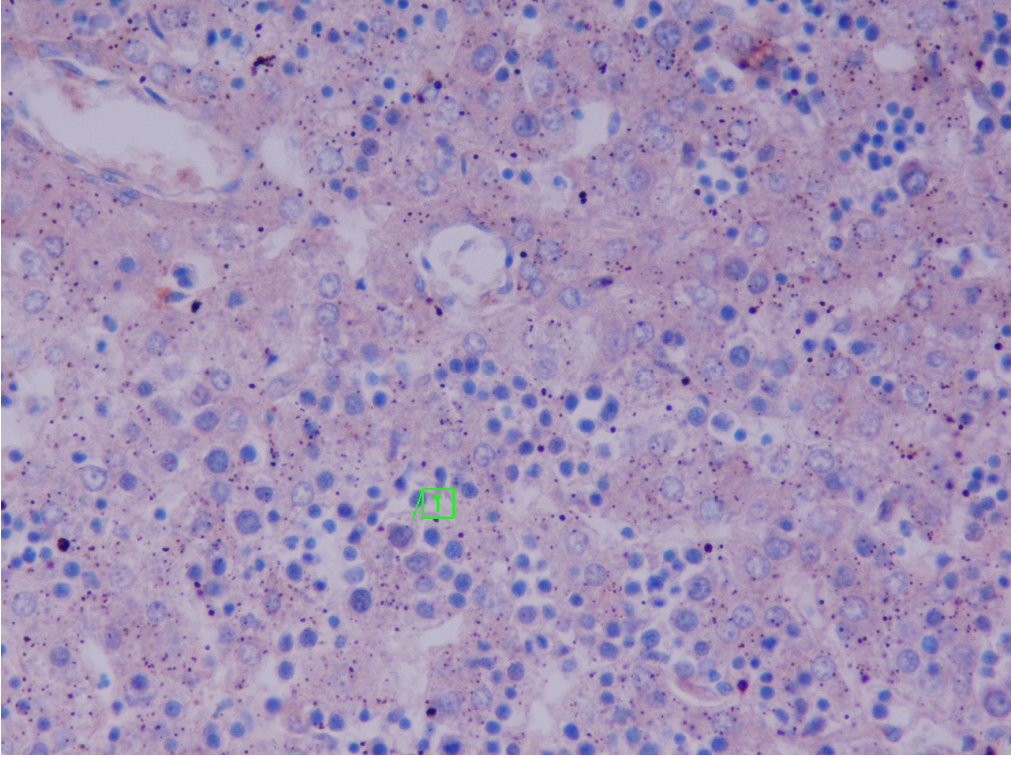
Resim 11. Dişi fetuslerden alınan karaciğer dokusunda az sayıda tespit edilen apoptotik hücre görünümü. İmmunohistokimyasal apoptozis boyama x 20.



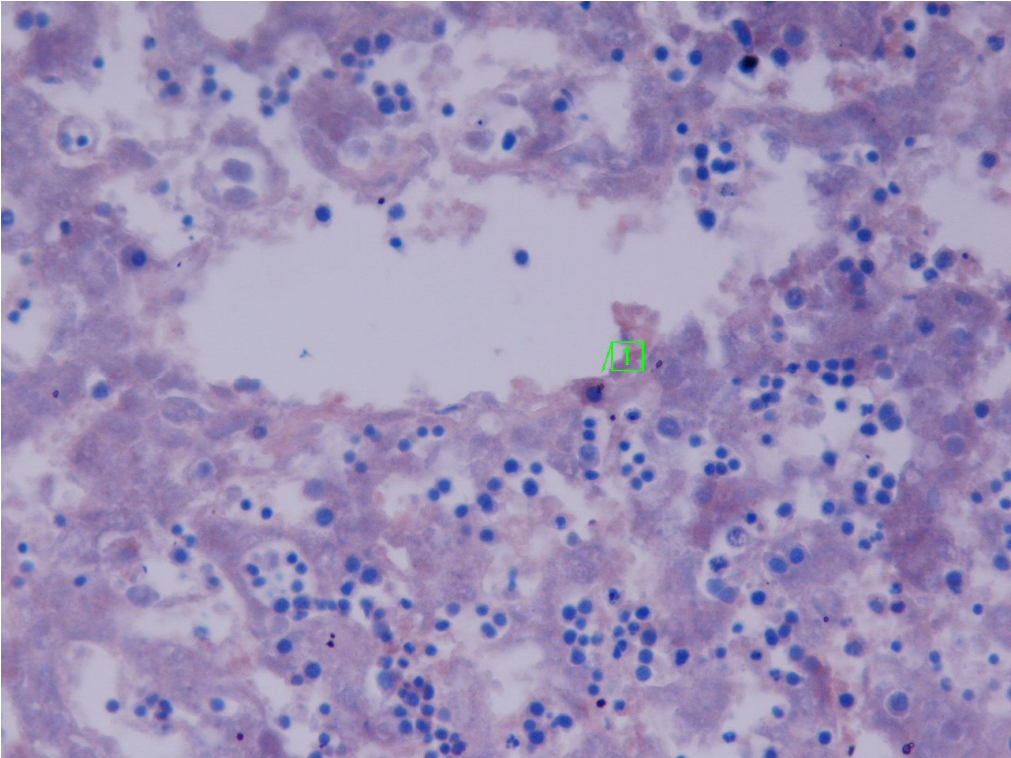
Resim 12. Dişi fetuserden alınan karaciğer dokusunda az sayıda tespit edilen apoptotik hücre görünümü. İmmünohistokimyasal apoptozis boyama x 20.



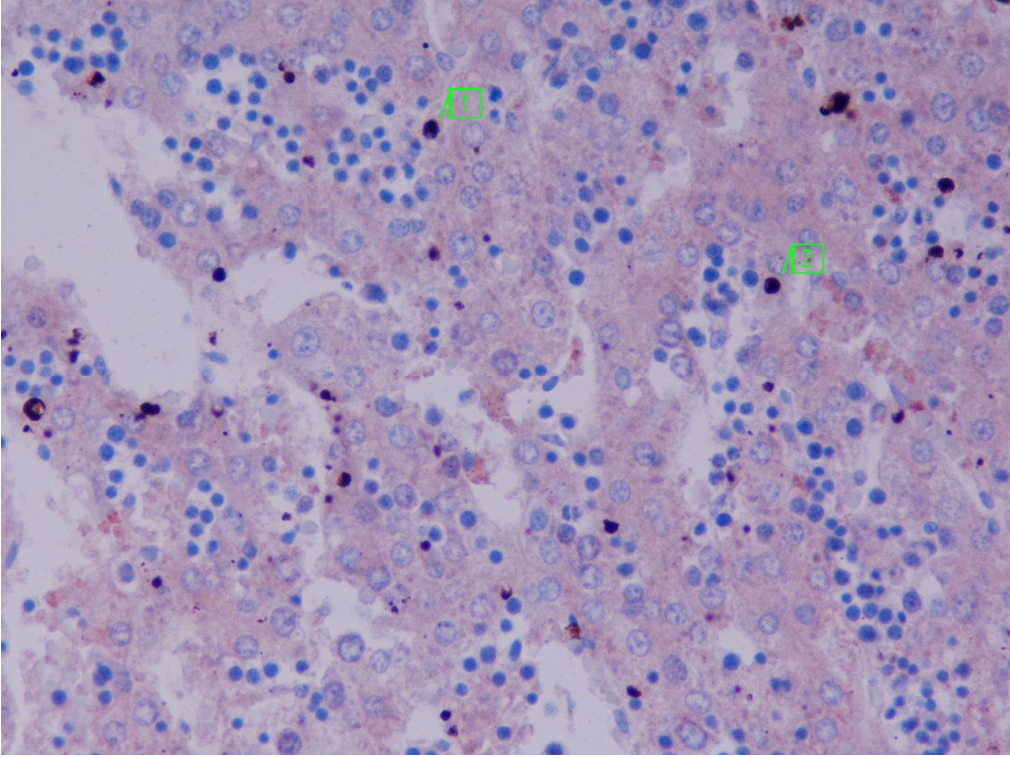
Resim 13. 19 haftalık erkek fetus karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işaretli dört adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmünohistokimyasal p53 boyama x 20.



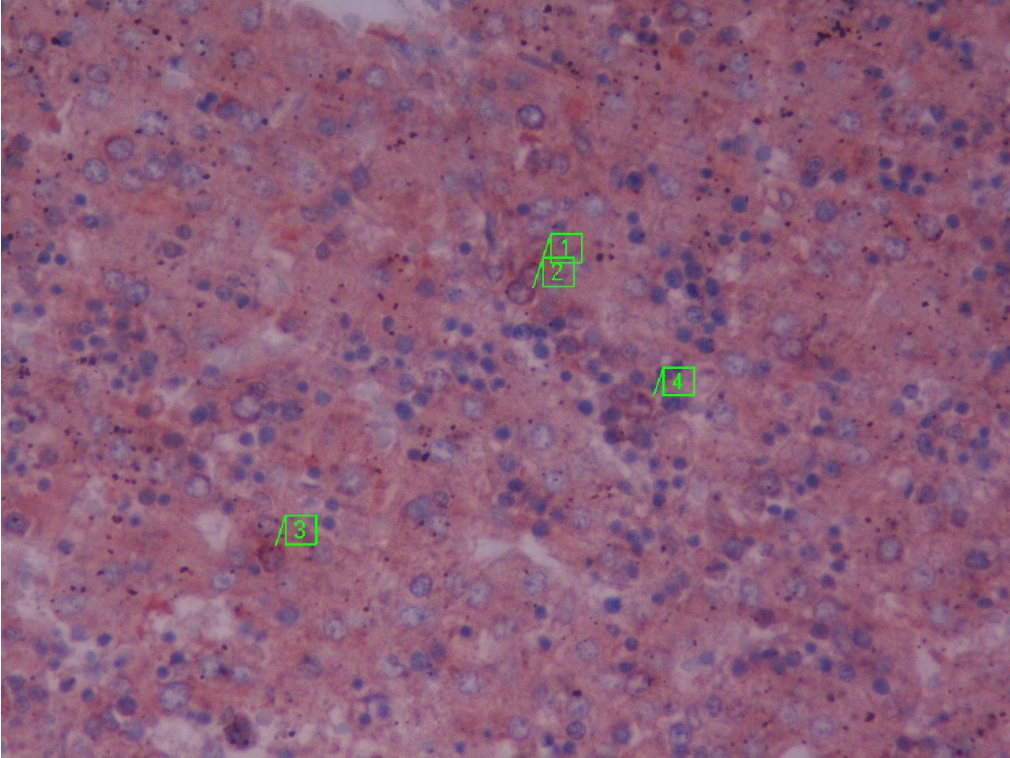
Resim 14. 19 haftalık erkek fetus karaciğer dokusunda yeşil kutuyla işaretli bir adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.



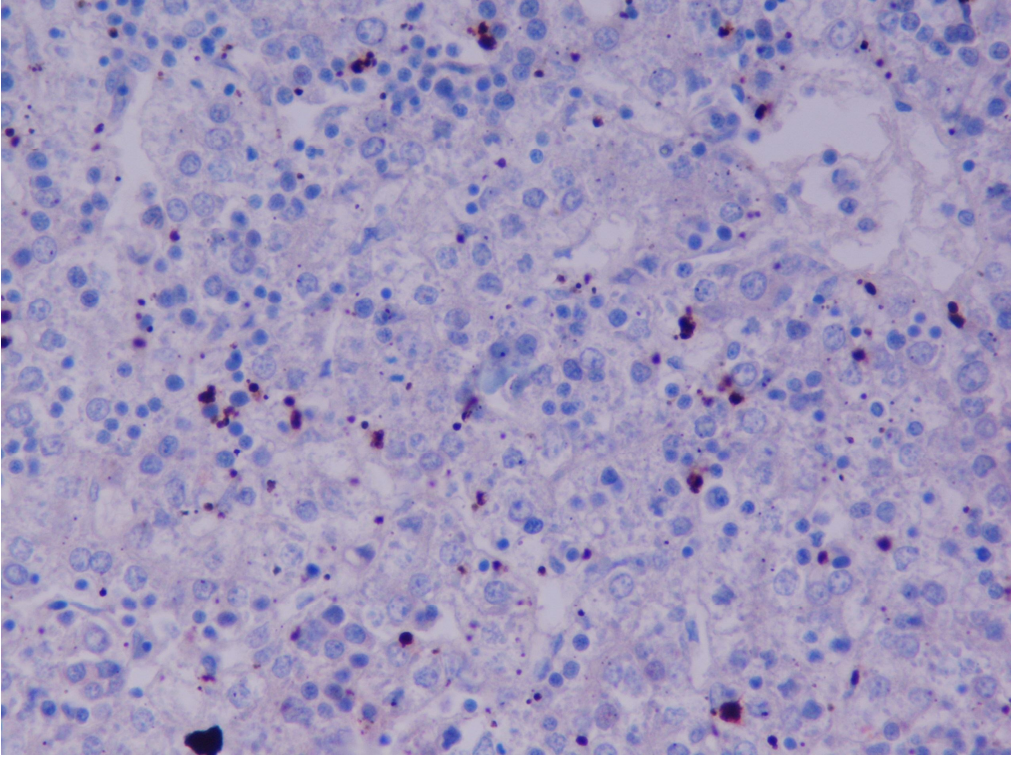
Resim 15. 19 haftalık erkek fetus karaciğer dokusunda yeşil kutuyla işaretli bir adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.



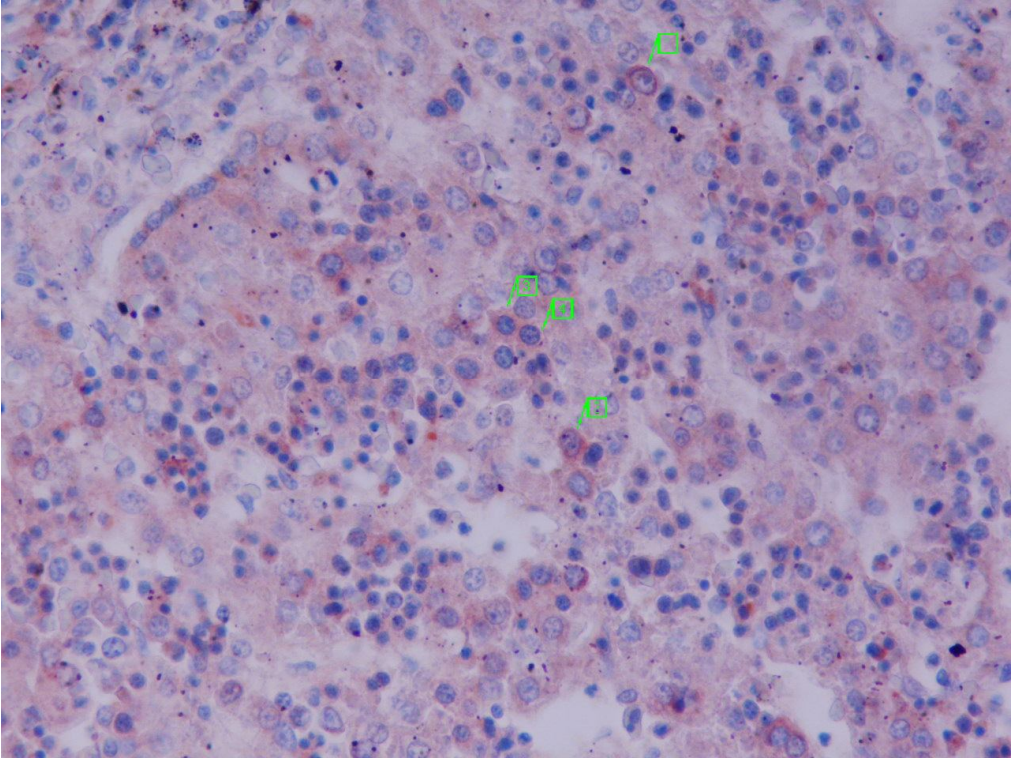
Resim 16. 15 haftalık dişi fetus karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işretli iki adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.



Resim 17. 17 haftalık dişi fetus karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işretli dört adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.



Resim 18. 20 haftalık dişi fetus karaciğer dokusunda p53 pozitif hücre görünümü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.



Resim 19. 21 haftalık dişi fetus karaciğer dokusunda yeşil kutucuklarla işretli dört adet p53 pozitif hücre görüntüsü. İmmunohistokimyasal p53 boyama x 20.

6. TARTIŞMA

Karaciğer vücudun en büyük bezi ve deriden sonra gelen en büyük organıdır (1,2). 500'ü aşkın endokrin ve ekzokrin fonksiyonu ile günümüzde en çok araştırılan organlardan biridir (65). Batın içinde büyük oranda sağ üst kadranda yerleşik olmakla birlikte sol lob sol üst kadrana kadar uzanır. Karaciğerin büyük bir bölümü peritonla örtülü olması nedeniyle ve intraperitoneal organlardan biri olarak kabul edilir (2,3). Sindirim sisteminin hemen hemen bütün venöz kanının sistemik dolaşıma geçmeden önce karaciğere uğraması, bu organın fonksiyonel önemini yeterince ortaya koymaktadır (4).

İntrauterin dönemde karaciğer primordiumu, ön barsağın distal ucunda bir endodermal epitel çıkıntısı şeklinde 3. hafta ortasında belirir. Gelişimin daha sonraki dönemlerinde, epitelyal karaciğer kordonları vitellin ve umbilikal venlere karışarak hepatik sinuzoidleri meydana getirir. Karaciğer kordonları parankime farklanır ve safra kanallarının döşemesini meydana getirir. Hematopoetik hücreler, kupffer hücreleri ve bağ dokusu hücreleri septum transversum mezoderminden köken alır (5,6,7).

Karaciğer intrauterin dönemde hızla büyür ve gelişir ve 5. haftadan 10. haftaya kadar karın boşluğunun büyük bir kısmını kaplar. Vena umbilikalisten karaciğere akan oksijenli kanın miktarı, karaciğerin gelişimini ve fonksiyonel segmentasyonunu belirler. Başlangıçta karaciğerin sağ ve sol loblarının büyüklüğü aynı iken, kısa bir sonra sağ lob daha fazla büyür. Altıncı haftada başlayan hematopoiesis karaciğere parlak kırmızı bir renk verir; karaciğerin 7. ve 9. haftalar arasındaki büyüklüğünden de bu hemopoetik aktivite sorumludur (24).

Karaciğerin ağırlığı intrauterin yaşamın 10. haftasında, toplam vücut ağırlığının %10'u kadardır. Organın ağırlığındaki bu fazlalık, kısmen sinüzoid sayısının yüksekliğine atfedilse de, bir başka önemli etken de, gördüğü hematopoietik fonksiyonlardır. Hepatik hücrelerde damar duvarları arasında, lökosit ve eritrositlerin üretildiği, proliferasyonla karakterize geniş bir hücre ağı vardır. Karaciğerde hematopoez 6. haftada başlar. Hematopoietik aktivite, gebeliğin son iki ayında yavaş yavaş azalır ve doğumda geride ancak birkaç hematopoietik hücre adası kalır. Doğumda karaciğerin ağırlığı toplam vücut ağırlığının %5'i kadardır (3,8,9).

Çalışmamızda da görüldüğü üzere çalışmamızda kullanılan hem dişi hemde erkek fetuslerden alınan örneklerde histolojik olarak tüm karaciğer dokusunda sinosoidler içinde yaygın olarak kan hücreleri görülmektedir. Hatta bu hücrelerin aşırı miktarda yoğun olması yukarıda anlattığımız üzere çalışmamız sırasında immunohistokimyasal değerlendirmede karşılaştığımız en büyük sorunu oluşturmuştur. Kan hücre yoğunluğu açısından, histolojik olarak, erkek ve dişi fetusleri arasında ve kullanılan örneklerin haftaları arasında anlamlı bir değişiklik tespit edilememiştir.

Karaciğerin bir başka önemli işlevi de, 12. haftadan itibaren hepatik hücrelerin safra üretmeye başlamasıdır. Bu sırada safra kesesi ve sistik kanal da oluşmuş; sistik kanal hepatik kanalla birleşerek koledok kanalını meydana getirmiş olduğundan, üretilen safra barsağa akabilme imkanı bulmuş olur (5,10).

Apoptozis organizma içinde gerek doğum öncesi ve gerekse doğum sonrası dönemde yapısal anlamda çok önemli değişikliklerin ortaya çıkması için gerekli bir süreçtir. Nitekim embriyonik dönemde preimplantasyon, implantasyon dönemlerinde ve organogenezisin tüm basamaklarında apoptozis oldukça yaygın olarak gözlenebilmektedir. Organogenezis döneminde görülen apoptozise örnek olarak müllerian ve wolfian kanalların gerilemesi, parmak arası perdelerin yok olması ve kalp gibi lümenine sahip organların lümenlerinin oluşması verilebilir (66). Apoptozis sadece embriyonik gelişim sırasında değil normal yetişkinde de görülür. Organizmadaki tanımlanmayan, hasarlı ve ölü hücrelerin ortadan kaldırılmasında, retinanın büyüme ve gelişmesinde, timusta lenfositlerin olgunlaşmasında etkindir. Ayrıca hormon yetersizliğine bağlı gelişen organ gerilemelerinde, menstrüasyonda endometrial hücre yıkımında, menopozda ovaryum follüküllerinin atrezisi gelişiminde, laktasyon sonrası meme bezi gerilemesinde, Adreno Cortico Tropic Hormon geri çekilmesinden sonra adrenal atrofi, kastrasyon sonrası prostat atrofisinde de hücreler apoptozis ile vücuttan uzaklaştırılarak organizmaya zararları önlenir (42,52). Günümüzde yaygın olarak kabul edilen bir görüş yaşa bağımlı apoptozis oranında azalmanın bilhassa mitotik ve postmitotik organlar olan karaciğer ve kalpte daha belirgin olduğu yönündedir (67). Hücreler arasında apoptotik ve apoptotik olmayan hücrelerin sayıları arasındaki denge çok önemlidir. Eğer apoptotik hücre sayısında denge bozulacak olursa bu önemli karaciğer anomalilerine zemin

hazırlayabilir. Bu duruma genel örnek olarak vasküler anomaliler, safra yolları ve lobül hipogenezisleri ve agenezileri gibi klinik tablolar neden olabilir.

Karaciğerin embriyonik dönemde gelişimine ait olarak görülen apoptozis ile yayın sayısı literatürde oldukça az sayıdadır. Motoyama ve ark. bir çalışmalarında karaciğerdeki hemopoetik hücrelerde apoptozis sayısının hepatositlere oranla çok daha yoğun görüldüğünü ortaya koymuşlardır. İmmatur lenfositlerin yaşam süresi kısalmış olmasına karşın matur lenfositlerin yaşam süresi normal olduğunu göstermişler ve elde ettikleri bulgulara dayanarak bcl-x fonksiyonlarının, hemopoetik sistemlerin gelişimi süresince bu sistemde yer alan olgunlaşmamış hücrelerin yaşam süresini artırmak olduğunu ileri sürmüşlerdir (68). Çalışmamızda hemopoetik sisteme ait hücrelerin içinde çok sayıda apoptotik hücrelerin mevcut olduğunu bulgular kısmında belirtmiştik. İnsan fetal karaciğerinden taze olarak elde edilen primitif hemopoetik progenitorlerin (PHP) kullanıldığı ve Fas/CD95 ve bcl-2 ekspresyonlarının tespit edilmeye çalışıldığı bir çalışmada CD95'in fonksiyonel durumu ve CD95 aracılı apoptozisi uyardığı bilinen sitokinler olan TNF- α ve IFN- γ in etkileri, antiCD95 monoklonal antikorların varlığında primitif hematopoetik progenitorlerin enkübasyonu ile incelenmiştir. Büyüme faktörlerinin eksikliğinin PHP apoptozisini uyarmasına karşın, CD95'in çapraz bağlanmasının PHP'lerin apoptozisi ile seyretmemesi, taze karaciğer hücrelerinde bcl-2'nin sitoplazma içinde artmış miktarı ile hücre yüzey CD34 seviyesinin artmış miktarı ve bunlarla CD95 varlığı arasındaki ilişki bcl-2'nin fetal karaciğer PHP'sinin CD95 aracılı apoptosisine karşı koruyucu olduğu yönünde bir kanı doğurmaktadır (69).

Farelerde yapılan bir çalışmada bcl-2 ailesinin alt gruplarından olan proapoptotik üyelerin BH3 domain'inin apoptotik sürecin başlatılması için çok gerekli olduğu ortaya konmuştur (70). Öte yandan Wnt sinyal yolağında çok önemli bir bileşen olan β -catenin'in hepatoblastlarda delesyonunu farelerde karaciğer gelişimini ve embryo yaşam süresini olumsuz yönde etkilediği ve bu etki basamaklarında morfogenetik bozuklukların temelinde artmış apoptozis olduğu ortaya konmuştur (71). Görüldüğü üzere karaciğerde apoptozis ile ilgili yapılan az sayıda çalışmalarda daha çok moleküler düzeyde ve anomalilerin değerlendirilmesi temeli üzerine yapılmış olup direkt olarak normal insan embriyolarında çalışılmış yayınlara rastlayamadık. Bu bize birçok zorluk yaratmakla birlikte çalışmamızın

özgünlüğü konusunda fikir vermiştir. Yaptığımız çalışmada Grafik:1'de de görüldüğü üzere apoptotik hücre sayısının her iki cins embriyodada 19. haftada artış gösterdiği ve sonrasında hızlı bir düşüş yaşandığı görülmektedir. Bununla birlikte erkekte apoptotik hücre sayısının dişi fetuslara göre daha düşük olması dikkati çeken bulguydu. Bunun nedeni tam olarak elimizdeki verilerle açıklanamamakla birlikte bcl-2 ailesi içindeki Bax, Bid gibi antiapoptotik üyelerin aktivasyonu olabileceğini düşünmekteyiz. Öte yandan tam aksine dişide bu dönemde proapoptotik bcl-2 aşırı aktivasyonunda aynı sonucu doğurabileceğini göz önünde bulundurmamız gerektiğini unutmamalıyız.

İnsanda intrahepatik safra kanal gelişimi süresince apoptozis her safhada görülür ve remodeling durumundaki duktal plak da yoğun, duktal plakda orta derecede ve remodele olmuş kanallarda nispeten az olarak görülür. Çoğalmakta olan hücre nükleer antijeni ile tespit edilen hücre çoğalma aktivitesi de remodeling durumundaki duktal plakda yüksekken diğer ikisinde nispeten düşüktür. Yine bcl-2 proteini duktal plakda ve remodeling durumundaki duktal plakda yok veya çok az miktarda görülmesine karşın remodele olmuş plakda oldukça fazla miktarda tespit edilmektedir. p53 proteini ise ilginç olarak, karaciğer gelişimi sırasında hiç bir tipte hücrede tespit edilememiştir. Hepatosit gelişimi süresince birçok apoptotik ve çoğalan hücrede nükleer antijeni pozitif hepatositler belirlenmiştir. Gelişen hepatositlerde c-myc protein ve fas antijeni özel metotlarla ortaya konmuştur. Bcl-2 protein ve Lewisy antijenin az miktarda olsa da hepatositlerde var olduğu belirlenmiştir. Tüm bu bulgular dengeli hücre çoğalması ve apoptozisin intrahepatik safra kanallarının normal gelişiminde çok önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır. Yani; c-myc proteini, fas antijeni, bcl-2 proteini ve Lewisy antijeni fetal intrahepatik biliyer hücreler ve hepatositlerde muhtemelen apoptosisi hem uyarıcı hemde baskılayıcı etki yapmaktadır(72).

P53 proteini 1970'li yılların sonlarında SV40 DNA virüsünün büyük transform antijenine bağlı nükleer fosfoprotein olarak bulunmuştur. P53; hücre siklusunun kontrolü, DNA sentezi ve tamiri, hücre differensiyasyonu ve apoptoziste rol oynamaktadır. Mutant formları resesif tümör supresör genin karakteristiklerine sahip olup, dominant onkogen olarak rol oynayabilir. P53'ün mutasyonları değişik doku tümörlerinde yaygın olarak saptanmaktadır (23). Hücre nükleusunda normal

koşullarda inaktif halde bulunan p53 geni hipoksi, UV ışınları, radyasyon, kimyasal ajanlar gibi stres ajanlarına bağlı DNA'da hasar oluştuğunda hızla eksprese olur ve hücre siklusunda G1-S fazları arası geçişi geciktirerek DNA tamiri için hücreye zaman kazandırır. DNA hasarı tamir olursa hücre siklusundaki blok ortadan kalkar. Ancak hasar tamir edilemez ise p53 geni Bax proteinini aktive ederek ve Insulin Like Growth Factor Binding Protein 3'e (IGF-BP3) bağlanarak hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar ve malignite gelişimini engellemiş olur (42). Bu çalışmada embriyonik insan karaciğer dokusunun p53 yolağının değerliliğini saptamak açısından P53'ün immunohistokimyasal olarak boyanma özellikleri araştırılmıştır.

P53 geninin intrauterin hayatta önemine ait oldukça az sayıda çalışma mevcuttur. Bilhassa normal karaciğer gelişimindeki yeri ile ilgili hemen hiç yayına rastlayamadık. Bu çalışmamızın özgünlüğü açısından önemli bir bulguydu. Yapılan birkaç çalışmada genelde toksisite içerikli çalışmalardı. Yapılan bu çalışmalardan birinde flouride'in aşırı dozda alınımının oluşturduğu toksik etkiler sonucu karaciğerde p53 ekspresyonu ve apoptosisin arttığı ortaya konmuştur ki bu normal beklenen bir bulgudur (73). İlginç olarak normal somatik hücrelerde yapılan bir hücre kültür çalışmasında p53 mutant farelerde aşırı proliferasyon uyarımına rağmen hücre çoğalmasının gerçekleşmediği ortaya konulmuştur (74). p53 geninin embriyonik dönemde etkin olduğu organogenezis süreçleri ile ilgili yapılan az sayıda çalışmada bulunmaktadır. Armesilla ve ark. yaptığı bir çalışmada fare embriyonik olfaktor bulbus kök hücrelerinde çoğalma ve farklılaşmada p53'ün regülatör olduğunu ortaya koymuşlardır (75). Diğer bir çalışmada insan testislerinde p53 ekspresyonunun 20. hafta civarında artış yaptığı ve sonra tekrar azaldığı ortaya konmuştur (76). Çalışmamızda elde edilen veriler intrauterin dönemde p53 ekspresyonunun dişi ve erkeklerde birbirine benzer kalıplar içinde yalnız farklı sürelerde paralellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Grafik:2.de görüldüğü üzere p53 ekspresyonu çalışmada kullanılan yaş dilimindeki dişi karaciğer örneklerinde 17. haftada erkek karaciğer örneklerinde ise 18. haftada oldukça fazla yükselmektedir. Önemli olarak dişi fetüslerde hızlı yükselişi takiben hemen hızlı bir düşüşün olması ve sonraki haftalarda ilerleyici tarzda ve sürekli bir artış olması dikkati çekmekteydi.

Bununla birlikte, erkek fetüslerde p53 ekspresyonunda 18. haftada başlayan hızlı yükselişin sonraki haftalarda giderek azalıp alt sınırlara inmesi diğer bir dikkate

değer durumdu. Bu süreçte kullanılan örneklerin haftalarına göre gelişimlerinin başlangıç dönemindeki paternin giderek kaybolup hızlı bir şekilde tersine dönmesi karaciğer gelişiminde 18. haftadan itibaren şu an için tanımlayamadığımız bir growth faktörün varlığına işaret etmektedir. Olası bu faktör veya faktörlerin varlığı organda aşırı proliferasyona neden olmakta ve bu paralelinde hatalı hücre oluşumuna neden olup organ genomunu korumak için p53 eksprese etmektedir. Bununla birlikte, olayın tam tersi olmak üzere, erkek fetuslerde ortaya çıkan bazı inhibitör faktörler de proliferasyonu baskılayarak olası p53 ekspresyonu oranını oldukça azaltıcı etki yapıyor olabilir.

Öte yandan burada dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta karaciğer intrauterin gelişiminde p53 aracılı apoptozisin yeridir. Bilindiği üzere p53 proapoptotik özelliğide sahip bir genidir. Ekspresyonları birçok kez apoptozisle sonlanabilir. Bununla birlikte yukarıda detaylı olarak anlatıldığı üzere apoptozis sadece p53 aracılı olmamakta birçok uyarıcı baskılayıcı etken bu süreci kontrol altında tutmaktadır. Grafik:3'te görüldüğü üzere apoptotik ve p53 eksprese eden hücreler ortak bir grafik altında toplandığında p53 ekspresyonu ile apoptotik hücre sayıları ve yükselip düşme zamanları arasında belirgin bir paralelizm görülmemektedir. Bu nedenle karaciğer fetal gelişimi sırasında apoptozisin p53 gen ekspresyonundan bağımsız geliştiğini söylemek yanlış olmayacaktır. Apoptotik hücre sayılarının p53 eksprese eden hücrelerden çok az olması bize bu süreçte görülen p53 ekspresyonunun patolojik bir süreçten daha öte hızlı hücre proliferasyonuna bağlı olarak hücre siklusunda ortaya çıkan DNA hasarlarının tamiri varlığını işaret etmektedir.

7. SONUÇ

Çalışmamızda elde edilen veriler bize insan karaciğerinin fetal gelişiminde p53 ekspresyonu ve apoptozisin etkin olduğunu ancak bu iki sürecin birbirinden bağımsız olarak geliştiğini ortaya koymaktadır. Öte yandan hızlı hücre proliferasyonunun görüldüğü bu organda dişi ve erkek fetuslar arasında p53 ekspresyonu açısından süre ve yoğunluk bakımından farklılık olması bize her iki cinsten fetal karaciğer gelişimini kontrol altında tutan farklı mekanizmaların ve/veya moleküllerin varlığına işaret etmektedir. Bu nedenle bu tip çalışmaların daha ileri moleküler düzeyde ve elektron mikroskopik olarak derinleştirilmesinin bilime daha fazla katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Snell R.S., Tıp Faktültesi Öğrencileri İçin Klinik Anatomi(1995), Yıldırım U.(çev ed.)5. baskı, İstanbul, Nobel Tıp kitap evleri &Yüce Yayım (183-274).
2. Ozan H. Ozan Anatomi, 1.baskı, (2004)Ankara, Nobel Tıp Kitap Evleri (287-290).
3. Arınc K. Ehan A.(2001), Anatomi I.cilt, 3. baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, (223-282).
4. Çınar A., Yörük M., Merul İ., Kılıçalp D., Koç A., Ertekin A., (1999), Karbon Tetraklorür (CCI4) ile Tavşanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Akut ve Kronik İntoksikasyonun Karaciğerin Histolojik Yapısına, Bazı Hematolojik Değerlere ve Elektrokordiyogram Üzerine Etkileri, Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 23, 235-242.
5. Abraham L., Kierszen Basım, MD,NAD,(2006), Sindirim Bezleri, Arbak S. (çeviri editörü Demir R.), Histoloji ve Hücre Biyolojisi 1.baskı, Ankara, Palme Yayıncılık. (447-474).
6. Yağmurca M., (2003), Embriyoloji, Editör:Dilek O.N. Karaciğer cilt I., Ankara Basım yayım (17-20).
7. Yılmaz S.,(2003)Anatomi, Editor Dilek O.N.,Karaciğer cilt I., 1. baskı Ankara, Ankara Basım Yayın .(1-16).
8. Yağmurca M., (2003),Histoloji, Editör:Dilek O.N. Karaciğer cilt I.,1. baskı Ankara, Ankara Basım Yayın.(1-16).
9. Polat. C.I.(2003) Fiziyojji Editör Dilek O.N.karaciğer cilt I. 1.baskı Ankara, Ankara Basım Yayın (31-50).
10. Carnerio J.,Kelley R.O.(1998)Sindirim Kanalına Bağlı Bezler, AYTEKİN Y., Solakoğlu S., Ahuhak B., Temel Histoloji,1. baskı, İstanbul Barış kitap evi & Barış Kitapçılık.(307-319).
11. Erdoğan D., Hatipoğlu T., Görgün M., Ilgaz C. (1996), Büyük Sindirim Bezleri, Özel Histoloji, 1. Baskı Ankara, SBAD Yayınları, (94-999).
12. Aral H., (1996) Apoptosis, Sendrom Tıp Dergisi 33-37.
13. Çalışkan M., (2000), Apoatosis:Programlanmış Hücre Ölümleri , Türk J zool, 24 eksayı 31-35.

14. Erdoğan B.B., Uzaslan E.K.,(2003)Apoptozis Mekanizmaları, Tümör Gelişiminde Fas-FasL Bağımlı Apoptozis, Akciğer Arşivi, 4, 165-174.
15. Kültürsay H., Kayıkçıoğlu M.,(2002)Apoptozis ve Kardiyavasküler Hastalıklar, Anadolu Kardiyol Dergi 4, 323-329.
16. Ellis REYuan J.Y.Hartvitz H.R.(1991) Mechanisms and Functions of Celi Death, Anna Rev Celi Biol, 7,663-98 (1995).
17. Aydın Özgür M., Şamlı H., Özgür A., Solak M., Dilek H(2006),Meme Karsinomlarında Rolimenaz Zincir Reaksiyonu ve Enzim Kesimi ile p53gen Mutasyonlarının Araştırılması ve Dokuda İmmünohistohimyasal Olarak p53 Proteininin Gösterilmesi , Kocatepe Tıp Dergisi, 7 (17-22).
18. Perez, W.&Lima, M. (2007), Anatomical Description of the Liver, Hepatic Ligaments and Omenta in the Coypu (Myocastor Coypus), Int. J.Morphol.,25(1),61-64.
19. Gary S., Echeverrit F., Yeo M., et all.,(1997), Somatic mutations in the p53 tumor suppressor gene in rheumatoid arthritis synovium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Medical Sciences, (94), 10895–10900.
20. Poccia F., Pselli P., Vendetti S., Bach S., Amendola A., Plncıdo R., Colizzi V., (1996) Heath Shock Protein Expression On The Membrane Of T Cells Undergoing Apoptosis , Immunology, 88 (6-12).
21. Raff MC Social Controls on Celi Survival Celi Death. Nature 356, 397-400.
22. Öktem S., Özhan M.H., Özol D., (2001),Apoptozisin özemi, toraks Dergisi, 2(1), 91-95.
23. Sadler TW. Langman's Medical Embriyoloji, Başaklar AC (çeviri editörleri) (2002) Logman's Medikal Embriyoloji (çev) 7.baskı Ankara, Palme Yayıncılık (231-259).
24. (Moore,Persaud), Pe (2002) Systema Digestorium, Ertem D., Çeviri Editörleri:Yıldırım M., Okar İ., Dalgıç H., İnsan Embriyolojisi.6. baskıdan çeviri, İstanbul, Nobel Tıp Kitap Evleri Ltd. Şti. (298-302).
25. Gürbüz H.(2004) Karaciğerin Damar Sistemi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 21,31-35.
26. Kaşah H., Satıroğlu G. Taşerik M. (1992).İnsan Embriyolojisi, (7.baskı),İstanbul, Alfa Basım Yayım Dağıtım (181-182).

27. Dere F. (1990) Anatomi cilt I-II, 1. baskı, Adana, Okullar Pazarı Kitap Evi (633-643).
28. Kuran O.(1983),Sistematik Anatomi 1.baskı, İstanbul, Filiz kitap Evi (429-439).
29. Karagöz E.(2002) Özel Histoloji 1.baskı, Isparta, SDÜ Basım Evi (95-113).
30. Tulunay Ö. Kronik viral hepatit patolojisi. Kılıçturgay K, Badur S (Ed.) Viral Hepatit 2001.İstanbul 2001; 317
31. <http://tip.cumhuriyet.edu.tr/cutf/Donem3/KomiteIVGastrointestinalveHemato poetikSistemler/Patoloji/SemaARICI/Karacigerpat.ppt>.
32. Eroscheno VP.(2000) Di Fiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle (9. baskıdan çeviri), Ankara, Palme Yayıncılık (219-225).
33. Vardı N. ve Ark., 2007, Deneysel Diyabetin Sıçan Karaciğerinde Meydana Getirdiği Histolojik Değişiklikler Üzerine Melatoninin İyileştirici Etkileri. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*, 27:641-648.
34. Güneş H., (1999) Sitokialerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri .*J of Biology*, 23,283-292.
35. Akten T.M., Canbilen A., Kekillioğlu N.(2003), Kupffer cells, *Cerrahpaşa J. Med*.31 (110-113).
36. Carnerio j.,Kelley R.O.(1998) Sindirim Kanalına Bağlı Bezler, Aytekin Y., Solakoğlu S., Ahuhak B., Temel Histoloji,1. baskı, İstanbul Barış Kitap Evi & Barış Kitapçılık (307-319).
37. <http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EMAtlas.html>.
63. Suh Y. (2002) Cell Signaling in Aging and Apoptosis. *Mech Ageing Dev.*, 123, 881-90.
38. Ökten A. Karaciğerin Fonksiyonel Anatomisi. Ökten A, editörler. Gastroenterohepatoloji İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları. 2001:311-314
39. Özbilim G, Özkal-Üstün M, Karpuzoğlu G.,Sargın F., Serper A., (1997),Mezotelyomalarda immünohistokimyasal olarak P53 değeri, *GKD Cer Derg*,5 (122-125).
40. Yalınay Çırak M., İmir T. (1995), Apoptozis, *Klinik Tıp Bilimleri Dergisi*, 15, 319-326.

41. Cotran R. S., Kumar V., Collins T., (1999), Robbins Pathologic Basic of Disease, Philadelphia: W. B. Saunders Company.
42. Öztürk F., (2002) Apoptoz, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, 9, 143-148.
43. Tunç M. Ve Ark., (1996), Karaciğer Hücreli Karsinomalarda p53 Ekspresyonunun İmmünohistokimyasal Olarak Belirlenmesi, Gastroenteroloji Dergisi, 7 (2): 117-121.
44. Özbilim G, Özkal-Üstün M, Karpuzoğlu G.,Sargın F., Serper A.,(1997), Mezotelyomalarda İmmünohistokimyasal Olarak p53 Değerliliği, GKD Cer Derg,5,122-125.
45. Özercan İ.H., Dağlı A.F.,(2006),Bazal Hücreli Karsinomda Lokalize Amiloid birikimi ve p53 Protein Ekspresyonu, FÜ Sağlık Bil. Dergisi (20/2), 129-132.
46. Pryde J. G., Walkers A., Rossi A. G., Hannah S., Haslet C., (2000) Temperature Dependent Arrest of Neutrophil Apoptosis, The Journal of Biological Chemistry, 275, 33574-33584.
47. Moulin M., Arrigo A. P., (2006) Long Lasting Heat Shock Stimulation Of TRAIL İnduced Apoptosis İn Transformed T İymphocytes, Experimental Cell Research, 3121765-1784.
48. Mevorach B. D., Mascarenhas J. O., Gershov D., Elkon K. B., (1998) Complement Dependent Clearance Of Apoptotic Cells By Human Macrophages, J. Exp. Med. 188,12,2313-2320.
49. Hetts S.W.(1998) Today or Not Today, Jama 279,300-307.
50. Gougeon L., (2002) Evaluation Of Apoptosis, Juornal of İmmunological Methods, 265, 1-2.
51. Fadel B., Orrenius S., (2005) Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications İn Human Disease, Juornal Of İnternal Medicine, 258, 479-517.
52. Ulukaya E., (2003) Apoptozis Ders Notları, Biyokimya Anabilim Dalı, 1-19.
53. Lucas M., Rose P. E., Morris A. G., (2000) Contrasting Effects Of HSP72 Expression On Apoptosis İn Human Umbilical Vein Endothelial Cells and An Angiogenic Cell Line, ECV 304, British Journal of Haematolog,110,957-964.
54. Cotter T.G. (1995) Bcr-Abl: An Anti-apoptosis Gene in Chronic Myelogenous Leucemi, Leucemia and Lymphoma, 18.231-236.

55. Nagata S., Golstein P. (1995), The Fas Death Factor, *Science*, 267, 1449-56.
56. Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes Anemri T., Litvak G., Alnemri E.S., (1996) Molecular Ordering of the Fas-Apoptotic Pathway: the fas/APO-1 protease Mch 5 is a CrmA Inhibitable Protease That Activates Multiple Caspases Proc Natl Acad Sci USA., 93,144,86-91.
57. www20.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notlari~eulukaya.
58. Turgut B., Demir T., Çeliker Ü., (2006) Oftalmolojide Apoptoz, *Fırat Tıp Dergisi*, 11, 1-5.
59. Zhou P., Streutker C., Brojevic R., Wang Y., Croitoru K., (2007) IL-10 Modulates Intestinal Damage and Epithelial Cell Apoptosis in T Cell-Mediated Enteropathy, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, 599-604.
60. Öktem S., Özhan M.H., Özol D., (2001) Apoptozisin Önemi, *Toraks Dergisi*, 2, 91-95.
61. Hart S. P., Jackson C., Kremmel L.M., et al (2003) Specific Binding Of An Antigen - Antibody Complex to Apoptotic Human Neutrophils, *American Journal Of Pathology*, 162, 1011-1018.
62. Leytin V., Freedmen J., (2003) Platelet Apoptosis In Platelet Concentrates and Other Models, *Transfusion and Apheresis Science*, 28, 285-295.
63. Sungurluoğlu A. Erdemli, E.A., Tekeli oğlu, M., (1996) Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz, *T.Klin.Tıp.Bilimleri*, 16,333-337.
64. Schagat T. L., Wofford J. A., Wright J. R., (2001) Surfactant Protein A Enhances Alveolar Macrophage Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils, *Journal of Immunology*, 166, 2727-2733.
65. Altunkaynak Z., Altunkaynak E., (2006). Farklı Fiksasyon İşlemlerinin Karaciğer Boyutu Üzerine Etkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 13(3) 151-156
66. Tosun M., Kalkan S., Cüce H.: Apoptozisin Morfolojik Bulgularının Klasik Histolojik Boyama Metodu İle Gösterimi. *Türkiye Klinikleri Temel Tıp Bilimleri Dergisi*. Cilt:22, Sayı:3, Haziran 2002.
67. Tevzadze N., Gujabidze N., Giorgadze S., Rukhadze R., The age related changes of nitric oxide and apoptosis in experiment, (*Georgian Med News*. 2009 Apr;(169):87-90.

68. Motoyama N., Wang F., Roth KA., Sawa H., Nakayama K., Nakayama K., Negishi I., Senju S., Zhang Q., Fujii S., et-al: Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*. 267(5203): 1506-10. 1995 Mar 10.
69. Barcena A., Park SW., Banapour B., Muench MO and Mechetner E., Expression of Fas/CD95 and Bcl-2 by primitive hematopoietic progenitors freshly isolated from human fetal liver. *Blood*. 88(6): 2013-25. 1996 Sep 15.
70. Akhtar RS., Klocke BJ., Strasser A., Roth KA., .Loss of BH3-only protein Bim inhibits apoptosis of hemopoietic cells in the fetalliver and male germ cells but not neuronal cells in bcl-x-deficient mice. *J Histochem Cytochem*. 2008 Oct;56(10):921-7. Epub 2008 Jul 7.
71. Tan X., Yuan Y., Zeng G., Apte U., Thompson MD., Cieply B., Stolz DB., Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development Michalopoulos GK., Kaestner KH., Monga SP. *Hepatology*. 2008 May;47(5):1667-79.
72. Terada T. and Nakanuma Y., (1995), Detection of apoptosis and expression of apoptosis-related proteins during human intrahepatic bile duct development. *Am-J-Pathol*. 146(1): 67-74.
73. Ha J, Chu Q, Wang A, Xia T, Yang K., Wei Sheng Yan Jiu. Effects on DNA damage and apoptosis and p53 protein expression induced by fluoride in human embryo hepatocytes. 2004 Jul;33(4):400-2.
74. Tsukada T, Tomooka Y, Takai S, Ueda Y, Nishikawa S, Yagi T, Tokunaga T, Takeda N Suda Y, Abe S, et al., Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficient mice. (*Oncogene*. 1993 Dec;8(12):3313-22.
75. Armesilla-Diaz A, Bragado P, Del Valle I, Cuevas E, Lazaro I, Martin C, Cigudosa JC, Silva A. . Epub 2008 Nov 7. p53 regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors. *Neuroscience*. 2009 Feb 18;158(4):1378-89. Epub 2008 Nov 7. p53 regulates the self-renewal and differentiation of neural precursors. Armesilla-Diaz A, Bragado P, Del Valle I, Cuevas E, Lazaro I, Martin C, Cigudosa JC, Silva A.).
76. Tosun M., Tosun E., Kalkan S., Avunduk MC., “P53 expression between 13-27 weeks old human male fetus gonads”, *J Mol Histo*, 38(4), 271-4 (2007).