

**HÜCRELERDEKİ TRANSFORMASYON
GELİŞİMİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Ayşe Tansu KOPARAL
Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül 2001

**HÜCRELERDEKİ TRANSFORMASYON GELİŞİMİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Ayşe Tansu KOPARAL
Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül 2001

**Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca
Desteklenmiştir. Proje No: 991015**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Ayşe Tansu KOPARAL'ın Hücrelerdeki Transformasyon Gelişiminin Moleküler Yöntemlerle Belirlenmesi başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 02.10.2001 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Yrd.Doç.Dr.Melih ZEYTİNOĞLU...

Üye : Prof.Dr.Ahmet ÖZATA.

Üye : Prof.Dr.Ergin AÇIKALIN

Üye : Prof.Dr.Embiya AĞAOĞLU

Üye : Yrd.Doç.Dr.Hülya ZEYTİNOĞLU

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 03.10.2001 tarih ve 30/1.... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET**Doktora Tezi****HÜCRELERDEKİ TRANSFORMASYON GELİŞİMİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ****AYŞE TANSU KOPARAL****Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Yrd.Doç.Dr. Melih ZEYTİNOĞLU
2001, 103 sayfa**

Bu çalışma *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda yapılan deneysel çalışmaları içermektedir. *In vivo* çalışma olarak DMBA ile kanserleştirilmiş sıçanlara daha sonra karvakrol enjekte edilmiştir. Hem kanserleştirilmiş hem de karvakrol enjeksiyonunun ardından deney hayvanlarının akciğerleri makroskopik (anatomik) ve mikroskopik (histolojik) olarak incelenmiştir. Bu çalışmalarla, DMBA ile akciğer hücrelerinde transformasyonun meydana geldiği ve alveollerde tip II akciğer hücrelerinin sayısında artış olduğu saptanmıştır. Kanser oluşumundan sonra uygulanan karvakrolün akciğer hücrelerini olumlu yönde etkilediği belirlenmiştir. *In vitro* çalışmalar; A549, HFL1, C2 ve CO25 hücre tipleri kullanılarak doku kültürü ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmayla, kas hücrelerinde *N-Ras* onkogeninin oluşturduğu transformasyon ile akciğer hücrelerindeki kanserleşme karşılaştırıldığı gibi karvakrolün, hücrelerde oluşan transformasyona etkileri; hücre sayıları, hücre morfolojileri, hücre iskeleti ve toplam protein miktarları olarak değişik teknikler uygulanarak deneylerde kullanılan hücrelerdeki farklılıklar gösterilmeye çalışılmıştır. Karvakrol uygulanan A549 ve HFL1 hücre tiplerinde doz miktarı arttıkça, hücre sayılarında azalma, hücre morfolojisi ve iskeletinde bozulmalar, toplam protein miktarlarında azalmalar tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hücre transformasyonu, hücre morfolojisi, hücre iskeleti, karvakrol, tip II akciğer hücreleri

ABSTRACT

Doctor of Science Thesis
THE DETERMINATION OF TRANSFORMATION DEVELOPMENT
OF CELLS BY MOLECULAR TECHNIQUES

AYŞE TANSU KOPARAL

Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Melih ZEYTİNOĞLU
2001, 103 pages

This study comprises experimental works undertaken *in vivo* and *in vitro* environment. As in *vivo* study, carvacrol was injected to rats that show cancer after DMBA treatment. Lungs of laboratory animals both cancerous and carvacrol injected were examined using macroscopic and microscopic (histological) studies. These studies showed that in lungs, cell transformation occurred with DMBA and number of type II lung cells increased in alveoli. It was determined that after cancer induction, application of carvacrol affected transformed lung cells positively. *In vitro* studies were achieved by using A549, HFL1, C2 and CO25 cell lines and tissue culture methods. These studies compare *N-Ras* oncogene transformed muscle cells and cancerous lung cells, and also use different techniques to show effects of carvacrol on cell transformation; cell number, cell morphology, cytoskeleton and total protein amount in cell types that are used in the experiments. In carvacrol applied A549 and HFL1 cell types, increase in dose of carvacrol caused a decrease in cell number, degeneration of cell morphology and cytoskeleton and a decrease in total protein amount.

Key Words: Cell transformation, cell morphology, cytoskeleton, carvacrol, type II lung cells.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında kıymetli vakitlerini benim için ayıran, her ayrıntı ile titizlikle ilgilenen, her türlü desteği gösteren, maddi ve manevi yardımlarını her an yanımda hissettiğim danışman hocam Sayın Yard.Doç.Dr.Melih Zeytinoğlu'na, değerli bilgilerinden yararlandığım, beni her aşamada destekleyen Sayın Yard.Doç.Dr.Hülya Zeytinoğlu'na, bölüm laboratuvar ve imkanlarını bana açan bölüm ve anabilim dalı başkanımız Sayın Prof.Dr.Ahmet Özata'ya, çalışmalarımın istatistiksel değerlendirmelerinde değerli katkılarını aldığım Prof.Dr.Enbiya Ağaoğlu ve Sayın Yard.Doç.Dr. Berna Baloğlu Yazıcı'ya, deneysel sonuçların yorumlanmasında kıymetli görüşlerini aldığım Sayın Prof.Dr.Ergin Açıkalin'a, çalışmalarımın bir bölümünü yürüttüğüm, imkan ve desteklerinden yararlandığım TİBAM Müdürü Sayın Prof.Dr.K.Hüsnü Can Başer'e, deneysel çalışmalarında ve yazım aşamasında değerli katkılarını gördüğüm Sayın Araş Gör. Seval Korkmaz'a, Sayın Uzm.Hülya Yaşar Ocak'a, Sayın Öğr.Gör.Berrin Ayaz Tüylü'ye, Sayın Yard.Doç.Dr. Emel Sözen'e, Sayın Araş.Gör.R.Sulhi Özkütük'e, her zaman ve her konuda bana destek olan eşime ve aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
 1. GİRİŞ	1
 2. AKCİĞERLER	3
2.1. Akciğerlerin Histolojik Yapısı	3
2.1.1. Bronşlar	3
2.1.2. Bronşiyoller	4
2.1.3. Respiratuar bronşiyoller	4
2.1.4. Alveolar kanallar	5
2.1.5. Alveoller	5
2.1.6. Alveolar septum	8
2.1.7. Alveolar porlar	9
2.1.8. Alveolar örtünün yenilenmesi	9
2.1.9. Akciğerlerin kan damarları.....	9
2.1.10. Akciğerlerin lenf damarları.....	10
2.1.11. Akciğerlerin lenfoid dokusu	11
2.1.12. Akciğerin sinirsel yapısı	11
2.1.13. Plevranın normal yapısı	11
2.2. Akciğer Kanseri	11
2.3. Akciğer Kanserlerinde Sitoloji	13
2.3.1. Solunum sisteminin normal yapısı	13
2.3.2. Solunum yollarının kanser sitolojisi	16
 3. KANSER	17
3.1. Tümör Tipleri	17
3.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri	19
3.3. Karsinogenez	23
3.4. Proto-Onkogenler ve Tümör Supressor Genler	24

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
3.5. Onkogenler	25
3.6. Hücre Siklusu	25
3.7. Apoptosis	26
 4. HÜCRE İSKELETİ	 29
4.1. Hücre İskeletinin Elemanları	29
4.1.1. Mikrotübüller	29
4.1.2. Mikrofilamentler	30
4.1.3. Intermediate filamentler	31
4.2. Kanser Tedavisinde Mikrotübüller ve Aktin Filamentlerinin Yeri	31
4.3. Hücre İskeletinin Görevleri	32
 5. DOKU KÜLTÜRÜ	 33
5.1. Hayvansal Doku Kültüründeki Hücre Kaynakları	33
5.1.1. Embriyolardan hücre elde etme	34
5.1.2. Ergin hayvanlardan hücre elde etme	34
5.2. Hücre Kültürü Tipleri	34
5.2.1. Öncül hücreler (primer kültür, primary culture)	34
5.2.2. Birinci pasaj birinci öncül hücreler (sekonder kültür, secondary culture)	34
5.2.3. Sürekli kültür hücresi (cell line)	35
5.2.3.1. A549 hücreleri	35
5.2.3.2. HFL1 hücreleri	35
5.2.3.3. C2 ve CO25 hücreleri	35
5.3. Transformasyon	36
 6. POLİSİKLIK AROMATİK HİDROKARBONLAR	 37
 7. KARVAKROL	 39
 8. MATERYAL VE YÖNTEM	 41
8.1. <i>In Vivo</i> Çalışmalarda Kullanılan Materyaller	41
8.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	41
8.1.2. Kullanılan malzemeler	41

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
8.1.3. Deney hayvanları	41
8.1.4. Deney hayvanlarına uygulanan karvakrolun hazırlanması	41
8.2. <i>In Vitro</i> Çalışmalarda Kullanılan Materyaller	41
8.2.1. Kullanılan kimyasal maddeler	41
8.2.2. Kullanılan malzemeler	42
8.2.3. Hücre kültüründe kullanılan hücreler	42
8.2.3.1. A549 hücreleri	42
8.2.3.2. HFL1 hücreleri	42
8.2.3.3. C2 hücreleri	43
8.2.3.4. CO25 hücreleri	43
8.2.4. Karvakrol dozlarının hazırlanması	43
8.2.5. Dexamethasone'nun hazırlanması	43
8.2.6. Kullanılan araç ve gereçlerin hazırlanması	43
8.3. Yöntem	44
8.3.1. <i>In vivo</i> çalışmalar	44
8.3.1.1. Sıçanlarda akciğer kanserinin oluşturulması	44
8.3.1.2. Sıçanlara karvakrol uygulaması	44
8.3.1.3. Akciğer dokularının morfolojik incelenmesi	44
8.3.1.4. Akciğer dokularının histolojik incelenmesi	45
8.3.1.5. Histolojik boyama yöntemi	45
8.3.2. <i>In vitro</i> çalışmalar	46
8.3.2.1. A549 hücre kültürü	46
8.3.2.2. HFL1 hücre kültürü	46
8.3.2.3. C2 hücre kültürü	46
8.3.2.4. CO25 hücre kültürü	46
8.3.3. Hücrelerin morfolojileri üzerine yapılan çalışmalar	47
8.3.3.1. A549 hücreleri ile yapılan çalışmalar	47
8.3.3.2. HFL1 hücreleri ile yapılan çalışmalar	47
8.3.3.3. C2 hücreleri ile yapılan çalışmalar	47
8.3.3.4. CO25 hücreleri ile yapılan çalışmalar	47
8.3.3.5. Hücrelerin May-Grünwald: Gimsa ile boyanması	47
8.3.4. Hücre sayımları	48
8.3.4.1. A549 hücrelerinin hücre sayımları	48
8.3.4.2. HFL1 hücrelerinin hücre sayımları	48

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
8.3.5. Karvakrolün hücreler üzerindeki etkisini belirlemek için	
yapılan çalışmalar	49
8.3.5.1. A549 hücrelerine karvakrolün etkisi	49
8.3.5.2. HFL1 hücrelerine karvakrolün etkisi	49
8.3.6. Immünofluoresan çalışmalar	49
8.3.7. Toplam protein analizleri	50
8.3.7.1. A549 ve HFL1 hücrelerinin toplam protein	
ekstraksiyonları	50
8.3.7.2. A549 ve HFL1 hücrelerinin jel elektroforezleri	50
8.4. Mikroskopi	51
8.5. Fotoğrafi	51
 9. BULGULAR	52
9.1. <i>In Vivo</i> Çalışmalar	52
9.1.1. Akciğer dokularının morfolojisi	52
9.1.2. Akciğer dokularının histolojisi	52
9.2. <i>In Vitro</i> Çalışmalar	55
9.2.1. Hücre morfolojilerinin incelenmesi	55
9.2.1.1. A549 hücrelerinin morfolojik incelenmesi	55
9.2.1.2. HFL1 hücrelerinin morfolojik incelenmesi	56
9.2.1.3. C2 hücrelerinin morfolojik incelenmesi	57
9.2.1.4. CO25 hücrelerinin morfolojik incelenmesi	59
9.2.2. Hücre sayımları	60
9.2.2.1. Karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin hücre	
sayımları	60
9.2.2.2. Karvakrol uygulanan HFL1 hücrelerinin hücre	
sayımları	62
9.2.3. Karvakrolün hücreler üzerindeki etkisini belirlemek için	
yapılan çalışmalar	64
9.2.3.1. Karvakrolün A549 hücreleri üzerinde meydana getirdiği	
etkiler.....	64
9.2.3.2. Karvakrolün HFL1 hücreleri üzerinde meydana getirdiği	
etkiler.....	67
9.2.4. Karvakrol uygulanan hücrelerin immünositokimyasal	

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
özellikleri	71
9.2.4.1. Karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin	
immünohistokimyasal özellikleri.....	71
9.2.4.2. Karvakrol uygulanan HFL1 hücrelerinin	
immünohistokimyasal özellikleri	76
9.2.5. Hücrelerin toplam protein analizleri	80
9.2.5.1. A549 hücrelerinin toplam protein miktarlarının	
ölçümleri	80
9.2.5.2. HFL1 hücrelerinin toplam protein miktarlarının	
ölçümleri	82
10. TARTIŞMA VE SONUÇ	84
11. KAYNAKLAR	92

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
9.1. Akciğer dokularının morfolojik görüntüleri	53
9.2. Akciğer dokularının Hematoksilin Eosin boyama yöntemine göre boyanan histolojik görüntüleri	54
9.3. A549 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile 4 günlük görüntüleri	56
9.4. HFL1 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile 4 günlük görüntüleri	57
9.5. C2 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile 4 günlük görüntüleri	58
9.6. CO25 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile 4 günlük görüntüleri	59
9.7. A549 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar	60
9.8. HFL1 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar	62
9.9. A549 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile görüntüleri	65
9.10. A549 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile görüntüleri	67
9.11. HFL1 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile görüntüleri	68
9.12. HFL1 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile görüntüleri	70
9.13. A549 cell line hücrelerinin Monoclonal Anti- α Tubulin Conjugate Clone DM 1A boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri	72
9.14. A549 cell line hücrelerinin Monoclonal Anti-Actin FITC Conjugate Clone AC-40 ile boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri	73
9.15. A549 cell line hücrelerinin Alcianblue-Safranin boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri	74
9.16. A549 cell line hücrelerinin DAPI ile boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri	75
9.17. HFL1 cell line hücrelerinin Monoclonal Anti- α Tubulin Conjugate Clone DM 1A boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri	76
9.18. HFL1 cell line hücrelerinin Monoclonal Anti-Actin FITC Conjugate Clone AC-40 ile boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri	77

	Sayfa
9.19. HFL1 cell line hücrelerinin Alcianblue-Safranin boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri	78
9.20. HFL1 cell line hücrelerinin DAPI ile boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri	80
9.21. A549 hücrelerinden elde edilen toplam protein ekstraktlarının SDS- poliakrilamid jel elektroforezinden sonra boyanarak bant örneklerinin gösterilmesi	81
9.22. HFL1 hücrelerinden elde edilen toplam protein ekstraktlarının SDS- poliakrilamid jel elektroforezinden sonra boyanarak bant örneklerinin gösterilmesi	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
9.1. A549 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sayımlar	61
9.2. A549 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar	62
9.3. HFL1 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sayımlar	63
9.4. HFL1 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar	63
9.5. A549 cell line hücrelerinin spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenen toplam protein miktarları	81
9.6. HFL1 cell line hücrelerinin spektrofotometrik ölçümler sonucunda belirlenen toplam protein miktarları	82

1. GİRİŞ

Kanser; cevabı hücre biyolojisinin derinliklerinde saklı olan günümüzün ölümcül hastalığıdır. Hücrelerin denetimsiz bir biçimde aşırı derecede çoğalmaları kanser olarak tanımlanmaktadır. Özgül özellikleri olan bu hücreler çoğalmaları sırasında normal hücrelerden yapısal olarak ayrıştıkları gibi, işlevleri açısından da ayrışır; bazen normalde yaptıkları işlevleri yerine getiremezken, bazen de normal yeni işlevler kazanabilirler. Belirli bir hızla çoğalan bu anormal hücreler, bulundukları yerdeki doku ve organları işgal etmekle kalmayıp, başka yerlere giderek oradaki organları da işgal eder ve çeşitli bozukluklara sebep olurlar.

İnsanda en yaygın kanserler, kanser nedenlerinin en yaygın olarak ve kolaylıkla vurduğu organlarda gelişmektedir. Kanserojenler daima dışarıdan gelirler, doğal vücut girişlerini vururlar ve oralarda kanser oluştururlar. Dışa açık ve en fazla kanserin görüldüğü organlar akciğerler, özefagus-mide, genital, cinsel yol; rahim, meme ve prostat, cilt-deri sayılmaktadır.

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi her yıl kanser insidansını toplamaktadır. Devlet İstatistik Enstitüsü tarafından yayınlanan istatistiklerde de kanserden ölenlerin sayısı (kansere mortalitesi) verilmektedir. Buna göre 1996 yılında ülkemizde 38.113 yeni kanserli belirlenmiş ve 40.136 kişi kanserden ölmüştür. 2000 yılında kanserli sayısının 75.000'i geçeceği beklenebilir (Criss ve Baysal, 1999).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre beş yaşından sonra, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde ilk üç ölüm nedenlerinden birisi kanser olup, tüm ölümlerin %10'u kanser nedeniyledir. Dünyada her yıl 6.4 milyon yeni kanser vakası ortaya çıkmakta ve her yıl 4.8 milyon kişi de kanser nedeni ile ölmektedir. Yıllık kanser insidansı (kansere yakalananların sayısı) gelişmiş ülkelerde yüzbinde 260 iken gelişmekte olan ülkelerde yüzbinde 102'dir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde yaşam uzunluğundaki artışlarla kanser sayısında da artışlar beklenmektedir (Tuncer ve ark., 1994).

İnsanlığın uygar olma isteği sanayileşmenin önlenemez yükselişine neden olmuştur. Sanayinin kaçınılmaz sonucu olarak birçok atık çevreye verilmektedir. Bu atıklar; havayı, suyu, toprağı kirletmekte ve sonuçta insanı etkilemektedir. Gelişmiş ülkelerde son yıllarda yapılan araştırmalar, sanayileşme ve kentleşmenin ilerlemesi sonucu kanserin tırmanışa geçtiğini gözler önüne sermektedir.

İnsanlar; gelişen endüstri, sigara, hava kirliliği, bazı meslek koşulları, fuel oil ve bazı kimyasal maddeler ile motor yakıtlarının kullanılmasındaki hızlı artış sonucu açığa çıkan karsinojen etkenlere her geçen gün daha fazla maruz kalmaktadırlar. Bu

nedenle büyük şehirlerde akciğer kanser insidansı, dünyanın hemen her yerinde kırsal bölgelerden çok daha yüksek bulunmuştur (Hacıhanefioğlu, 1993).

Kimyasal ve fiziksel etkenlerin yanısıra virüsler gibi biyolojik etkenler de kanser oluşumuna yol açan çevresel nedenler arasındadır. Günümüzde kanser, oluşumunda genetik yatkınlığın da rol aldığı belirtilmektedir. Kanser hücrelerinde, abnormal kromozomların bulunduğu ve birçok karsinojenin hücre DNA'sında mutasyon oluşturarak etki gösterdiği ve bu yolla kanserin ortaya çıktığı kanıtlanmıştır (Brachet, 1985; Sheeler ve Bianchi, 1987).

İnsan ve hayvan hücrelerinin ve dokularının plastik yüzeyler üzerinde yada süspansiyon halinde büyütülmesinde kullanılan teknikler biyomedikal bilimin gelişmesine önemli katkıda bulunmuşlardır. Bu nedenle, in vitro terimi; vücut dışına çıkarılmış hücre ve dokuların gelişmelerini, farklılaşmalarını ve devamlılığını sağlayan şartlar altında büyütülmesi anlamına gelmektedir (Castell ve Gomez-Lechon, 1997).

Kanser uzun bir zamandır yalnızca onkolojinin ilgi alanı olmaktan çıkmış, viral onkoloji, moleküler biyoloji, genetik, tıbbi genetik gibi daha birçok biyoloji bilim dalının da araştırma alanı haline gelmiştir.

Hücre biyolojisi ve moleküler biyolojinin temelini anlamamızda önemli rol oynayan, hücre kültürü tekniği, in vitro methodlar içinde önemli bir yer tutmaktadır. Hücre kültürü tekniğinin; tıbbi kimya, farmakoloji, genetik, reproductive biyoloji ve onkoloji alanlarında kullanımı artmaktadır. Günümüzde doku kültüründe (hücre kültürü olarak adı değişmiştir) diğer organ sistemlerinin etkisi olmaksızın izole edilmiş hücre ve dokular kullanılarak bilimsel sorulara cevaplar aranmaktadır (Castell ve Gomez-Lechon, 1997).

Kanser hücrelerinde meydana gelen genetik değişikliklerin araştırılmasında kullanılan moleküler biyolojik tekniklerin gelişmesi hücresel transformasyonun moleküler tanımının başlamasını sağlamıştır (Slebos ve Rodenhuis, 1989).

Doku kültüründe hücrelerin transformasyonu; serumda yada tabana bağlanarak yaşayan hücrelerde, hücre büyümesinde, kontakt inhibisyonun kaybında, yüzeye bağlanmada, harekette, morfolojide ve hücre iskeletinin organizasyonunda değişiklikleri kapsayan bir seri hücresel değişikliklerin sonucudur (Pawlak ve Helfman, 2001).

2. AKCİĞERLER

Akciğerler yaklaşık olarak 140 m²'lik bir iç yüzey alanı ile insan vücudunda çevre ile temas kuran en büyük organdır. Her nefes akciğerlere, çevreden birçok partikül taşır, bu partiküller kısmen akciğerlerde kalır ve depo edilirler. Akciğerlerin değişik bölgeleri farklı depo ve temizleme mekanizmalarına sahiptirler (Möller ve ark. 2001).

Göğüs boşluğunda her iki tarafta pleural kese içerisinde yerleşmiş akciğerler, ortada mediastinumda yer alan, içinde kalbin de bulunduğu yapılarla birbirilerinden ayrılırlar. Süngerimsi elastik bir yapıya sahiptirler. Bu nedenle göğüs boşluğundan çıkarıldıklarında ya da pneumothorax'ta akciğerler yaklaşık 1/3'ü kadar küçülürler. Dış yüzleri parlaktır ve akciğer lobcuklarına uyan çokgen şeklinde sahalar görülür (Özyardımcı, 1999).

Sağda karaciğerin bulunması nedeniyle diaphragma burada daha yüksek durumdadır. Bu nedenle sağ akciğer soldan 2.5 cm daha kısadır. Kalbin sola doğru uzaması nedeniyle sol akciğerden daha geniş ve ağırlığı daha fazladır (625 gr). Sol akciğer ise sağa göre daha dar ve uzundur, ağırlığı ise 560-565 gr kadardır. Fakat bu ağırlıklar akciğerdeki kan ve seröz sıvı miktarına göre değişiklikler gösterebilir. Erkeklerde biraz daha ağır ve vücut ağırlığının 1/37'si kadar, kadınlarda 1/43'ü kadardır (Özyardımcı, 1999).

2.1. Akciğerlerin Histolojik Yapısı

2.1.1. Bronşlar

Ana bronşların yapısı trakeaya benzer. Fakat akciğere girdikleri zaman bazı değişikliklere uğrar. Bronşların çeperi mukoza, kas ve guddeleri içeren submukoza tabakaları ile kıkırdak çatısından oluşur. Mukoza, epitel örtüsü ve lamina propria'dan ibarettir. Mukoza epitel örtüsü büyük bronşlarda psödostrafiye silindirik epitelle döşelidir. Arada goblet hücreleri ile bazal hücreler yer alır. Bronşların çapları küçüldükçe epitel tabakası da incelir. Epitel tabakası, eozinofilik, belirgin bir bazal membran üzerinde yerleşme gösterir (Hacıhanefioğlu, 1993). Büyük bronşlarda kıkırdak halkanın, lümeni tamamen sarmasına karşın, bronşiyal kıkırdak bronşlarda trakeaya oranla daha düzensiz yapıdadır. Bronşiyal çap azaldıkça hiyalin kıkırdak halka, izole parçalar veya adalar şeklinde görülür, epitelin altında, bronş lamina propiasında spiral düz kasların birbirini çaprazlayan demetleri yer alır. Düz kas demetleri, solunum bölgesinin yakınındaki iletilici kısmın duvarında

daha belirginleşir. Histolojik kesitlerde bu kas tabakası aralıklı görülür. Ölümden sonra bu kasların kontraksiyonu, histolojik kesitlerde bronş mukozasına kıvrıntılı bir görünüm verir. Lamina propria elastik fibrillerden zengindir ve bronş lümenine salgısını boşaltan, bol sayıda seröz ve muköz bez içerir. Lamina proprianın içinde ve epitel hücreleri arasında çok sayıda lenfositler bulunur. Lenf folikülleri vardır ve bunlar özellikle bronşların çatallanma noktalarında bol bulunurlar (Junqueira ve ark., 1993).

2.1.2. Bronşiyoller

Bronşiyol terimi 1 mm veya daha küçük çaptaki hava yollarının tanımı için kullanılır (Hacıhanefioğlu, 1993). Mukozalarında kıkırdak ve bez içermezler, sadece başlangıç segmentlerinde epitelde goblet hücreleri bulunur (Erbengi, 1990; Junqueira ve ark., 1993). Geniş çaplı bronşiyollerde, epitel yalancı çok katlı silyalı prizmatiktir. Küçük çaplı terminal bronşiyollerde epitelin boyu alçalır, silyalı tek katlı prizmatik veya kübik olur. Terminal bronşiyal epiteli aynı zamanda Clara hücrelerini de içerir. Bu hücreler silya içermezler, apikal sitoplazmalarında salgı granülleri vardır ve muhtemelen bronşiyol yüzeyini koruduğu düşünülen, glikozaminoglikanları salgıladıkları bilinir (Murathanoğlu, 1996). Bronşiyollerin çapları küçüldükçe goblet hücreleri giderek azalır ve terminal bronşiyollerde tamamen ortadan kalkar (Hacıhanefioğlu, 1993).

Epitel tabakası altında elastik ve kollajen bağ dokusu liflerinden oluşan lamina propria yer alır. Mukozanın hemen altında respiratuar bronşiyollere kadar uzanan spiral ince bir kas tabakası bulunur ve lamina proprianın elastik lifleri ile karışır. Bunlar terminal bronşiyollerin miyo-elastik tabakasını oluştururlar (Hacıhanefioğlu, 1993).

Submukoza, kas tabakasının dış kısmında, elastik lifleri içeren yoğun bağ dokusundan oluşur ve içinde müköz ve seromüköz guddeler bulunur. Bu guddeler bronşların distal kısımlarına doğru giderek azalır ve terminal bronşlarda kaybolur.

Mukozada kıkırdak çatısının çevresindeki fibröz dokuda ve özellikle bronşların dallandıkları bölgelerde lenf nodülleri yer alır (Hacıhanefioğlu, 1993).

2.1.3. Respiratuar bronşiyoller

Her lobus'un bağımsız bir bronşiyolu ve arteriyolu vardır. Tepe noktasından lobus'a giren bronşiyol sayısı 50-100 arasında değişen terminal bronşiyollere

bölünür. Terminal bronşiyoller de sırasıyla respiratuar bronşiyollere ayrılır (Hacıhanefioğlu, 1993).

Respiratuar bronşiyol, akciğerlerde solunum işlevi gören ve "primer lobus" adı verilen en küçük birime doğru dallanarak ilerler. Yaklaşık olarak 1 mm çapındaki bu solunum birimleri ductus alveolaris, alveol keseleri ve alveollerden oluşurlar (Hacıhanefioğlu, 1993). Respiratuar bronşiyol bölümü silyalı kübik epitel ve Clara hücreleri ile döşelidir. Ancak, alveollerin açıldığı bölümde bronşiyol epiteli alveollerin tek katlı yassı epiteliyle (tip I alveolar hücreler) devam eder. Bu bronşiyollerde distale doğru alveol sayısı önemli ölçüde artar ve alveoller arası mesafe büyük oranda azalır. Alveoller arasındaki bronşiyol epiteli silyalı kübik türdendir, ancak distal kısımlarda silyalar bulunmayabilir. Epitel altında düz kas ve elastik bağ dokusu vardır (Junqueira ve ark., 1993).

2.1.4. Alveolar kanallar

Respiratuar bronşiyoller boyunca distale gidildikçe, bronşiyol duvarına açılan alveol sayısı daha da artarak sonuçta duvarda başka birşey bulunmaz hale gelir ve tüp artık alveolar kanal (alveolar duct) adını alır. Hem alveolar ductus hem de alveoller çok ince tek katlı yassı alveol hücreleriyle döşelidir. Lamina propriyada yassı epitel hücreleri altında düz kas hücrelerinden bir ağ vardır. Bu sfinkter benzeri düz kas demetleri bitişik alveoller arasında yukrular şeklinde görülür. Düz kas alveolar kanalın distal bölümlerinde kaybolur. Buralarda duktus ve alveol duvarının desteği sadece elastik ve kollajen liflerdir (Junqueira ve ark., 1993).

Alveoler kanallar her birine birkaç alveolar saccusun açıldığı boşluklarla (atria) sonlanır. Alveollerin ve alveolar saccusların bu boşluğu açıldığı bölgeler elastik ve retiküler liflerden oluşan bir kompleksle sarılıdır. Elastik lifler soluk alma sırasında alveollerin gerilerek açılmasını ve solunum süresince pasif olarak kasılmayı sağlar. Retiküler lifler aşırı genişlemeyi önleyerek ince kapillerler ile alveolar septanın zarar görmesini engeller (Junqueira ve ark., 1993).

2.1.5. Alveoller

Alveoller respiratuar bronşiyoller, alveolar kanallar ve saccuslarda bulunan yaklaşık 200 mikrometre genişliğinde torba şeklindeki çıkıntılardır. Akciğerlerin süngerimsi görünümünün nedeni olan alveoller, bronşiyal ağacın son bölümleridir. Alveoller, tek tarafı açık olan veya arı kovanın tek tarafı açık peteklerine benzer. Buralarda hava ve kan arasında oksijen ve karbondioksit değişimi olur. Alveol

duvarı, dış ve iç ortam arasında difüzyonu artıracak şekilde özel bir yapıdadır. Genelde her duvar iki komşu alveol arasında yer alır ve bu nedenle interalveolar septum veya duvar şeklinde adlandırılır. Bu interalveolar septum iki tarafında iki ince tek katlı yassı epitel ve bu iki epitel dokusu arasında kapillerler, fibroblastlar, elastik ve kollajen lifler ile makrofajları içerir. Kapiller ve bağ dokusu matriks, interstitiumu oluşturur. Alveolar septumun hücreler arası ortamında organizmanın en zengin kapiller ağı yer alır (Junqueira ve ark., 1993).

Alveollerdeki hava ile kapiller kanı arasında 3 komponentten oluşan ve kan-hava bariyeri denen bir engel vardır. Bu bariyerin üç elemanı, alveolleri döşeyen tek katlı yassı epitel, alveolar hücrelerin sitoplazması, sıkıca yan yana duran alveolar ve endothelial hücreler arasında her iki epitelin kaynaşmış bazal laminası ile endothelyal hücrelerin sitoplazmasıdır. Bu tabakanın total kalınlığı, 0.1-1.5 mikrometre arasında değişir (Junqueira ve ark., 1993). Komşu iki alveolün duvarları ortaktır ve interalveolar septum adını alır. İnteralveolar septumlar kaba tanımla, iki ince epitelyal tabaka ve bunlar arasındaki bağ dokudan oluşurlar (Murathanoğlu, 1996). İnteralveolar septum içinde anastomozlar yapan pulmoner kapillerler, retiküler ve elastik lif ağlarıyla desteklenirler. Alveol duvarının daralıp genişlemesine uygun şekilde tertiplenmiş bu lifler alveollerin temel yapısal desteğidir. septumun ara dokusunda (interstisyum) bazal membran, lökosit, makrofaj ve fibroblastlar bulunur. Alveol duvarının epithelyal (alveolar) hücreleri ile endothelyal hücreleri tarafından üretilen, iki bazal lamina kaynaşarak, komşu iki epitel arasında tek bir bazal membran oluşturur (Junqueira ve ark., 1993).

Alveoller içindeki havadan gelen oksijen kapiller içindeki kana veya tersine kapillerlerden alveol lümenine CO_2 bu katları geçerek ulaşır (Junqueira ve ark., 1993).

İnteralveolar septum 5 temel hücre türü içerir. Bunlar kapillerlerin endotel hücreleri (%30), tip I (yassı) alveolar hücreler (% 8), tip II (septal, büyük alveolar) hücreler (%16), fibroblast ve mast hücrelerini kapsayan interstitial hücreler (%36) ve alveolar makrofajlardır (%10) (Junqueira ve ark., 1993).

Kapillerlerin endotel hücreleri çok incedir ve kolaylıkla alveollerin tip I hücreleri ile karıştırılabilir. Kapillerlerin endoteli sitoplazmik porlar içermez ve kesintisiz olarak kapillerleri döşer. Nükleus ve çevresindeki organellerin kümelenmesiyle sitoplazmanın geri kalan bölümü gaz değişimini kolaylaştırmak için incilir. Yassılaştırmış periferik sitoplazmanın en belirgin özelliği çok sayıda pinositik veziküllerdir (Junqueira ve ark., 1993).

Yassı alveolar hücreler de denilen tip I hücreler alveol yüzeyini döşeyen ileri derecede incelmış hücrelerdir. Tip I hücreleri alveol yüzeyini döşeyen hücrelerin %

97'sini tip II hücreler ise % 3'ünü oluştururlar. Bu hücreler çok incedir, bazen kalınlıkları 25 nm olabilir (Junqueira ve ark., 1993). Bu hücrelerin sitoplazmaları azdır, nükleusları yassıdır (Murathanoğlu, 1996). Golgi, endoplazmik retikulum ve mitokondriyon gibi organeller, kan-hava bariyerini mümkün olduğunca inceltmek ve organelden yoksun bir sitoplazma yaratabilmek için, nükleus çevresinde toplanmıştır. İnce sitoplazma, surfactant'ın dönüşümünde ve ufak partiküllü kirliliklerden yüzeyin temizlenmesinde iş gören, pinositik veziküllerden zengindir. Bütün tip I epitel hücreleri, doku sıvısının alveolar lümene sızmasını önlemek için, desmozomlar yanında sıkı bağlantı yapılarına sahiptir. Bu hücrelerin başlıca görevleri gazların geçişine uygun minimal kalınlıkta bir bariyer sağlamaktır (Junqueira ve ark., 1993). Tip II hücreleri alveoler duvarın bazal membranı üzerine özellikle de köşe kısımlarına yerleşmişlerdir. Yüzeye doğru çıkıntı yaparlar (Koptagel, 1993).

Tip II hücreler veya büyük alveolar hücreler (septal hücreler de denir), desmozomlar ve sıkı bağlantı yapılarıyla tip I hücrelerine tutunarak onlar arasına serpilmiş hücrelerdir. Tip II hücreler kabaca kübik hücrelerdir ve genellikle alveollerin birleştikleri açılarda 2 veya 3 hücreden oluşan gruplar şeklinde bulunurlar. Bazal membran üzerinde bulunan bu hücreler alveol duvarını döşeyen tip I hücrelerle aynı kaynaktan gelmeleri nedeniyle epitelin bir parçasıdır. Tip II hücreler tipik salgı hücrelerine benzerler ve serbest apikal yüzlerinde mikrovillusları vardır. Histolojik kesitlerde, sitoplazmalarında karakteristik vakuoller veya veziküller görülür. Elektron mikroskopi için hazırlanan dokularda iyi korunmuş ve bariz olarak görülen lameller cisimlerin varlığı bu veziküllerin oluşmasına sebep olur. 1-2 mikrometre çapında olan ve konsentrik veya paralel lameller içeren yapılar unit membranla sarılıdır. Fosfolipidler, glikozaminoglikanlar ve proteinler içeren bu yapıların bu hücrelerde devamlı sentez edildiği ve apikal yüzden salgılandığı histokimyasal çalışmalarla saptanmıştır. Bu lamellar cisimler alveolar yüzeye yayılarak, yüzey gerilimini düşüren, ekstraselüler alveolar örtü pulmoner surfactantı yaparlar (Wheater ve ark., 1979; Ross ve Reith, 1985; Fawcett, 1986; Junqueira ve ark., 1993). Sürfektant maddenin azlığında, alveol lümeni kan kapillerlerinden gelen sıvı ile dolar (Murathanoğlu, 1996).

Surfactant tabakası başlıca dipalmitoly lecithin'den oluşan ince bir monomoleküler fosfolipid tabakası ile kaplı, sulu protein içeren hypophase'dan oluşur. Pulmoner surfactant akciğer fonksiyonlarının idaresinde bir çok önemli iş görür. Öncelikle, başlıca işi alveolar hücrelerin yüzey gerilimini azaltmaktır. Yüzey geriliminin azaltılmasının anlamı, alveollerin havayla dolması için daha az kuvvet harcamak ve böylece solunumu kolaylaştırmaktır. Ayrıca surfactant olmazsa

alveoller soluk verme esnasında kapanabilirler (collapse). Fötüs gelişiminde surfactant son haftalarda belirmeye ve tip II hücrelerde lameller cisimler görülmeye başlar (Junqueira ve ark., 1993).

Premature doğanlarda, solunum sıkıntısının belirtisi olarak çocuk zorlukla nefes alıp verir. Bunun gibi yeni doğanda görülen hiyalin membran hastalığı da yetersiz surfactant üretimi sonucu gelişir ve çocuk alveollerin açılmasında zorluk çeker. Son zamanlarda surfactantın bakterisidal etkisinin olduğu ve alveollere ulaşarak potansiyel tehlike gösteren bakterilerin ortadan kaldırılmasına yardım ettiği ileri sürülmüştür (Junqueira ve ark., 1993).

Surfactant tabakası durağan olmayıp devamlı değişmektedir. Yüzeyden lipoprotein, yassı hücrelerin pinositik vezikülleri, makrofajlar ve tip II alveolar hücreler tarafından yavaş yavaş yok edilir. Böylelikle bu maddeler sürekli bir salgılanım ve emilim döngüsü içine girerler (Junqueira ve ark., 1993).

Alveolleri döşeyen sıvı, iletici bölümün silyalarının aktivitesi ile uzaklaştırılır. Sekresyon hava yolunu geçerken bronşiyal mukus ile karışarak bronşalveolar sıvıyı oluşturur. bu sıvı solunan havadaki partiküllerin ve zararlı komponentlerin uzaklaştırılmasına yardım eder. Bu sıvı içinde alveolar makrofajlardan kaynaklanması olası, çok sayıda, eritici enzimler (lizozim, kollejenaz, β -glukoronidaz gibi) vardır (Junqueira ve ark., 1993).

2.1.6. Alveolar septum

Kan plazması ile solunan hava arasındaki en ince bariyer, alveol epiteli, kaynaşmış iki bazal laminadan oluşan tek bir bazal membran ve kapiller endoteline indirgenmiştir. Toz hücreleri de deneni alveolar makrofajlar kemik iliği kökenli monositlerden kaynaklanırlar. Bunlar alveolar septumun içinde yer alır ve çoğu kere alveol yüzeyinde görülürler. Çok sayıda karbon ve toz yüklü makrofaj bağ dokusunda büyük damarlar çevresinde veya pleurada bulunabilir. Ancak muhtemelen hiçbir zaman epitel içine geçmemişlerdir. Bu hücrelerdeki fagositoz artıklarının, alveol lümeninden, intertisiyal ortamı, tip I hücrelerinin pinositik aktiviteleri ile geçtiği düşünülür. Epitelin dış yüzünde, surfactant tabakası içindeki fagositik makrofajlar, farinkse doğru taşınarak yutulur (Junqueira ve ark., 1993).

Alveolar septum fibroblastlar, mast hücreleri ve kontraktıl hücreler de içerir. Intersisial ortamdaki fibroblastlar, kollajen, elastik lifler ve glikozaminoglikanları sentez ederler. Parenkimal materyalin % 15-20'sini kollajen oluşturur ve temelde tip I ve III kollajenden meydana gelir. Tip III kollajen başlıca alveolar retiküler liflerde bulunur. Tip I kollajen, birleştirici bölümün ve pleuranın duvarında yoğundur.

Kollajen yapımında artış sık görülür ve akciğer fibrosisi ile solunum zorluğu yarattığı bilinen 100'den fazla hastalık vardır (Junqueira ve ark., 1993).

Septumdaki kontraktil intersisiyel hücreler, alveolar epitelin bazal yüzüne bitişiktir fakat endothel hücrelerine bitişmezler. Antiaktin ve antimyosin antikorları ile etkileşen bu hücreler kasılarak alveol lümeni hacmini azaltırlar. Histamin ve epinephrine gibi farmakolojik ajanlar etkisiyle, akciğer parankim dokusunun kontraksiyon yaptığı in vitro olarak gösterilmiştir (Junqueira ve ark., 1993).

2.1.7. Alveolar porlar

İnteralveolar septum, komşu alveolleri birleştiren 10-15 mikrometre çapında bir veya daha çok por içerebilir. Bunlar alveollerdeki basıncın eşit olmasını veya bronşiyol tıkanığında hava sirkülasyonu için kollateral sağlayabilirler (Junqueira ve ark., 1993).

2.1.8. Alveolar örtünün yenilenmesi

NO₂ inhalasyonunun, alveolar örtü hücrelerinin (tip I ve tip II hücreler) yıkımına neden olduğu gözlenmiştir. Bu bileşiğin veya diğer toksik maddelerin etkisini, zarar görmeden kalan tip II hücrelerin artan mitotik aktiviteleri izler. Alveolar örtünün yenilenmesinde ikinci adımda, tip II hücrelerinin bir kısmı tip I hücrelerine dönüşür ve alveolar örtü tekrar normal görünümünü kazanır. Tip II hücrelerin yıpım-yapım oranının normalde günde % 1 olduğu ve böylece hem bu hücrelerin, hem de tip I hücrelerinin devamlı yenilenmesinin sağlandığı düşünülmektedir (Junqueira ve ark., 1993; Murathanoğlu, 1996).

2.1.9. Akciğerlerin kan damarları

Akciğerlerdeki dolaşım, hem besleyici (sistemik) hem de fonksiyonel (pulmoner) damarlar içerir. Fonksiyonel dolaşım pulmoner arter ve venlerle sağlanır. Pulmoner arterle, akciğerlerdeki dolaşımda düşük basınçla karşılaşan ince duvarlı damarlardır. Bu arterler, pulmoner venlerden daha çok düz kas hücresi ve elastik lif içerirler. Arterler membrana elastika internaya sahiptir; bu yapı pulmoner venlerde bulunmaz. Akciğerler organizmanın en iyi gelişmiş kapiller ağına sahiptirler (Junqueira ve ark., 1993).

Pulmoner arterler sağ ventrikülden çıktıktan sonra sağ ve sol akciğere giden ana arter dallarına ayrılırlar ve bronşların eşliğinde akciğer loblarına, segment ve

lobuluslara doğru dağılırlar. Respiratuar bronşiyollere kadar ulaşan arter dalları, ductus alveolaris'lere ve buradan da tüm alveol çeperlerine dağılan kapiller kan ağını meydana getirirler (Hacıhanefioğlu, 1993).

Alveol septumlarında kapiller ağdan akciğerlerin venaları oluşur. Bunlar da lobuluslar arası, sonra da segmentler arası bölmelerde giderek kalınlaşan pulmoner venleri meydana getirirler ve dört ana dal halinde sol atrium'a dökülürler (Hacıhanefioğlu, 1993).

Bronşiyal arterler inen göğüs aorta'sında çıkarak akciğerlerin hilusundan 1-3 kol halinde girer ve bronşları çevreleyen destek dokusu içinde ilerler. Bu damarlar, bronş duvarlarında, guddesel yapılarda ve interlobüler bağ dokusu içinde dağıldıkları gibi pulmoner arterlerin vasa vasorumlarını, bronş cidarlarını, alveol septumlarını, akciğerin interstisiyel dokusunu ve plevrayı da beslerler. Bronşiyal arterlerden gelen kanın büyük bir kısmı pulmoner venlerle geri döner. Respiratuar bronşiyollerin çevresinde yer alan alveol çeperlerinde, pulmoner arterler ile bronşiyal arterlerin son dalları arasında kapiller bir anastomoz vardır. Bronşiyol venler sağda, azigos'a, solda hemiazogis'a veya interkostal venlere dökülürler (Hacıhanefioğlu, 1993).

2.1.10. Akciğerlerin lenf damarları

Lenf damarları bronşları ve pulmoner kan damarlarını izler; bunlar interlobüler septumda da yer alır ve hepsi, hilus bölgesindeki lenf düğümlerine açılırlar. Bu lenfatik ağa, sisseral pleurada yer alan lenf damarlarını içeren yüzeysel ağdan ayırmak için derin ağ denir. Yüzeysel ağın lenf damarları hilusa doğru ilerler ve interlobüler septum aracılığı ile akciğer dokusuna girerler. Lenf damarları bronşiyal ağacın terminal bölümlerinde ve ductus alveolarisin ilerisinde bulunmazlar (Junqueira ve ark., 1993)..

2.1.11. Akciğerin lenfoid dokusu

Bronşların mukozası lenfoid dokudan zengindir. Yaygın lenfositler ve yer yer lenf folikülleri vardır. Pulmoner arter ve venlerin adventisiasında da lenfoid doku görülmesine rağmen bunlar normal olarak lenf nodüllerini oluşturmazlar .

Göğüs içinde belirli bir yerleşme gösteren bazı lenf nodülleri vardır. Bunları, 1) ön mediastinal, 2) arka mediastinal, 3) trakeo-bronşiyal, 4) akciğer içi lenf nodülleri olmak üzere 4 gruba ayırmak mümkündür.

Trakeo-bronşiyal lenf nodülü grubuna, hilus, bifürkasyon, bronşiyal ve trakeal lenf nodülleri sokulur.

Akciğer için lenf nodüllerine normalde, lob ve segment bronşlarının dallandıkları yerlerde rastlanır. Bunların dışında, folikül veya küçük lenfoid doku toplulukları halinde peribronşiyal yerleşme gösteren lenfoid doku odakları görülebilir (Hacıhanefioğlu, 1993).

2.1.12. Akciğerin sinirsel yapısı

Akciğerlere vagus ve göğsün sempatik gangliyonlarından sinir dalları gelir. Sağ ve sol vaguslar, hilusun önünde ve arkasında dallanarak bir sinir ağı oluşturur . Hilus'un arkasında, bunlara sempatik gangliyondan gelen dallar da katılır.

Vagusdan gelen lifler bronşların kasılmasını, sempatik lifler ise bronşların genişlemesini sağlar. Akciğer damarları çevresinde de sempatik ve vagusa ait (parasempatik) sinir lifleri bulunur (Hacıhanefioğlu, 1993).

2.1.13. Plevranın normal yapısı

Plevra, göğüs kafesinin iç yüzünü, akciğerlerin üzerini loblar arası fissürleri örten iki ince seröz membrandan meydana gelir. Her iki membran arasında "plevra boşluğu" ve iç yüzleri daima nemli tutan birkaç cc kadar bir sıvı bulunur.

Plevra yapraklarının serbest yüzleri, bir sıra mezotel hücre örtüsü ile döşelidir. Bunun altında fibroblastik ve elastik liflerden zengin ince bir bağ dokusu bulunur. Daha derin kısımlarda ise fazla miktarda ince kan ve lenf kapillerleri görülür.

Periyetal plevra, frenik ve interkostal sinirlerden, visceral plevra ise vagus ve sempatik sinirlerden dal alır. Periyetal plevranın ağrıya karşı duyarlı olmasına karşın, visceral plevra duyarsızdır (Hacıhanefioğlu, 1993).

2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri; Kuzey Amerika, Avrupa ve gelişmekte olan ülkelerde tütün tüketimindeki artış yüzünden kanserle ilgili ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Bu nedenle, akciğer kanseri gelecek yıllarda da dünya çapında temel sağlık problemi olarak kalacaktır (Dancey ve Le Chevalier, 1997). Akciğer kanseri en yaygın ve tüm kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahip olan kanserlerden biridir (Khuder, 2001). Her yıl akciğer kanserinden ölen insan sayısı; göğüs, prostat, kalınbağırsak

ve ovaryum kanserlerinden ölen insan sayılarının toplamından fazladır (Landis ve ark. 1999). Dünya genelinde her yıl bir milyonun üzerinde insan, akciğer kanserinden ölmektedir (Hecht, 1999).

Akciğer kanserindeki bu yüksek ölüm hızı, geçmiş yıllarda hastalığın teşhisi için gerekli standart klinik metodların olmamasına bağlanmaktadır (Wiest ve ark., 1997). Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda kanserin temel nedenlerinin başında sigara kullanımının geldiğini ve Amerika Birleşik Devletleri'nde meydana gelen kanser vakalarının 1/3'ünü akciğer kanserlerinin oluşturduğunu, akciğer kanserlerinin %90'ının da sigara kullanımı sonucu geliştiğini açıklamışlardır (Ames ve Gold, 1997; Schiller, 1998). Avustralya'da da erkeklerde kanser nedeniyle ölümlerin en büyük bölümünü akciğer kanseri oluşturmaktadır (Fang ve ark., 1995). Ülkemizde de akciğer kanserine yakalanan kişilerin sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Tuncer ve ark., 1994).

Sigara içimi, ortamdaki dumana maruz kalma, radon ve berilyuma meslek yüzünden maruz kalma akciğer kanserinin gelişmesine neden olan en iyi bilinen risk faktörleridir. Bakır madeni ve paslanmaz çelik dökümhanelerinde çalışanlarda, yüksek seviyede asbes tozuna maruz kalan kişilerde akciğer kanserine yakalanma bakımından artan bir risk olduğu rapor edilmiştir (Dancey ve Le Chevalier, 1997; Franks ve Teich, 1996). Fosil yakıtların yakılmasından kaynaklanan polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruz kalınması da akciğer kanserine neden olan önemli sebeplerden biridir. Kok fırınlarında ve doğal gaz üretiminde çalışanlar polisiklik aromatik hidrokarbonlara yüksek seviyede maruz kalırlarsa akciğer kanser riskine sahip olurlar. Nikel, krom ve bakır saflaştırılmasında kromat ve arsenik kullanılması (çünkü arsenik bu bileşiklere bağlıdır) ve bazı madenlerde radyoaktif gazdan kaynaklanan radyasyona maruz kalınması akciğer kanseri için risk oluşturur (Franks ve Teich, 1996). Bununla birlikte tütün tüketimi akciğer kanserlerinin gelişiminde açıkça saptanmış bir risktir ve akciğer kanserinden ölümlerin % 85'iyle ilişkisi olduğu görülmektedir (Minna, 1993; Dancey ve Le Chevalier, 1997; Sozzi ve Carney, 1998)

Akciğer kanseri, hücre tiplerinin çeşitli olması ve her hücre tipinin biyolojik davranışının farklı olması nedeniyle heterojen bir hastalıktır (Wolpaw, 1996). Dünya Sağlık Örgütü akciğer kanserinin dört temel tipini ve birçok alttipini tanımlamış olmasına rağmen akciğer kanserleri genellikle küçük hücreli akciğer kanserleri (SCLC: small cell lung cancer) ve küçük-hücreli olmayan akciğer kanserleri (NSCLC: non-small cell lung cancer) şeklinde ayrılırlar (Gazdar, 1992). Küçük-hücreli olmayan akciğer kanserleri tüm akciğer kanserlerinin % 75-80'ini kapsar, küçük hücreli akciğer kanserleri ise akciğer kanserlerinin % 20-25'ini

kapsamaktadır (Hoffmann ve ark., 1983; Carney ve ark., 1985; Boring ve ark., 1994). Küçük-hücreli olmayan akciğer kanseri; yassı-hücreli karsinoma, adenokarsinoma, bronşiyolalveoler karsinoma, geniş hücreli karsinoma ve farklılaşmamış karsinomalar olarak adlandırılan bazı histolojik farklılıklara sahip karsinomaları içermektedir (Cowell, 1995).

Sigara içimi akciğer kanserinin bütün histolojik tipleri ile ilişkilidir fakat ilişkinin boyutu hastalığın değişik tipleri ile değişir. Yirmi yıldan fazla süredir, akciğer kanserinin histolojik tipleri değişmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda; yassı hücreli karsinoma, küçük hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinoma insidansı azalırken, adenokarsinoma insidansı artmaktadır (Khuder, 2001). Yeni teşhis edilen akciğer kanserlerinin % 80'i küçük hücreli olmayan akciğer kanserleridir (non-small cell lung cancer) (Jones ve ark. 2000; Dingemansa ve ark. 2001). Sigara içimi ve akciğer kanseri üzerine epidemiyolojik çalışmalar elli yıldan beri devam etmektedirler. Son günlerde yapılan bazı çalışmalar; sigara içen kadınların sigara içen erkeklere göre akciğer kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olabileceği izlenimini vermektedir (Khuder, 2001).

Genel olarak NSCLC'lerden türeyen cell line hücreleri kültür ortamında bulundukları yüzeye yapışık, SCLC'lerden türeyen cell line hücreleri ise kültür ortamında süspansiyon halinde bulunurlar (Clynes, 1998).

2.3. Akciğer Kanserlerinde Sitoloji

Elektronik mikroskobun yardımı ile solunum sisteminin normal ve patolojik yapısı hakkındaki bilgilerimiz oldukça artmıştır.

2.3.1. Solunum sisteminin normal yapısı

A- Trakea-Bronşik Ağ: İnce yapı yönünden, trakea-bronşik ağ uzunluğuna eşit olmayan iki bölüme ayrılır. Birisi çok kısa olan, bronşiollerin terminal kısmına uyan ve alveoler kanallarla devam eden kısımdır. Bu kısım az diferansiye kübik epitelle örtülüdür. Diğer kısım oldukça uzun olup, trakea ve bronşların hepsini içine alır. Silli ve mukus salgılayan epitelle örtülüdür.

Özetlenecek olursa bronşlar; 1. basal hücreler, 2. mukus salgılayan hücreler, 3. silli epitelle örtülüdür.

1- Bazal Hücreler: Poligonal şekilli, az differansiye, santral iri nükleuslu, sitoplasmasında organelleri az çok dağılmış hücrelerdir. Bu hücreler epidermisin ve

özofagusun bazal epiteli ile geniş ölçüde benzerlik gösterir. Kendine göre sitoplazmik özellikleri vardır:

1. Bütün sitoplazma içine dağılmış tonofilamentler,

2. Yandaki hücrelerle temas sağlayan sitoplazmik uzantıları ve desmosomları vardır. Bu özellikleri ile de epidermisin orta tabakasını oluşturan epinli hücelere benzerler. Bu hücreler silli ve mukus salgılayan hücelere differansiye olur. Bronş kanserlerinin çoğunun bu differansiye hücrelerden çıktığı kabul edilir ve bronş kanseri ile, diğer örtücü epitel kanserlerinin uzun zamandan beri tanınan morfolojik benzerlikleri açıklanmış olur.

2- Mukus Salgılayan Hücreler: Bunlara kalisiform yada kadeh hücreleri denir. İntestinal kanalın kalisiform hücrelerine benzerler. Bu hücreler uzunca olup, ayakları ile hücreler arasından, basal membrana kadar uzanırlar. En belirgin özellikleri, ergastoplazma yönünden zengin olmalarıdır. Mukus materyalinin, protein bileşiklerinin yapıldığı, premüköz genlerin geliştiği geniş golgi apareyi ve uçta mukus taneciklerinin biriktiği geniş ağzı mevcuttur. Sekresyon boşalması kalisin daimi uyarısı ile olur ve hücre birçok kereler dejenere olmadan evvel, sekresyon siklusunu yeniler.

3- Silli Hücreler: Respiratuar mukozanın çok sayıdaki elementleridir. Bir kalisiform hücreye karşı 4-5 adet sayıya sahiptir. Elektronları az dens hücrelerdir, hücresel elementlerden fakirdir. Bununla beraber iki grup halinde birçok mitokondri ihtiva eder. bu gruplardan birisi sillerin basalinde ve diğer hücrenin proksimalindedir. siller her hücrede 200 kadardır. Yapıları komplekstir; uzunluğuna ve paralel fibriller boydan boya uzanır ve hücrenin apikal yüzeyine yerleşir. Her silyada 9 adet ikiye katlanmış fibriller, silin uç kısmında basitleşir; tek duruma geçerler. Birbirleriyle kaynaşmış gibi görünürler.

Basal kısımda ise, üçlü şekil alarak kök şeklinde devam ederler. Periferik fibrillerin kılıflarından biraz daha dens bir kılıfla sarılmıştır ve basal kısmı tamamıyla doldurur. Bu oluşumların tamamı iletiçi otonomi ve sil çıkıntılarının uyumunu sağlarlar. Bu siller hücre ile hiçbir sinirsel ilişkide değildir. Gerek silli hücreler, gerekse mukus salgılayan hücrelerin osmotik etki altında oldukları kabul edilir.

B- Akciğer Alveolleri:

1-Konjonktif doku,

2-Basal membran saran inter-alveoler kapillerler,

3-Alveoler örtü.

1-Alveoler bölümün konjonktif dokusu homojen görünümlü esas maddeden ibarettir. Bu bölme bazen fasyalar halinde, bazen grup halinde ince retikulum

liflerinedn ve özellikle alveoler kanalın seviyesinde bol elastik liflerden ibarettir. Bu konjonktif hücre ve değişik şekilde septal hücrelerden ibarettir. Lenfositoid histiosit veya bol ergastoplazmalı plasmositoid.

2-Alveoler kapillerler, kaviteye doğru çıkıntı yaparlar, bu çıkıntı alveoler örtü ile daima ayrı kalır. Kapillerler; vücudun diğer kapillerlerinden herhangi bir ayrıcalık göstermezler ve 300-600 Å kalınlığında bir basal membrana sahiptirler. Endotelleri, diğer kapillerlerin endoteline benzerler. Genellikle çok ince ve basılmış endoteller birbiriyle ata biner şekilde birleşirler. İçerisinde yeteri kadar pinositoz vesikülleri vardır. Bunlar endotelial hücrelerin dinamizmini gösterirler. Aynı zamanda absorpsiyon ve transfer olaylarında görevlidirler. İnter-alveoler kapillerlerin genişlikleri değişiktir; akciğer dolaşımının fonksiyonel durumuna göre inter-alveoler kapillerler 3-7 veya 8 mikron olurlar.

3-Alveoler örtü, konjonktif bölme yüzünü sınırlayan ve vasküler basal membran üzerine oturan, değişik morfoloji gösteren hücrelerdir. Alveoler ve kapiller duvar devamlıdır. Bu iki basal membran birleşir ve yer yer kaynaşır. Morfolojilerine göre üç tip hücre ayırdılmıştır.

a- Küçük alveoler hücreler: bu hücreler alveoler duvara plaka şeklinde dizilmiş gibidir. Nükleusları alveol kavitesine çıkıntı yaparlar. Hücreler basık olup, ince bir lam üzerine (0.1 mikron) dizilmişlerdir. Alveoler örtünün yaygın bir şeklini meydana getirirler.

b- Büyük alveoler hücreler çok sayıdadır ve normal durumunda öncekilerden daha sınırlıdır. Ovoid, 8-12 mikron büyüklüktedir. Alveoler duvara genişçe fiksedir ve ekseriya kıvrımlıdır. Nükleusları yuvarlak, sitoplazmaları boldur ve küçük alveoler hücrelerden mitokondri ve vakuollerin bolluğu ile, inklüzyonlarının koyuluğu ile ayırdedilirler. Bu hücreler alveollere doğru serbest, kısa villuslarının varlığı ile karakteristiktirler.

c- Alveoler kavitede serbest hücreler, bir öncekilerden daha az sayıdadırlar (patolojik haller dışında). Bu hücreler net makrofajik özelliğe sahiptirler ve büyük boyutludurlar (10-15 mikron). Nükleusları parlak, homojen ve kenarları düzgün değildir. Sitoplazmaları vakuollerle doludur, yoğun fagositik materyal içerirler. Bu hücreler alveoler makrofajlar veya klasik toz hücreleridirler.

Bu üç grup hücre aynı grup ve endodermik orijinli kabul edilir (Özyardımcı, 1999).

2.3.2. Solunum yollarının kanser sitolojisi

Kanser sitolojisinde önemli olan malignite kriterlerinin önceden bilinmesidir. Bu kriterler yapı ünitelerinde meydana gelen değişikliklerdir.

I- DİREKT KRİTERLER

A- Nükleusdaki Değişiklikler:

- 1- Nükleo-sitoplazmik oranın sitoplazma zararına değişmesi,
- 2- Kromatin içeriğinin artması (Hyperkromazi),
- 3- Nükleusdaki yapı anomalileri;
 - a- Nükleuslarda batone şekillerin görülmesi,
 - b- Nükleus membranının düzensiz şekil alması, kalınlaşması,
 - c- Nükleusta loblaşma ve tomurcuklanma,
- 4- Birden fazla nükleolus veya dev nükleoluslar,
- 5- Anisokaryosis,
- 6- Atipik mitozlar,
- 7- Anormal vakuolizasyon.

B- Sitoplazmadaki Değişiklikler

- 1- Sitoplazmanın boyanmasındaki değişiklikler (Eosinofilia, Basofilia)
- 2- Sitoplazma inolusyonları,
- 3- Atipik vakuolleşme.

C- Hücrelerdeki tüm değişiklikler

- 1- Hücrenin normal hacminin değişmesi (Anisositosis),
- 2- Degeneratif ve nekrotik değişiklikler,
- 3- Hücre sınırlarının belirginliğini kaybetmesi,
- 4- Bir hücrenin diğer bir hücre içine gömülmesi (kuş gözü hücresi).

II- İNDİREKT KRİTERLER

- 1- Balgamda kanın bulunması,
- 2- Lenfositlerin artması,
- 3- Bol histiosit bulunuşu,
- 4- Bol polimorf nükleuslu lökositlerin bulunuşu (Özyardımcı, 1999).

3. KANSER

Kanser eski Mısırlılardan beri bilinmekte olan bir hastalıktır. Bu hastalık ondokuzuncu yüzyılın ortalarından itibaren artmaya başlamıştır. Dünya genelinde yapılan istatistiklere göre her üç kişiden birinde kanser gelişmektedir, dört erkekten biri ve beş kadından biri kanserden ölecektir. Bu nedenle kanserin kontrolü değil, kanserden korunmak çok daha önemlidir. Yaklaşık yüz kırk yıl önce Alman mikrobiyolog Johannes Mueller, kanserlerin hücrelerden meydana geldiğini göstermiş ve normal ve kanserli hücreler arasında ki spesifik farklılıkların ipucu olacağı keşfedilmiştir (Frank ve Teich, 1996).

Kalp hastalığından sonra, kanser en sık rastlanılan ölüm nedenlerinden biridir (Wiest ve ark. 1997).

1775 yılında İngiliz bir cerrah Percival Pott ilk kez çevresel bir etken ile kanser gelişimi arasındaki ilişkiyi bildirmiştir. Pott, baca temizleyicilerinde görülen skrotum derisi ve burun boşluğunda görülen yüksek kanser sıklığının, baca temizleyicilerinin kuruma çok maruz kalmasının neden olduğu sonucunu çıkarmıştır (Karp, 1999).

Kanserin nasıl ortaya çıktığı uzun zamandır bilinmektedir. Modern görüşlere göre, hücresel DNA'nın değişmesine yada hasarına neden olabilen çevresel faktörlere maruz kalınması yüzünden transformasyon geçiren hücrelerden oluşan bir tümör ortaya çıkar. Bu gibi faktörler virüsleri, bakterileri, parazitleri, kimyasalların bir bölümünü ve ultraviyole ve iyonize radyasyonun her ikisine de içermektedir. Bu kanserojenik etkenler arasında iki önemli tip tanınır. Bunlardan birincisi hücre çoğalmasını ve göçünü kontrol eden genlerin bir bölümünde yada genlerde hasar meydana getiren etkenler, ikincisi ise tümör hücrelerinin yada onların öncül hücrelerinin gelişimini teşvik eden etkenlerdir. Genelde kanserojenler özgül hücre fonksiyonlarının yok olmasına ve yeni fonksiyonların gelişmesine neden olurlar. Ayrıca hücre morfolojisi değişebilir ve transformasyon işlemi sırasında morfolojik düzey ne kadar zayıflarsa hücrede o kadar değişik özellikler gelişir. Bu değişik özellikler; membran özellikleri, hücre-hücre bağlantıları ve hücre metabolizmasıdır (Pauwels ve ark., 1998).

3.1. Tümör Tipleri

Kanser hücreleri 2 kalıtsal özelliklerle tanınırlar, kanser hücreleri normal sınırlamalara meydan okuyarak yeniden üretilirler ve normalde diğer hücreler için ayrılmış olan bölgeleri istila eder ve koloni oluştururlar. Bu özelliklerin birleşimi

kanseri tehlikeli yapar. Çevresinden izole durumdaki anormal bir hücre önemli bir hasarı olmayan normal komşularından daha fazla çoğalamaz, kanser hücresinin hoşa gitmeyen özellikleri ne olursa olsun çoğalması kontrol edilemezse anormal hücrelerin aşırı gelişmesi ile oluşan bir kütle yani tümör yada neoplazm oluşacaktır (Alberts ve ark. 1994).

Tümörleri belli başlı üç grupta toplayabiliriz.

1- Bening Tümörler: Neoplastik hücreler tek bir kütle halinde kaldıkları müddetçe tümör "bening" yani iyi huylu olarak isimlendirilir ve kütlenin cerrahi olarak ortadan kaldırılması sonucunda tam bir tedavi gerçekleştirilebilir (Alberts ve ark. 1994). Bening tümörler hayatı tehdit edici değildir, bir kapsül içinde büyürler, bu kapsül onların büyüklüklerini sınırlar. Orijindeki hücrenin karakteristik özellikleri devam eder ve bu nedenle genellikle çok iyi farklılaşırlar (MacDonald ve Ford, 1997). Bening tümörler her dokudan oluşabilirler, lokal olarak yerleşirler bununla birlikte yaygın özellikleri uzak bölgelere yayılamamalarıdır (Franks ve Teich, 1996).

2- In Situ Tümörler: Genellikle epitelde gelişirler, değişmezler ve küçüktürler. Hücreler kanser hücrelerinin morfolojik görünümüne sahiptirler fakat epitel tabakasında kalırlar. Bazal membranı ve destek mezenşimi istila etmezler. Bazı otoriteler, kesin olarak in situyu bir kanser olarak teşhis etmezler, dysplasia'nın bir safhası olarak tanırlar fakat bazen in situ kanser oluşabilir. Teorik olarak, in situ kanserler mezenşim, retiküloendotelyal yada sinir dokusundan büyüyebilirler fakat tanınamazlar (Franks ve Teich, 1996).

3- Bir tümör "malignant" yani kötü huylu ise kanser olarak sayılabilir, bu durumda hücreler dokunun çevresini istila ederler (Alberts ve ark. 1994). Tümör hücreleri normal dokularda besinlerini kan akışı içinden sağlarlar. Bir seri protein üreten bazı tümör hücreleri, tümörün kan damarları içinde gelişmesini stimüle ederler, böylece sürekli gelişme meydana gelir. Yeni damarlar çok iyi bir şekilde oluşamaz ve kolaylıkla hasara uğrarlar, tümör hücreleri kan damarlarına ve lenfatik damarlara geçerek, damarları istila ederler. Tümör parçaları bölgesel lenf nodlarına yada uzak organlara bu damarlar ile taşınabilirler ve ikincil tümörleri oluştururlar yani matestaz yaparlar (Franks ve Teich, 1996). Bir kanser metastaz yaptığında kökünü kurutmak daha zordur (Alberts ve ark. 1994).

Kanserler türedikleri doku ve hücre tipine göre sınıflandırılırlar. kanserler epitelial hücrelerden türemişlerse "karsinoma", kas yada bağ dokusundan türemişlerse "sarkoma" adını alırlar. Hemopoietik hücrelerden türeyen lösemi kanserleri ve sinir sisteminin hücrelerinden türeyen kanserler bu iki sınıf içinde sınıflandırılmazlar (Alberts ve ark. 1994).

İnsan kanserlerinin aşağı yukarı %90'ı karsinomalardır. Bu belki de vücutta hücre çoğalmasının büyük bir bölümünün epitelden meydana gelmesi yada epitelyal dokuların fiziksel ve kimyasal hasarın farklı formlarına çok sık maruz kalmaları nedeniyle olabilir (Alberts ve ark. 1994).

3.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

İnsan kanser hücrelerinin davranışları hakkındaki bilgilerin çoğu, in vitro ortamda gelişen hücrelerin üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir (Karp, 1999).

Kanser hücreleri kendilerini sağlam hücrelerden ayıran bir takım özellikler gösterirler (Wade, 2001).

Hücrese seviyede, bir kanser hücresinin en önemli özelliği ister vücutta olsun ister kültür ortamında olsun büyüme kontrolünün kaybı olarak tanımlanır. Kanser hücresi ve pekçok normal hücre arasındaki gelişme ve bölünme kapasitesi kesin bir biçimde farklı değildir. Normal hücreler hücre çoğalmasının desteklendiği kültür ortamında büyüdüklerinde malignant olanlarınkine benzer şekilde gelişir ve bölünürler. Bununla birlikte, normal hücreler bulundukları kültür ortamının tabanını kaplayana kadar büyür ve çoğalırlar, daha sonra gelişme hızları belirgin bir biçimde düşer ve bu hücreler tek tabakalı (monolayer) olarak kalma eğilimindedirler. Büyüme hızı, hücrelerin çevreden aldıkları engelleyici etkilere bağlı olarak düşer. Bu büyüme inhibe edici etkenler, kültür ortamındaki büyüme faktörlerinin eksikliği sonucu yada kültür ortamındaki hücrelerin çevrelerindeki hücrelerle temas etmesi sonucu ortaya çıkabilir. Bunun aksine, malignant hücreler aynı şartlar altında kültür edildiklerinde, büyümeye devam ederler, birbirlerinin üzerine gelerek yığınlar oluştururlar (Karp, 1999).

Tümör hücreleri, normal hücreler dinlenirken bile sürekli çoğalma gösterirler. Tümör hücreleri normal hücrelerle aynı seviyede gelişme hızı gösterebilmek için daha az büyüme faktörüne ihtiyaç duyarlar. Bazı tümör hücreleri büyüme faktörlerini ve onların taşıyıcılarını üreten otokrin bir stimülasyona sahiptirler (Pauwels ve ark. 1998). Büyüme faktörlerinin bağlandığı yüzeydeki reseptörler değiştiği için çoğalmanın stimülasyonu bu yolla gerekmemektedir (MacDonald ve Ford, 1997).

Kanser hücreleri büyümeyi durdurma yetenekleri kaybetmişlerdir. İzolösün, fosfat, EGF ve diğer maddeler belirli bir eşik seviyesinin altında iseler besin yetersizliği bakımından normal hücreler durgun hale gelirler ve gelişme durur.

kanserli hücreler ise daha düşük besin ortamında bile gelişmeye devam ederler (Lodish ve ark., 1995).

Malignant hücreler, normal hücrelerin büyüme ve bölünmesinin kesilmesine neden olan düzenleyici sinyal tiplerine cevap vermezler. Dış sinyallere cevap eksikliği kanser hücrelerinin vücut içinde neden bir tehdit olduğunun yanıtıdır. Kontrolsüz büyüme metastatik olma eğilimi ile birleşir, bu nedenle de hücreler ölümcül tehdit yaratırlar (Karp, 1999).

Tümör hücrelerinin normal hücrelere göre daha yüksek gelişme hızları vardır, bu hücrelerde daha fazla mitoz meydana gelir ve S fazındaki hücrelerin sayısı son derece yüksektir. Bu nedenle de S fazında daha fazla hücrenin bulunduğu doku, hücre üretmek için daha fazla materyale ihtiyaç duyar (Pauwels ve ark. 1998).

Normal hücreler ile kanserli hücreler arasında yapısal ve biyokimyasal birçok farklılık da vardır. Fakat bir kanser hücresinin tiplerine göre farklılıklar vardır, bu nedenle "tipik" bir kanser hücresinin niteliklerini tanımlamak olanaksızdır. Hücreler kültürde büyüdüklerinde kanser hücrelerinin davranışı kolaylıkla çalışılabilir. Kanser hücreleri bir malignant tümörden ayrılarak, dokunun parçalanması ile sağlanabilirler ve sonra in vitro ortamda kültür edilirler. Alternatif olarak, normal hücreler karsinogenik kimyasallar, radyasyon ya da tümör virüsleri ile muamele edilerek kanser hücrelerine dönüşebilirler. Kimyasallar ya da virüsler ile in vitroda transform hale gelmiş hücreler bir hayvana yerleştirildiklerinde tümörlere neden olurlar (Karp, 1999).

Normal bir hücre ile karşılaştırıldığında, tümör hücresi daha yuvarlaktır. Diğer hücrelere ve yüzeye bağlanmak için daha az bağı vardır. Malignant hücreler orjinal yerleşmeden ayrılmayı teşvik eden yüzey proteinlerinde farklı değişikliklere sahip olabilirler. Bu nedenle, malignant hücreler dokunun çevresini istila edebilir ve diğer ve daha uzak dokulara göç ederek metastaz yapabilirler(Pauwels et al., 1998).

Kanser hücreleri ayrıca kültür ortamında hareketlilik bakımından normal hücrelerden ayrılırlar. Normal hücreler diğer hücrelerin yüzeyleri tarafından çevrildiklerinde, hareketleri kesilir, normal hücreler birbirleri üzerinden hareket edemezler ve petri kabının tabanında tek tabakalı bir şekil oluştururlar. Kanser hücreleri genellikle komşu hücrelerden gelen mesajları dikkate almazlar ve hareketlerine devam ederler. Komşu hücreler kanser hücrelerinin gelişimleri üzerinde çok küçük bir etkiye sahiptirler, kanser hücreleri normal hücrelere göre çok yüksek yoğunluklara ulaşınca kadar çoğalmaya devam ederler (Karp, 1999).

Kanser hücrelerinin yüzey proteinlerinin hareketliliğinde bir artış meydana gelir. Normal hücrelerin yüzeylerinde çok sayıda bulunan glikolipidler ve

glikoproteinler transforme hücrelerde değişikliğe uğrarlar. Plazma membranını genel yapısı değişmez bununla birlikte, yüzey lipidlerinin yana doğru hareketi aynı kalır. En önemli farklılık hücre yüzey proteinlerinin transforme hücrelerde normal hücrelere göre daha fazla hareketli oluşudur. Bununla birlikte gerçekte, lipidler daha hareketli değildirler, yüzey proteinleri ve hücre iskelet elemanları arasındaki bağlantılarda meydana gelen değişikliklerin proteinleri daha hareketli hale getirdikleri düşünülmektedir. Yüzey proteinleri ve sitoplazma altındaki bağlantılarda meydana gelen değişikliklerin kanserli hücrelerin değişmiş morfolojilerinin temeli olması muhtemeldir (Lodish ve ark., 1995).

Kültür ortamında gelişen kanser hücreleri epidermal büyüme faktör ve insülin gibi büyüme faktörlerini sağlayan serumun varlığına daha az bağımlıdır. Kanser hücrelerinin hücre döngüleri hücre yüzeyinde yerleşmiş bulunan büyüme faktör reseptörlerinden gelen sinyallere bağımlı olmadıkları için serum yokluğunda da çoğalabilirler. Ayrıca kanser hücreleri genellikle yumuşak agardan yada viskos metil selülozdan oluşmuş bir medyum içinde süspanse olduklarında da büyüyebilirler, oysa normal hücreler büyümeleri için katı bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. Bu bakımdan, kanser hücrelerinin yüzeye bağlanma özelliklerini kaybettikleri söylenebilir (Karp, 1999).

Tek tabakalı bir kültürde durgun haldeki normal hücreler temel bir protein içeriği olan fibronektin içeren yoğun bir fibril ağı ile çevrilidirler. Hatta büyüyen hücreler kendilerini çeviren fibronektine nüfuz edebilirler. Kanserli hücrelerde yüzey fibronektini ya tamamen yok olmuştur yada çok düşük miktarlardadır. Ya çok az sayıda fibronektin reseptörüne sahiptirler yada hiç fibronektin reseptörleri yoktur. Normal hücrelerden elde edilen saf fibronektinin tümör hücrelerinin bulunduğu ortama ilave edilmesi birçok tümör hücresinin düz bir şekil almasına ve oldukça normal görünüme sahip olmasına neden olur, bu nedenle yüzey fibronektininin kaybı transformasyon aşamasının önemli bir belirteçidir (Lodish ve ark., 1995).

Transformasyon sonrasında nükleusda meydana gelen en çarpıcı değişiklikler kromozomlarda meydana gelir. Normal hücreler in vivo da ve in vitro da gelişirken ve bölünürken diploid kromozomal içeriklerini devam ettirirler. Bunun aksine, kanser hücreleri aneuploidi olarak adlandırılan son derece anormal kromozom içeriklerine sahiptirler. Bu da, kanser hücrelerinin gelişmelerinin normal hücrelerinin gelişmelerine göre standart diploid kromozom içeriğine daha az bağımlı olduklarının bir kanıtıdır. Gerçekte bir normal hücrenin kromozom içeriği bozulduğunda, bir sinyal yolu hücreyi kendi kendine yok etmeye (apoptosis) doğru harekete geçirir. Buna karşılık, kanser hücreleri genellikle kromozom içerikleri son

derece bozulsa bile, apoptotik cevabı harekete geçiremezler. Apoptosisin meydana gelmemesi birçok kanser hücrelerini normal hücreden ayıran diğer bir önemli özelliktir (Karp, 1999). Nükleusda kodlanan proteinlerdeki değişiklikler malignansinin indüklenmesinde anahtar rol oynarlar. Normal hücreler ile kanserli hücreler arasındaki bu olağanüstü değişiklikler spesifik genlerin transkripsiyonundaki değişiklikler ve transkriptlerin sabitliği yüzündendir (Lodish ve ark. 1995).

Nüklear matriks, çekirdek içindeki RNA-protein iskeletidir ve DNA'nın yapısal ve fonksiyonel organizasyonuna katılır (ReplogleSchwab ve ark. 1996). Nüklear matriks proteinleri kromozomları düzenleyen ve çekirdeğe şeklini veren bileşenlerdir, bütün hücre çekirdekleri matriks proteinlerini içerir (Beardsley, 1996). Kanserli ve normal hücrelerdeki nüklear matriks protein içeriklerinin farklı olduğu araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Yamazaki ve ark. 1996).

Bir kanser hücresinin sitoplazmasında meydana gelen en belirgin morfolojik değişiklik hücre iskeletinde meydana gelir. Oysa normal bir hücre genellikle iyi organize olmuş mikrotubuller, mikrofilamentler ve intermediate filamentler içerir, kanser hücrelerinin hücre iskeleti azalmıştır ve/yada organizasyonu bozulmuştur (Karp, 1999).

Hücre yüzeyinde özel komponentlerin artmasını yada azalmasını kapsayan çok sayıda değişiklik de gözlenebilir. Bazı kanser hücreleri, tümör-associated antigenler olarak adlandırılan yeni hücre yüzey proteinlerine sahiptirler çünkü kanser hücreleri hücreye karşı yönelen antiodillerin oluşumunu indükleyebilirler. Hücre yüzeyindeki değişiklikler yüzünden, kanser hücreleri tipik olarak diğer hücrelere ve hücrese olmayan yüzeylere daha az bağlanma özelliğindedirler. Bağlanma kaybı, kanser hücrelerinin tümör kütesinden ayrılarak vücudun diğer bölgelerine göç etmesine neden olur. Tümör hücreleri arasındaki azalmış bağlanma ilişkileri, birbirleriyle olan gap junction oluşturma eğilimlerinin azalmasına neden olur (Karp, 1999).

Normal hücrelerin büyümesini sitimüle eden transforme edici büyüme faktörleri α ve β (TGFs) proteinleri transforme hücreler tarafından salınır. Bunlar normal embriyonik hücre gelişimini kontrol eden faktörler yada hormonlardır. Fakat birçok tümör hücresi tarafından gereksiz sentezlenirler (Lodish ve ark., 1995).

Transforme hücreler serum proteini plazminojendeki bir peptid bağı kırarak plasminojen aktivatör adı verilen bir proteazı sık sık sentezlerler. Bu nedenle plasminojen aktivatörün küçük bir miktarda salınması, normal serumda çok miktarda olan plasminojeni katalitik olarak aktive ederek proteaz konsantrasyonunda büyük bir artışa neden olur. Normal hücreler proteaz ile muamele edildiklerinde

transformasyonun bazı karakteristik özelliklerini (aktin mikrofilyamentlerinin kaybı, büyümenin sınırlanması gibi) gösterirler. Kanser hücreleri tarafından plazminojen aktivatörünün salınması tümör oluşum kapasitesi ile ilgili olabilir, çünkü plazmindeki artış sonucu hücreler bazal lamina içine nüfuz edebilirler (Lodish ve ark., 1995).

En önemli özellik, kültür ortamında büyüyen normal hücreler, hücre bölünmesi için sonlu mitotik bölünmelerden sonra sınırlı bir kapasite gösterirler, büyüme ve bölünme için uygun olmadıkları için yaşlanmaya girerler. Diğer taraftan, kanser hücreleri sonsuz bölünebildikleri için ölümsüz görülmektedirler. Büyüme kapasitesindeki bu farklılık normal hücrelerde olmayan fakat kanser hücrelerinde bulunan telomerazın varlığına bağlanmaktadır. Telomeraz, kromozomların uçlarındaki telomerin devamlılığını sağlayan bir enzimdir, bu da hücrelerin bölünmeye devam etmesine olanak sağlar (Karp, 1999).

Kanser hücrelerinin bir diğer özelliği yüzeye bağımlılık göstermemeleridir. Normal hücreler çoğalmak için ekstra sellüler matrikse bağlanmaya ve bu bağlanmada görev alan belli yüzey proteinlerine (integrinler) ihtiyaç duyarlar. Eğer normal hücreler matriksten ayrılırlarsa, çoğalma kesilir ve hücre ölümü (apoptosis) meydana gelir. Tümör hücrelerinde intihar davranışı gözlenmez. Tümör hücreleri çoğalma işlemlerini devam ettirirler, yaşam sirkülasyonunda kalırlar (Pauwels ve ark. 1998).

Transform hücreler daha az farklılaşmış membranlara sahiptirler ve membran taşıyıcıları da daha az farklılaşmıştır.

Tümör hücreleri değişmiş bir şeker metabolizmasına sahiptirler. Aerobik koşullar altında bile bu hücreler laktik asidi yüksek oranda salgırlar. Bu nedenle araştırmacılar tarafından şu sonuç çıkarılmıştır; tümör hücrelerinde enerji üretimi iki mekanizma ile gerçekleşir; glukozun laktik aside degradasyonu ve glukozun oksidasyonu ile enerji üretilir (Pauwels ve ark. 1998).

Kanserli hücreler glukozu normal hücrelere göre daha etkili transfer ederler. Kanserli hücreler membranlarında yüksek affiniteli bir glukoz transportörüne sahiptirler. Glukozun alımındaki hızlı ve yüksek affinite tümör hücrelerinin yüksek glikolitik aktivitelerinin bu transportörle bağlantısı yüzündendir (Lodish ve ark., 1995).

3.3. Karsinogenez

Karsinogenez birçok genetik değişikliğin bir araya toplanması sonucu ortaya çıkar (Zienolddiny ve ark., 2001). Karsinogenez, hücre çoğalması ve farklılaşması,

hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri ve programlanmış hücre ölümü (apoptosis) gibi fiziksel kurallara uymayan hücrelerin seçildiği ve geliştiği çok adımlı bir mekanizmadır (Rajewsky ve ark., 2000). Karsinogenezde ilk adım kromozomların DNA'larında meydana gelen mutasyonlardır ve bu olay "başlama" olarak isimlendirilir. İkinci adım, hücre membran ve sitoplazma mekanizmalarında ve enzim aktivitelerinde değişiklik olması ile meydana gelen anormal çoğalmanın görüldüğü 'yükselme'dir. Üçüncü safha malignant hücrelerin geliştiği ve çevredeki sağlam dokuları ve organları istila ettiği safha olan "ilerleme" safhasıdır (Weinberg, 1989; Harris, 1991; Kuroda ve Harab, 1999).

3.4. Proto-Onkogenler ve Tumor Supressor Genler

Karsinogenezde iki gen sınıfı önemli rol oynar. Bunlar proto-onkogenler ve supressor genlerdir. Proto-onkogenler hücre büyümesini ve bölünmesini teşvik ederken, supressor genler bu çoğalma işlemini engelleyebilirler (Pauwels ve ark., 1998). Genetik değişikliklerin çoğu, hücre büyümesinin ve gelişmesinin kontrolünde rol oynayan genlerde yani proto-onkogenlerde meydana gelir (Slebos ve Rodenhuis, 1989). Bir genin mutasyon geçirmesinden sonra proto-onkogenler; büyümeyi stimüle eden proteinlerin kontrolsüz biçimde aşırı üretilmesi yüzünden fazla çoğalmaya neden olan kanserojenik onkogenler haline gelebilirler. Bu gibi proteinler, hücrenin dışından sitoplazma yolu ile nükleusa spesifik taşıyıcılardan (transportörlerden) gelen büyüme sinyallerinin transdüklendiği yollarda yer alırlar. En iyi bilinen onkogenlerden birisi, insanlarda görülen kanserlerin yaklaşık dörtte birinde bulunan proteinleri üreten *ras* onkogenidir (Pauwels ve ark., 1998). Dominant aktif bir proto-onkogenin allellerinden birinde meydana gelen tek bir mutasyon, transformasyon aktivitesi ile bir onkogene dönüşmesinde yeterli olabilir (Wijnhoven ve ark., 2001).

Tumor supressor genler onkogenlerin etkisine ters hareket eder ve organizmayı kontrolsüz farklılaşmamış büyümeye karşı korur (Pauwels ve ark., 1998). Birçok tümör supressor gen hücre siklus aktivitesinin düzenlenmesi yoluyla hücre çoğalmasını kontrol eder (Crowell ve Belinsky, 1997). Bu supressor genler mutasyona uğradıklarında aşırı hücre büyümesini engelleyen proteinlerin üretimini uzun süre sürdüremezler. Bu nedenle, supressor genlerdeki kalıtsal mutasyonlar yüksek bir kanser riskine neden olurlar (Pauwels ve ark., 1998). Tümör supressor genlerdeki mutasyonlar genellikle resesiftirler, tümör supressor genin bir allelindeki mutasyon, genin ikinci alleli fonksiyonel olduğu müddetçe büyüme kontrolünü bozmaz. Bu yüzden bir tümör supressor genin ikinci allelindeki kayıp kanser

gelişiminde tehlikeli bir olaydır (Wijnhoven ve ark., 2001). İnaktif haldeki supressor genler anormal hücre gelişimini durduramazlar ve tumor meydana gelir. Supressor bir gen olan kromozom 17 üzerindeki p53 geni *ras* ve viral onkogenik proteinleri inaktif hale getiren bir protein kodlayabilir, böylece normal bir hücrenin malignant bir hücreye dönüşmesi olasılığını azaltabilir. Son günlerde akciğer kanseri ve sigara dumanının içerdiği karsinojenlerden ortaya çıkan p53 mutasyonları arasında direkt bir ilişkinin olduğu görülmüştür (Pauwels ve ark., 1998).

3.5. Onkogenler

Onkogenler hücresel çoğalmanın düzenlenmesi için gerekli oldukları için, birçok kanserin gelişiminde önemli oldukları düşünülmektedir (Bishop, 1987; Bishop, 1991). Kültür ortamında hücreler normal protoonkogenlerin aşırı ifadesi ile ya da spesifik nokta mutasyonlarının başlaması ile aktif hale gelen *ras* genleri sayesinde transform hale gelirler (Barbacid, 1987; Pimental, 1989). Bütün genler gibi, *ras* genleri de hücreler üzerindeki etkilerini kendi protein ürünleri yolu ile gerçekleştirirler. İnsanlarda görülen birçok kanserde genellikle *ras*'ın aktif halde olduğu bulunmuştur (Wasilewska ve ark. 1999). Son on yılda *myc* ve *ras* onkogen ailelerinin insan akciğer karsinogenezinde önemli olduğu açıklığa kavuşmuştur, *myc* onkogenleri genellikle küçük hücreli akciğer kanserlerinde değişikliğe uğramış olarak bulunurlar ve bu değişiklikler hızlı büyüme ve ilerleme ile ilgili görülmektedir (Slebos ve Rodenhuis, 1989). *Kras* geni küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastalardan alınan tümörlerde en sık mutasyona uğrayandır, yaklaşık olarak akciğer adenokarsinomlarında teşhis edilen mutasyonların % 90'ında görülmektedir (Richarson ve Johnson, 1993). Baskın *Kras* mutasyonu insan akciğer adenokarsinomlarında 12. kodondaki ilk bazda GC'nin TA'ine dönüşümünde saptanmıştır (Devereux ve ark., 1996). *Kras* gen mutasyonları sigara içilmesi ile yakından ilgilidir, bu tip adenokarsinomalar geçmişlerinde sigara kullanmış hastaların tümünde bulunur (Slebos ve Rodenhuis, 1989).

3.6. Hücre Siklusu

Karmaşık bir işlem olan çoğalma işleminin merkezi, hücre siklusunda hücrenin içinde bulunduğu safhaların kontrolüdür. Hücre siklusu DNA'nın iki katına çıkmasına ve hücre bölünmesine neden olan bir seri olayları kapsar. Normalde hücreler bu siklusta dikkatli bir biçimde kontrol edilir fakat tümör hücreleri kontrol edilemez. Genlerdeki mutasyonlar siklus ile bağlantılıdır, bu olay

siklusda hasarlı DNA içeren hücrelerin ilerlemesine neden olur. Hücre siklusunun safhaları yaklaşık kırk yıldır bilinmektedir fakat yalnızca üç-dört yıl önce bu siklusu kontrol eden genler teşhis edilebilmiştir. Hücre siklusu dört farklı safhaya sahiptir. Bu safhalar; G1, S, G2 ve M safhalarıdır. İlk safha G1 (dinlenme) fazıdır, DNA replikasyon fazı S fazıdır, G2 ikinci dinlenme safhasıdır, üç safha birlikte interfazı oluştururlar, bu period bir çekirdek bölünmesinin bitişinden diğerinin başlamasına kadar geçen süreyi kapsamaktadır. Bu period mitoz tarafından takip edilir. Hücre siklusunun uzunluğu bir türden diğerine, bir dokudan diğerine değişir fakat genelde 16-24 saat sürer. G1'de hücreler, DNA sentezine hazırlanırlar, RNA ve proteinlerin biosentezini gerçekleştirirler. Bu fazın uzunluğu çok değişkendir. S fazında DNA replike olur ve histonlar sentezlenir. S fazının sonunda hücrenin DNA içeriği iki katına çıkar ve kromozomlar replike olurlar. G2 fazında hücreler bölünmeye hazırlanırlar, proteinlerle kompleks oluşturmuş DNA replike olur ve biosentez devam eder. Çekirdek ve sitoplazma mitoz sırasında bölünür ve şartlar gelişme için uygunsa iki kardeş hücre oluşur ve bu hücreler yeni bir hücre siklusunun interfazına girerler. Mitojenler yoksa ve besin tükenmişse, hücreler G0 olarak adlandırılan bir dinlenme fazına girerler (Kuznetsov ve Blokhin, 2000; Macdonald ve Ford, 1997; Franks ve Teich, 1996).

Bir safhadan diğerine geçiş birçok kontrol mekanizması ile düzenlenir. Memeli hücrelerinde ilk kontrol noktası başlama yada restriksiyon noktası olarak bilinen G1 fazının sonlarındadır. Bu kontrol noktasında DNA'da hasar varsa gözlelenebilir ve gerekiyorsa bu hasar onarılmaya kadar siklus aksar. Bu kontrol noktasının kaybı genomik sabitsizliğe ve hasarlı hücrelerin hayatta kalmasına neden olur. Diğer kontrol noktaları S fazı ve G2'den M'e geçiş noktalarıdır. Kontrol noktalarının düzeni tümörlerde bozulur ve hücre siklus elemanlarını kapsayan genlerde mutasyonlar meydana gelir, bu da genomik sabitsizliğe ve kansere neden olur (Macdonald ve Ford, 1997).

3.7. Apoptosis

Apoptosis kelimesi Eski Yunan'da sonbahar mevsiminde düşen yaprakları tasvir etmek için kullanılan bir terimdir (Cook, 1994). Programlanmış hücre ölümü yada apoptosize gösterilen ilgi kökeninde embriyonik gelişim, othereaktif T hücrelerinin çıkarılması ve normal doku turnoverını içeren doku homeostazisindeki rolü nedeniyledir. Bununla birlikte son günlerde ilgi, apoptosizin tümör gelişimindeki ve tedavisindeki önemi üzerine toplanmıştır. Apoptosiz pre-neoplastik hücrelerin yok edilmesinde önemli bir rol oynar. Böylece hastalığın ilerlemesi

durdurulabilir ve bu gibi hücreler yok edilebilir. Apoptosiz tumor gelişiminin ve genetik mutasyonların tespit edilmesinde önemli bir rol oynayabilir. Radyasyon uygulamasıyla ve kanser kemoterapisinde kullanılan birçok ilaç ile yeni oluşmuş tümörlerin tedavisi sırasında hücre ölümü apoptosiz ile indüklenir. İşte bu nedenle apoptosiz önem kazanmaktadır. Apoptosiz, her tip kültürlenmiş kanser hücreleri yada birincil kanser hücrelerine uygulanan ilaçların etkilerinin araştırılmasından tutun da spesifik genetik yolların apoptosiz ile kontrolünün araştırılmasına kadar her yönden yoğun bir soruşturma altındadır (Clarke ve ark.2000).

Hücre içinden ve dışından gelen birçok sinyal apoptosizi tetikler.

Apoptosizde çekirdek, sitoplazma ve hücre yüzeyinde değişiklikler meydana gelir. Ölüm sinyalinden sonra apoptosizin ortaya çıkış zamanı değişir fakat değişiklikler hızlı bir şekilde meydana gelir.

Hücreler komşuları ile ilişkilerini kaybederler ve yuvarlak hale gelirler. Endoplazmik retikulum genişler ve superficial cisternae plazma membranı ile kaynaşır. Diğer sitoplazmik organeller büyük ölçüde etkilenmeden kalırlar. Endoplazmik retikulum yoluyla hücre yüzeyine yönelen su ve iyonların hücreden boşaltılması nedeniyle hücre yoğunluğunda beklenmedik bir artış meydana gelir. Organeller sıkışır, aynı zamanda hücre hacminde bir azalma meydana gelir. Apoptosis sırasında hücre büyüklüğü ve şeklinde meydana gelen değişiklikler hücre iskeletinin yeniden organizasyonunu gerektirir. Nükleus yoğunlaşır ve kromatin sağlam nükleus membranı altında granüller haline gelir. Nükleolar fibriller merkezi transkripsiyon kompleksleri ile ilgisini keser. Hücre yüzeyi kabarcıklanmaya başlar, faz kontrast mikroskobu ile yapılan çalışmalarda olağan dışı kabarcıklanma olduğu gözlenmiştir. Bu zaman süresince çekirdek birkaç membran-bağlı parçacıklara ayrılır. Daha sonra hücre kendi kendine nüklear parçaları içeren "apoptotik parça"lara ayrılır. Apoptotik parçalar bir enfeksiyon durumu ortada yokken komşu hücreler yada makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Apoptosis sırasında spesifik mRNA'ların transkripsiyonu artar. Bölgeye özgü endojen RNAase aktivitesi apoptosizde geç meydana gelir, bu da apoptik hücrelerde ribozomal ve haberci RNA'nın hızla parçalandığını akla getirmektedir. Nüklear membran mitozun tersine apoptosis de kaybolmaz. Bununla birlikte kromatine destek olan alttaki nuklear lamina, lamin filamentlerin nüklear depolimerizasyonu ile bozulur. Apoptosizi teşhis etmenin altın yolu morfolojik değerlendirmedir (Bellamy ve ark.1995).

Birçok hücressel sistemde apoptotik ölümden kısa bir süre önce morfolojik değişiklikler meydana gelir. Dinamik membran kabarcıkları dinamik hücre iskeletinin yeniden organizasyonunu gösterir, bu nedenle membran kabarcıklarının oluşumunu gözlemlemek için yapılan çalışmaların çoğunda hücre iskelet

proteinlerinin bu olaydaki rolüne dikkat edilmiştir (Song ve ark. 2000). Cottler ve ekibi apoptotik bodilerin oluşumu için mikrofilament topluluklarının gerekli olduğunu rapor etmişlerdir, F-aktin polimerizasyonu bu işleme katılabilir (Cotter ve ark. 1992). Aktin filamentleri ve hücrelerin plasma membranları arasındaki bağlantı devamlılık ister. Bağlantı moleküllerindeki eksiklik plasma membranının küre şeklini almasına neden olur (Song ve ark. 2000).

4. HÜCRE İSKELETİ

Hücrelerin sitoplazmaları, membranlara ve membranlara bağlı organellere ilave olarak fibröz bir matrikse sahiptirler. Sitoplazma içerisinde üç temel fibröz sistem yer almaktadır. Bunlar mikrotübüller, mikrofilamentler ve intermediate filamentlerdir (Ben-Ze'ev, 1985).

4.1. Hücre İskeletinin Elemanları

4.1.1. Mikrotübüller

Mikrotübüller ökaryotik hücrelerde hücre iskeletinin anahtar bileşenleridir. Mikrotübüller değişik yapıların bileşenleridir. Hücre iskeletine ilaveten; mitotik iğ, sentriyoller, sil ve kamçının çekirdeğinde de yer alırlar (Karp, 1999). Mikrotübüller; hücre mimarisinde, harekette, ve organellerin hücre içi taşınmasında (Dustin, 1978; Robertis ve Hyams, 1979), hücre polaritesinin sağlanmasında (Maro ve ark.1991; Buendia ve ark. 1990), hücre oryantasyonunun düzenlenmesinde (Anderson ve ark.1984; Oakley ve Brunette, 1993), mitotik iğ oluşumunda ve hücre bölünmesinde çok önemli bir rol oynarlar (Uckun ve ark.2000).

Mikrotübüller üç temel fibril sisteminin en genişidirler, içleri boş, tüp yapılarıdır. Mikrotübüllerin dış çapı 24 nm'dir ve çekirdek çevresindeki alandan hücre periferine kadar uzun mesafelerde sitoplazmayı geçerler (Ben-Ze'ev, 1985). Duvar kalınlığı yaklaşık olarak 5 nm'dir. Mikrotübüller, diziler yada protofilamentler şeklinde düzenlenmiş $\alpha\beta$ -tubulin heterodimerlerinden oluşmuş polimerlerdir (Rao ve ark., 2001). Tubulin alt ünitelerinin iki tipi benzer bir üç boyutlu yapıya sahiptirler ve sıkıca birbirlerine sarılırlar. Tubulin dimerleri herbir protofilament boyunca uzanan uzun sıralar halinde düzenlenmişlerdir. Çünkü herbir oluşan birim iki nonidentikal bileşenden(bir heterodimerden) oluşur, protofilament asimetrik; α - tubulin bir uçta, β -tubulin diğer uçtadır. Bir mikrotübülün bütün protofilamentleri aynı polariteye sahiptir. Mikrotübülün bir ucu (+) yada hızla büyüyen uç, diğer uç (-) yada yavaş büyüyen uç olarak bilinir. β -tubulinler bir mikrotübülün (+) ucunda yer alırlar, α -tubulinler (-) ucunda yer alırlar (Karp, 1999).

Mikrotübüllerin esneklik, sağlamlık, iletişim kapasitesi gibi bir çok özelliği, mikrotübüllere bağlı proteinlerin bir grubunun üyeleri (MAPs) tarafından etkilenir. Mikrotübüller sıkıştırılmaya ve bükülmeye karşı dayanıklıdır. Bu özellik onlara mekanik destek özelliğini kazandırır sanki çelik kemerlerin yüksek binalara destek

sağlaması gibi. Bir hücre içinde sitoplazmik mikrotübüllerin dağılımı hücrenin şeklini belirlemeye yardım eder. Kültür edilen hayvan hücrelerinde, hücrelere yuvarlak, düz şekil veren mikrotübüller çekirdek çevresinden dışarıya doğru ışınsal bir düzlemde uzanırlar (Karp, 1999).

Mikrotübüller, Ca^{+2} , düşük sıcaklık, kolsişin, vinblastin ve griseflavin gibi çeşitli alkaloidlerin varlığında hızla tubulin dimerlerine parçalanırlar. Bu ajanlar ortamdaki uzaklaştırıldığında tubulinlerin birleşmesi ile mikrotübüller hızla oluşur ve son derece dinamik mikrotubular iskelet yeniden şekillenir (Ben-Ze'ev, 1985).

4.1.2. Mikrofilamentler

Mikrofilamentler yaklaşık olarak 8 nm çapında ve aktin proteininin globular alt birimlerinden oluşmuşlardır. ATP'nin varlığında, bu aktin alt birimleri, herbiri bir çift heliks içinde çevresinde dolanan aktin moleküllerinin iki ipliğinden oluşmuş esnek bir filament oluşturmak için polimerize olurlar. "Aktin filamentleri", "mikrofilament", "F aktin" ve "stres fiber" terimleri bu iki iplikli filament tipi için kullanılan eş anlamlı sözcüklerdir (Karp, 1999).

Aktin filamentleri, mikrotübüllere göre daha ince, daha kısa ve daha esnektirler. Bir hücre içindeki bireysel aktin filamentleri mikrotübüllere göre daha fazladır, bir hücredeki tüm aktin filamentlerinin toplam uzunluğu mikrotübüllerin tümünün uzunluğundan 30 kat daha fazladır (Alberts ve ark.1998).

Aktine dayalı hücre iskeletleri, hücre hareketinde ve morfogenezde önemli bir rol oynar ve hücre içi sinyal iletimine karıştıklarına inanılmaktadır. Intermediate filamentler ve mikrotübüller gibi diğer hücre iskelet elemanları ile karşılaştırıldığında aktin filamentlerinin karakteristik özelliklerinden biri plazma membranları ile mükemmel etkileşimidir (Tsukita ve ark.1997). Hücre hareketinin mekanizması, periferik sitoplazma tarafından desteklenen polimerize aktin filamentler ağına dayanmaktadır (Cunningham, 1992).

Aktin monomer ve polimerlerinin hücre hareketi, sitokinez, sekresyon, protein ayrılması, mRNA yerleşimi, glikoliz ve sinyal iletimi gibi pek çok hücre fonksiyonuna karıştığı gösterilmiştir. Aktin ve aktine-bağlı proteinlerin hücre içinde anormal ifadesi hücre transformasyonunu, metastaz potansiyelini, hareketi, fibrotik hastalıkları ve yara oluşumunu göstermektedir. Aktin hücreye sertlik sağladığı için, anormal aktin yapısı yada düzeni hücreleri normal fonksiyonuna göre ya çok yumuşak ya da çok sert hale getirir (Janmey ve Chaponnier, 1995).

4.1.3. Intermediate filamentler

Yapısal ve immünohistokimyasal çalışmalar, hemen hemen tüm eukaryotik hücrelerde üçüncü bir iplikçi yapı olduğunu ortaya çıkarmıştır. Aktin filamentinden daha kalın , mikrotübüllerden ise daha ince olan ve daha basit bir düzenleme ile oluşan bu yapılara intermediate filamentler denir. Çapları 100-120 Å olan intermediate filamentlerin, çeşitli proteinlerden oluştuğu saptanmıştır (Brachet, 1985; Akay, 1996). Bu yüzden yapısal olarak birbirlerine benzeyen ancak kimyasal olarak farklı bir çok ara filament vardır. Bunlar keratin, desmin, vimentin filamentleri ile glia ve nörofilamentlerdir (Akay, 1996).

Intermediate filamentler hücresel farklılaşma ve çekirdeğe doğru sinyal iletimi ile ilgili yaşamsal fonksiyonları destekler (Bichat ve ark.1997).

4.2. Kanser Tedavisinde Mikrotübüller ve Aktin Filamentlerinin Yeri

Mikrotübüller ve aktin filamentler; hücre büyümesinde ve bölünmesinde, hücre hareketinde, sinyal iletiminde, hücre gelişiminde ve hücre şeklinin devamlılığının sağlanmasında önemli hücre iskelet polimerleridirler (Jordan ve Wilson, 1998).

Mikrotübül dinamikleri, hücrede mikrotübüle-bağımlı birçok işlemde önemlidir ve mitozda çok önemli rolü vardır. Hücreler mitozla girdiklerinde hücre iskeletine ait mikrotübül ağı bozulur ve mikrotübüllerin bipolar iğ şeklinde dizileri kromozomların bağlanmaları için oluşur ve kromozomlar iki iğ ucuna hareket ederler. Mikrotübül dinamikleri interfaz hücrelerinde son derece yavaştır fakat mitozda 20-100 kat artar (Jordan ve Wilson, 1998).

Mikrotübüller uzun zamandan beri kanser kemoterapisi için değerli hedeflerdir. Mikrotübül dinamikleri üzerine yapılan son çalışmalar, sadece varlıklarının değil hücre çoğalması için de önemli olduklarını göstermiştir (Jordan ve Wilson, 1998).

Birçoğu doğal ürünlerden türetilen kimyasal olarak birbirinden farklı pek çok bileşik, tubulin ya da mikrotübüllere bağlanarak, mitoz sırasında metafazın anafaza dönüştüğü aşamada mitotik iğe etki ederek hücre çoğalmasını engeller (Jordan ve Wilson, 1998).

Otuz yıldan fazla süredir, transforme hücrelerde esasen hücre iskeletinin değişikliğe uğradığı bilinmektedir ve bu olay gerçekleştirilirken aktine-bağılı düzenleyici proteinlerde de değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin, tümör hücrelerinin anormal gelişme özellikleri dokulara nüfuz edebilme ve artan metaztaz

yeteneği ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Bu alanda yapılmış olan çalışmaların ışığında aktin filamentler ve onların birçok düzenleyici proteini kanser kemoterapisi için çekici gözükmemektedir. Örneğin bir çalışmada sağlam hücrelerle transforme hücreler karşılaştırıldığında, polimerize haldeki aktin oranının çözünebilir aktine oranının azaldığı görülmüştür. Çözünebilir aktinin artmış seviyesi ve polimerize aktinin azalmış seviyesi tümöregenezde erken teşhis için veri olabilir (Jordan ve Wilson, 1998).

4.3. Hücre İskeletinin Görevleri

Hücre iskeletinin temel görevleri şunlardır;

- 1- Hücre şeklinin sağlanmasında yapısal bir destek sağlar. Örneğin, birçok kültür hücresinin yuvarlak şekli, hücre sitoplazmasındaki mikrotübüllerin ınsal bir düzende olması nedeniyledir.
- 2- Hücre içindeki farklı organellerin yerleşiminde bir iç çatı görevi görür. Bu fonksiyon özellikle polarize olmuş epitel hücrelerinde görülür. Epitel hücrelerinde organeller apikalden bazale doğru bir eksen boyunca dizilmişlerdir.
- 3- Hücre iskeleti, hücre içindeki maddelerin ve organellerin hareketini sağlar. bu fonksiyona örnek olarak; mRNA moleküllerinin hücrenin özel bölümlerine hareketi, endoplazmik retikulumdan golgiye taşıma veziküllerinin hareketi, sinir hücresi boyunca neurotransmitterlerin hareketi verilebilir.
- 4- Hücrenin bir yerden bir yere hareketinde, güç-üreten bölümüdür. Tek hücreli organizmalar ya katı bir yüzeyin üzerinde sürünerek ya da su ortamı içinde yüzeyinde dışarı doğru çıkıntı yapmış olan özelleşmiş locomotor organeller yardımıyla (sil ve kamçı) ileriye doğru hareket ederler. Çok hücreli hayvanlarda sperm, akyuvarlar ve fibroblastlar bağımsız hareket yeteneğine sahiptirler.
- 5- mRNA'nın bağlanması için bir bölgedir ve mRNA'ların polipeptidlere transformasyonunu kolaylaştırır. Hücreler noniyonik deterjanlarla ekstrakte edildiklerinde, hücrenin transformasyon mekanizmasının bazı deterjanlarla çözülmeyen hücre iskeletinde kalır.
- 6- Hücrenin bölünme mekanizmasının önemli bir elemanıdır. Hücre iskelet elemanları sitokinez sırasında iki kardeş hücre içine ana hücrenin bölünmesi için mitoz ve mayoz sırasında kromozomların ayrılmasından sorumludurlar (Karp, 1999).

5. DOKU KÜLTÜRÜ

Canlı hücreler incelendikleri ortama bağlı olarak kısa süre içinde canlılıklarını kaybederler. Hücreleri daha uzun bir süre canlı olarak saklayabilmek ve bu süre içinde inceleyebilmek için kullanılan yaygın bir yöntem, doku veya hücre kültürüdür (Ozban, 1988). Normal ortamdan izole edilen tümör ve normal hücrelerin direkt incelenmesi için, doku kültürü teknikleri kullanılır. Bu teknikler canlı hücreler üzerinde maddelerin direkt etkilerinin çalışılmasına ve hücre ürünlerinin karakterizasyonunu sağlayarak karışık bir hücre popülasyonundan farklı hücre tiplerinin ayırtilmesine olanak sağlar (Franks ve Teich, 1996).

En sık kullanılan teknik hücre kültürü tekniğidir. Bu teknikte doku, tümör parçaları yada ayrılmış hücreler sıvı besleyici bir medyum içeren steril cam yada plastik kaplar içine konulur ve hava ve karbondioksit (genellikle % 5) olan bir atmosferde, vücut sıcaklığında bir inkübatöre yerleştirilir, bu ortam canlı ortamına benzerdir. Eğer kültürler başarılıysa, doku parçalarından hücreler gelişir ve kabı doldurur. Hücreler bu kaptan alınarak başka kaplara aktarılabilir yada sıvı azotta stoklanabilirler. Hücre kültürü ilaçların etkilerinin ve hücrelerin birbirleriyle olan ilişkilerinin araştırılmasında kullanılabilir. Bu tekniğin bir modifikasyonu tümör yada sağlam dokulardan alınan parçalar kullanılarak organize bir form (organ kültürü) oluşturmada kullanılabilir. Bu teknikle bazı hormonların etkileri araştırılabilir (Franks and Teich, 1996). Hücre kültürü bütün canlıya kıyasla daha yalın ve kontrol altına alınmış koşullarda incelenebilen bir deneysel sistem oluşturur (Yakar, 1987). Hücre kültürü, hücre ve moleküler biyolojinin gelişimi için önemli temel bir tekniktir (Franks and Teich, 1996).

5.1 Hayvansal Doku Kültüründeki Hücre Kaynakları

Doku ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak olan materyaller;

1. Direkt olarak normal ya da anormal embriyo,
2. Ergin organizmalardan alınan doku veya hücreler,
3. Yapılmış hazır kültürden alınan doku veya hücreler gibi çeşitli kaynaklardan elde edilebilir.

5.1.1. Embriyolardan hücre elde etme

Genelde embriyonik dokulardan üretilen kültür hücreleri, mitojenik aktivitelerinin çok hızlı olması nedeniyle ergin organizma dokularından üretilen hücrelerden daha iyi gelişirler (Freshney, 1989).

5.1.2. Ergin hayvanlardan hücre elde etme

Ergin hayvan dokuları genellikle farklılaşmalarını tamamlamış hücreler olduğundan daha düşük bir gelişme gösterirler. Replike olmayan özelleşmiş hücrelere sahiptirler ve daha yapıbal, daha yavaş parçalanarak ekstrasellüler matriks içindedirler. Bu dokulardan kültür edilen hücrelerin çoğalması daha zordur ve kültürün ömrü genellikle daha kısadır (Freshney, 1989).

5.2. Hücre Kültürü Tipleri

Hücre kültüründe üç tip kültür hücre tipi tanımlanır (Yakar, 1987; Freshney, 1994). Bunlar;

1. Öncül hücreler (primer kültür, primary culture)
2. Birinci pasaj birinci öncül hücreler (sekonder kültür, secondary culture)
3. Sürekli kültür hücresi (cell line)'dir.

5.2.1 Öncül hücreler (primer kültür, primary culture)

Kültür kapları içinde canlı doku parçalarından göç ederek ortam tabanına tutunan hücrelerin oluşturduğu ilk (öncül) hücrelerdir (Jakoby ve Pastan, 1979; Lackie ve Dow, 1989).

5.2.2. Birinci pasaj birinci öncül hücreler (sekonder kültür, secondary culture)

Birinci pasaj birinci öncül hücreler, öncül doku kültürlerinden elde edilen hücrelerin enzimatik yollarla yeni bir ortama aktarılması ve bu ortamda çoğalmasıyla elde edilen ikinci kuşak hücrelerin oluşturduğu kültür hücreleridir (Alberts ve ark., 1989).

5.2.3. Sürekli kültür hücresi (cell line)

Diğer hücre kültürlerine oranla in vitro koşullarda devamlı büyümeye uyum gösteren kültür hücre tipidir (Anonymous, 1984). Sınırsız bir hücre bölünme yeteneğine sahip bu kültür hücreleri ölümsüz sayılır. Bu nedenle geçici bir hücre kültüründen farklı olduğunu belirtmek için "cell line" olarak adlandırılmıştır (Lodish ve ark., 1995).

5.2.3.1. A549 hücreleri

A549 birçok değişik çalışmada yaygın olarak kullanılan bir insan akciğer kanser cell line'dır. A549 cell line'ı 1972 yılında D.J. Giant ve ekibi tarafından 58 yaşında bir Caucasian erkekten alınan akciğer tümöründen üretilmiştir ve 1976 yılında, altmışsekizinci pasajı M.Lieber tarafından American Type Culture Collection'da stok edilmiştir. Japanese Cancer Research Resource Cell Bank (JCRB) ve Riken Cell Bank (RCB) ATCC'den hücreyi almış ve stoklamış daha sonra da birçok Japon araştırmacıya dağıtmıştır (Honma ve ark. 1996).

5.2.3.2. HFL1 hücreleri

Fibroblastın karakteristik morfolojik ve fonksiyonel özelliklere sahip farklılaşmış bir mezenşim hücresidir. Deri, akciğer ve gingava gibi yumuşak dokularda, hücre popülasyonunun % 40 ile % 60'ını fibroblastlar oluşturur (Breul ve ark. 1980).

İnsan akciğer fibroblast hücreleri (HFL1), erkek insan fetusunun akciğerlerinden türetilmiş bir fibroblast hücre ırkıdır. HFL1 normal bir karyotipe sahiptir, kontakt inhibisyon göstermektedir (Breul ve ark. 1980).

5.2.3.3. C2 ve CO25 hücreleri

CO25 miyoblast hücreleri, 1977 yılında Yaffe ve Saxel tarafından (Yaffe ve Saxel, 1977), fare bacak kasından izole edilip, kültürü yapılan C2 hücrelerinden elde edilmiştir. Daha sonra C2 hücreleri Gosset ve arkadaşları tarafından (Gosset ve ark. 1988), insan 61. kodonundan mutant N-ras onkogeni taşıyan bir plazmid ile transforme edilmiştir.

5.3. Transformasyon

Transformasyon doku kültüründe, normal hücreler kanser hücrelerine dönüşürken görülen değişiklikler için kullanılan bir terimdir. Transformasyon, türlere ve faktörlere bağlı olarak sıklığı değişen nadir bir olay olarak kendiliğinden meydana gelir. Bazı kemiricilerden örneğin farelerden alınan hücreler kültürde kendiliğinden transform hale gelirler oysa insan ve kuş hücrelerinin kendiliğinden transformasyonu nadiren meydana gelir. Fiziksel ajanlar, kimyasallar ve virüsler *in vitro* ortamda hücreleri transform hale getirirler. Transformasyonun kanserleşme öncesi safhalarında kromozom sayısı değişir (genellikle artar, yaklaşık olarak 2 katına çıkar). Serumdaki büyümeyi stimüle eden faktörlere bağımlılık kaybolur, tek hücreden klon şeklinde büyüme yeteneği artar yada hücre yoğunluğu azalır ve kültür ortamında uzamış yada sonsuz ömür kazanılır (Franks ve Teich, 1996).

6. POLİSİKLIK AROMATİK HİDROKARBONLAR

İnsanlar ya çevresel olarak yada meslekleri yüzünden sayısız kimyasal maddeye maruz kalırlar. Bu kimyasal maddelerin bir çoğu kansere yada genetik hastalıklara neden olmaları yüzünden sağlık için tehlikelidirler. Bu tehditler arasında hava kirliliği en büyük tehlikeyi oluşturanlardan biridir. Şehir havasını kirleten kirleticiler; karsinojenik faktörler ve hatta onların potansiyel etkileri ile etkileşime giren birçok organik ve inorganik maddenin karışımıdır. Bu bileşiklerin büyük bir kısmı hayvanlarda karsinojenik olduğu bilinen, insanlarda da karsinojenik olmasından şüphelenilen polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)'lardır. Yapılan birçok çalışmada hava kirleticilerine maruz kalan insan popülasyonlarında akciğer kanserine yakalanma oranının arttığı gösterilmiştir (Chitra ve ark.2001). Kok fırın emisyonları; kansere neden olan maddeleri içeren polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve onların türevlerini kapsayan kompleks bir karışım olduklarını göstermektedir (Topinka ve ark.1998).

Tütün dumanının içerdiği birçok madde arasında, yirmi karsinojenin deney hayvanlarında ve insanlarda akciğer kanserlerine neden olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, bu maddelerin akciğer kanserinin indüklenmesi olayına karışmaları da muhtemeldir. Bu yirmi karsinojen arasında polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve tütüne-özümlü nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon önemli roller oynaması olasıdır (Hecht, 1999).

Sigara içiminin akciğer kanserinin temel nedenlerinden biri olduğunu çalışmalar göstermiştir. Akciğer kanserine yakalanma riski sigara içimine son verildikten sonra azalır fakat ilk beş yıl için bu risk vardır. İlk Surgeon general raporu açıklandıktan sonra yetişkinlerde sigara içimi 1965'de %42'den 1990'da %25'e düşmüştür. Dünya genelinde bir milyar insan sigara içmektedir. Tütün dumanına maruz kalınmasının da akciğer kanserine neden olacağı geniş çapta kabul edilmektedir, bu risk sigara içenlere göre daha azdır (Hecht, 1999).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve onların türevleri gibi, solunabilen hava partiküllerine absorbe olmuş olan ve her yerde bulunan organik kirleticiler sınıfının bu gibi kompleks karışımlara düşük seviyede maruz kalınmasının insan sağlığı için bir risk olacağı düşünülmektedir. Bu organik bileşenler, çevremizde kimyasal ve foto-kimyasal reaksiyonların ürünleri olarak bilinen gazolin, diesel fuel, kömür ve yağın eksik yanma ürünleridir ve bu organik bileşenler mutajenik ve karsinojenik etkilere sahiptirler. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar tümör oluşumunu başlatıcı, teşvik edici ve geliştirici kimyasal kanserojenler olarak bilinmektedirler (Tannheimer ve ark. 1997). Kemiricilerle yapılan biyolojik deneylerde pekçok PAH'un birinin

bile karsinojenik olduğu görülmüştür ve PAH'un insanlarda da kanserojen olabileceğinden şüphelenilmektedir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar sitokrom P450 enzimlerinin metabolik aktivasyonu ile biyolojik etkilerini gösterirler (Binkova ve ark. 2000).

PAH'lar kişinin tumoricidal aktivitelerini etkiledikleri için zararlıdır. Tumoricidal mekanizmaların ortadan kaldırılması (baskılanması) transform hücrelerin metastatik büyümesini hızlandırır. Sadece karsinojenik görülen PAH'lar immün sistemi de baskırlar ve immün baskılama ile karsinogenez pozitif olarak bağlantılıdır (Peakall, 1992). PAH'ların karsinojenik etkilerini gösterebilmeleri için metabolik aktivasyonları gerekir. Metabolik aktivasyon işlemi, DNA'ya özellikle guanin ve adenine kovalent olarak bağlanan karsinojen metabolitlerle gerçekleşir (Hecht, 1999). Dipol epoksidleri reaktif hale getiren PAH metabolizması bu işlemi; DNA'da pürin bazlarının eksosiklik amino gruplarına bağlanarak gerçekleştirir (Melendez-Colon ve ark.2000).

7. KARVAKROL

Essansiyal yağlar, yüksek bitkilerde bulunan lipofilik, sıvı, uçucu ve genellikle terpenoid bileşiklerin karışımıdır. Essansiyal yağların içinde şimdiye kadar 3000'den fazla bileşik bildirilmiştir (Kohlert ve ark. 2000).

Monoterpenler, meyvaları, sebzeleri, baharatları ve otları içeren birçok bitkiden ekstrakte edilen esansiyal yağlarda bulunan bileşiklerdir. Bu bileşikler; ekstrakte edildikleri bitkinin aroma ve lezzetine katılırlar. Monoterpenler; asiklik, monosiklik ya da bisiklik C 10 bileşikleridirler ve monoterpen sentataz tarafından geranil fosfatı (GPP) substrat olarak kullanarak sentezlenirler. GPP; hayvanlarda, bitkilerde ve mayalarda hücre metabolizmasının iki önemli bileşiği olan, farnesil pirofosfat (FPP) ve geranil-geranil pirofosfat (GGPP) sentezinde bir öncüdür. Hayvan kanser modellerinin kullanıldığı deneysel çalışmalar; bazı monoterpenlerin farklı hücresel ve moleküler seviyelerde rol alan antikarsinojenik özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Bu buluşlardan açıkça görülüyor ki monoterpenler, etkili, toksik olmayan, antikarsinojenik ajanlar olarak değerlendirilebilirler, bu ajanlar yeni bir antikanser ilaç sınıfı olarak ümit vermektedirler (Loza-Tavera, 1999).

Kekik, hem baharat hem de ilaç olarak halk tarafından halen kullanılmakta olan ve dolayısıyla yaygın olarak bilinen bir bitkidir. Kekiğin en çok bilinen ve kullanılan türü *Origanum onites* L.'tir (Aydın, 1996). Kekiğin bileşimi; uçucu yağ (% 0.5-3.5), acı madde ve tanen içermektedir (Baytop, 1999). Son yıllarda yapılan bir çalışmada, *O.onites* uçucu yağı detaylı olarak ortaya konulmuş ve bileşenler bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada uçucu yağ içindeki bileşenler; karvakrol (% 65.91), linalool (% 14.84), timol (%3.64), p-simen (% 3.24) ve g-terpinen (% 2.08) oranlarında bulunmuşlardır (Aydın, 1996). Karvakrol (5-isopropyl-2-methylphenol) moleküler ağırlığı 150.220 olan bir bileşiktir (Guenther, 1975).

Bu çalışmada, *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

In vivo çalışmalarda gelişmekte olan ülkelerde ve yurdumuzda son yıllarda hızla artan akciğer kanserinde meydana gelen transformasyon belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, gelişmekte olan ülkelerde sanayileşmenin bir sonucu olarak soluduğumuz havaya karışan ve sigara dumanında da bulunan ve kanserojen bir madde olduğu bilinen polisiklik aromatik hidrokarbon olan 9,12-Dimetil-1,2-benzantrazen (DMBA) sıçanlarda akciğer kanseri oluşturmak için seçilmiştir. Akciğer kanseri oluşturulan sıçanlara daha sonra *Origanum onites* L. (kekik) ekstratı olan karvakrol uygulanarak akciğer hücrelerinde meydana gelen değişiklikler morfolojik ve histolojik olarak incelenmiştir.

Histolojik çalışmalara paralellik göstermesi için, in vitro ortamda akciğer hücreleri ile çalışma gerçekleştirmek istenmiştir. Bu amaçla, tip II hücrelerine model olarak kanserli akciğer hücreleri olan A549 hücre tipi seçilmiştir. Bu hücrelere karvakrol uygulanarak ortaya çıkan değişiklikler hücre seviyesinde belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca sağlam akciğer hücreleri de seçilerek karvakrolün bu hücreler üzerindeki etkileri belirlenmek istenmiştir. Karvakrolün bu iki hücre tipinde; hücre morfolojisi, hücre iskeleti ve toplam protein miktarları üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Hücrelerde transformasyon meydana getirdiği bilinen steroid bir hormon olan dexamethasone CO25 hücrelerine uygulanarak transformasyon gelişiminde hücre morfolojisinde meydana gelen değişiklikler araştırmaya çalışılmıştır. CO25 hücrelerinin kontrolü olarak C2 hücreleri kullanılmış ve bu hücreler 4 gün boyunca gözlenmişlerdir.

8. MATERİYAL VE YÖNTEM

8.1. *In Vivo* Çalışmalarda Kullanılan Materyaller

8.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

9, 10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene (Sigma), Susam yağı, Saf zeytinyağı, Nötral formalin (Merck), Karvakrol, Eter (Merck), Etil Alkol serileri (Tekel), Ksilol, Entellan (Sigma), Hematoksilin (Sigma), Eosin (Merck), Formaldehit (Merck), Katı parafin.

8.1.2. Kullanılan malzemeler

Çeşitli cerrahi malzemeler, enjektörler (1ml hacminde), çeşitli cam malzemeler, mikrotom, manyetik karıştırıcı, boyama kapları (cam, plastik ve metal), lam ve lameller, etüv, buzdolabı.

8.1.3. Deney hayvanları

Bu çalışmada *Sprague-Dawley* sıçanlar kullanılmıştır. Deney hayvanları iyi havalandırılmış odalarda, normal gece-gündüz siklusunda ve ortalama 18-21°C oda sıcaklığında tutulmuş, çeşme suyu ve standart yem (Yem Fabrikaları, Eskişehir) ile beslenmişlerdir.

8.1.4. Deney hayvanlarına uygulanan karvakrolün hazırlanması

Karvakrol saf zeytinyağı içinde 1:9 oranında çözölmüştür (Zeytinoğlu ve ark. 1998).

8.2. *In Vitro* Çalışmalarda Kullanılan Materyaller

8.2.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Nutrient Mixture F-12 (HAM, Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma), Fetal Bovine Serum (Sigma), Horse Serum (Sigma), Penicillin-Streptomycin (Sigma), Puck's Saline A (Sigma), Trypsin-EDTA Solution (10X) (Sigma), Sodyum bikarbonat (Merck), Aprotinin (Sigma), Deksametazon (Sigma),

Protein Marker (Sigma), TEMED (Sigma), Acrylamide/Bis-Acrylamide %30 Solution (Sigma), Phenylmethylsulfonyl Fluoride (Sigma), Dimethyl Sulfoxide (Merck), Brilliant Blue R Concentrate (Sigma), Bromphenol Blue (Sigma), Bradford Reagent (Sigma), Coomassie Blue (Sigma), Glasiyal Asetik Asit (Merck), Metanol (Merck), Sodyum Dodesil Sulfat (Sigma), DTT (Sigma), Tris-Klorür (Sigma), Monoklonal Anti-Actin FITC Conjugate Clone AC-40 (Sigma), Gliserol (Sigma), Glisine (Sigma), Monoklonal Anti- α Tubulin Conjugate Clone DM 1A (Sigma), Triton X-100 (Sigma), Metanol , DAPI (Sigma), Alcian Blue (Merck), Safranin (Merck), May Grünwald Solution (Fluka), Gimsa (Sigma), NaHCO₃ (Merck), NaCl (Merck), NaOH (Merck), Sıvı Azot,

8.2.2. Kullanılan malzemeler

Çeşitli cam malzemeler, enjektörler (1,10 ve 20 ml hacminde), steril filtreler, su banyosu, soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav, derin dondurucu, buzdolabı, CO₂ karbondioksit inkübatörü (Heraus), steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, hamilton şırınga, kar-buz makinası, güç kaynağı, elektroforez aygıtı,

8.2.3. Hücre kültüründe kullanılan hücreler

8.2.3.1. A549 hücreleri

In vivo ortamda sürdürülen çalışmalara paralellik göstermesi amacıyla, akciğer kanserli hücre olarak A549 hücreleri seçilmiştir. A549 hücrelerinin bir diğer seçilme nedeni de akciğer kanserlerinin % 75-80'ini kapsayan küçük hücreli olmayan akciğer kanser tipi olmasıdır (Penno ve ark. 1994). A549 insan akciğer epitel benzeri kanser hücreleri, Institute for Fermentation, Osaka (IFO; Japonya)'dan satın alınmıştır.

8.2.3.2. HFL1 hücreleri

Sıçanlarla yapılan çalışmalara paralellik sağlaması amacıyla, HFL1 insan akciğer fibroblast benzeri hücreleri, Institute for Fermentation, Osaka (IFO; Japonya)'dan satın alınmıştır.

8.2.3.3. C2 hücreleri

C2 miyoblast cell line hücreleri, East Anglia Üniversitesi (İngiltere), Biyolojik Bilimler Okulu, Moleküler Biyoloji Bölümünden sağlanmıştır.

8.2.3.4. CO25 hücreleri

CO25 miyoblast cell line hücreleri, East Anglia Üniversitesi (İngiltere), Biyolojik Bilimler Okulu, Moleküler Biyoloji Bölümünden sağlanmıştır.

8.2.4. Karvakrol dozlarının hazırlanması

Karvakrol dimetil sülfoksit (DMSO; Merck) içinde çözülerek 1000 mM, 500 mM, 250 mM, 100 mM'lık dozlar hazırlanmıştır (Pearson ve ark. 1997). Karvakrol DMSO içinde çözüldüğü için, negatif kontrol olarak, çözücü madde olan DMSO kullanılmıştır (IARC/NCI/EPA working group, 1985). Karvakrolün hazırlanan dozları (+4°C)'de saklanmıştır.

8.2.5. Dexamethasone'nun hazırlanması

Dexamethasone (Sigma) steril bidistile su içinde çözülerek hazırlanmış , daha sonra 1'er ml'lik eppendorf tüplerine aktarılmış ve kullanılacağı zamana kadar (-20°C)'de saklanmıştır (Zeytinoğlu, 1992).

8.2.6. Kullanılan araç ve gereçlerin hazırlanması

Çalışma süresince kullanılacak cam ve metal malzemeler alüminyum folyolara sarılı biçimde sterilizatörde 180°C'de iki saat, sıvı solüsyonlar ise 121°C, 1.5 atm/Hg'de 20 dakika steril edilmiştir. Kullanılan tüm sıvı kimyasallar 0.22 µm aralıklı selüloz nitrat filtreden geçirilerek steril edilmiştir (Jakoby ve Pastan, 1979).

8.3. Yöntem

8.3.1. *In vivo* çalışmalar

8.3.1.1. Sıçanlarda akciğer kanserinin oluşturulması

Ratlarda kanserleşmeyi başlatmak amacıyla, karsinojen olarak bir polisiklik aromatik hidrokarbon olan 9,10-Dimetil-1,2-Benzantrazen (DMBA) kullanılmıştır (Saran ve ark. 1996; Sumimoto ve ark. 1999). 9,10-Dimetil-1,2-Benzantrazen susam yağına çözülmiştir (Takahashi ve ark. 2000). DMBA'nın 2 mg'lık solüsyonu 0.5 ml susamyağı içinde çözülerek tek doz şeklinde rat sırtına subkutan olarak tüberkülün enjektörü ile enjekte edilmiştir (Şimşek, 1982).

Üç haftalık, bir aylık ve beş aylık 3 ayrı deney grubu kullanılmıştır. Bir deney grubu üç adet hayvandan oluşturulmuştur. Bir grubu oluşturan hayvanlar; sağlam sıçanlar, DMBA enjekte edilerek akciğer kanserli hale getirilen sıçanlar ve DMBA uygulamasının ardından karvakrol uygulanan sıçanlardır.

8.3.1.2. Sıçanlara karvakrol uygulaması

DMBA verilerek akciğer kanserli hale getirilen ikinci ve üçüncü gruptaki sıçanlara, bir ay sonra karvakrol uygulanmıştır. Karvakrol zeytinyağı içinde 1:9 oranında çözülerek (0.1 mg.kg^{-1}) olacak şekilde sıçanlara sekiz gün süresince dört kez intraperitoneal olarak tüberkülün enjektörü ile enjekte edilmiştir (Zeytinoğlu ve ark., 1998).

8.3.1.3. Akciğer dokularının morfolojik incelenmesi

Birinci ve ikinci gruptaki hayvanlar karvakrol uygulamasının bitiminin ardından disekte edilmişlerdir. Üçüncü gruba ait hayvanlar ise karvakrol uygulamasının bitiminden dört ay sonra disekte edilmişlerdir. Sıçanlar eterle bayıltıldıktan sonra disekte edilmiş ve akciğerleri çıkarılmıştır. Akciğerlerin morfolojik görünümünün fotoğrafları diseksiyon-stereo fotomikroskop ile çekilmiştir.

8.3.1.4. Akciğer dokularının histolojik incelenmesi

Akciğerler morfolojik olarak incelendikten sonra küçük parçalara ayrılarak % 10'luk nötral formalinde otuz saat tespit edilmişler ve ardından onbeş saat akan suyun altında tutulmuşlardır. Bu işlemin sonrasında akciğer parçaları artan alkol serilerinden (% 70-100) geçirilerek parafin blok haline getirilmişlerdir. Hazırlanan parafin bloklardan 5 µm kalınlığında preparatlar hazırlanmıştır (Swamidas ve ark., 1999). Bu preparatlar Hematoksilin-Eosin boyama yöntemine göre boyanarak araştırma mikroskobunda incelenmişlerdir.

8.3.1.5. Histolojik boyama yöntemi

Preparatlar bir saat 80°C'deki etüvde tutulmuşlardır. Bu işlemin ardından preparatlar,

- Yıkama ksilolü I: 3 dakika
 - Yıkama ksilolü II: 2 dakika
 - Yıkama ksilolü III: 1 dakika
 - Yıkama alkolü I (% 96'lık): 2 dakika
 - Yıkama alkolü II (% 96'lık): 1.5 dakika
 - Yıkama alkolü III (% 96'lık): 1 dakika
 - Akarsu: 3 dakika
 - Hematoksilin: 3 dakika
 - Akarsu: 2 dakika
 - Eosin: 2 dakika
 - Akarsu: 2 dakika
 - Alkol I (% 96'lık): 2 dakika
 - Alkol II (% 96'lık): 1.5 dakika
 - Alkol III (% 96'lık): 1 dakika
 - Kurutma: 1 dakika
 - Ksilol I: 2 dakika
 - Ksilol II: 2 dakika
 - Ksilol III: 4 dakika
- tutularak entellan ile kapatılarak mikroskobik incelemeye alınmışlardır.

8.3.2. *In vitro* çalışmalar

8.3.2.1. A549 hücre kültürü

A549 hücreleri %10'luk Fetal Bovine Serum, Nutrient Mixture F-12 (HAM) (Huober ve ark., 2000) içeren besiyerlerinin bulunduğu, 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmiştir.

8.3.2.2. HFL1 hücre kültürü

HFL1 hücreleri %15'lik Fetal Bovine Serum, Nutrient Mixture F-12 (HAM) içeren besiyerlerinin bulunduğu, 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmişlerdir.

8.3.2.3. C2 hücre kültürü

C2 miyoblast hücreleri, normal büyüme ortamları olan %10'luk Fetal Bovine Serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin ve %9.2 NaHCO₃ içeren besiyeri içinde, 25 cm²'lik flasklarda %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmişlerdir (Freshney, 1994; Pollard ve Walker, 1990).

8.3.2.4. CO25 hücre kültürü

CO25 miyoblast hücreleri ilk olarak, normal büyüme ortamları olan %10'luk Fetal Bovine Serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin ve %9.2 NaHCO₃ içeren besiyeri içinde, %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe (Heraus) kültüre edilmişlerdir. Hücreler bulundukları flasklarda %80 yoğunluğa ulaştıklarında, transformasyonu gözlemleyebilmek amacı ile, bu hücrelerdeki insan mutant N-ras onkogenini indüklemek için, %10 Horse serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin, %9.2 NaHCO₃ ve 1µM/ml Deksmetasone (200 mM) içeren besiyeri ortamına alınmışlardır. Hücrelerin bu ortamdaki transformasyonu dört gün boyunca gözlemlenmiştir.

8.3.3. Hücrelerin morfolojileri üzerine yapılan çalışmalar

8.3.3.1. A549 hücreleri ile yapılan çalışmalar

İlk olarak A549 hücreleri normal büyüme ortamlarında 4 gün boyunca gözlenmişlerdir. Flasklara hergün taze besiyeri konulmuştur. Hücreler May-Grünwald: Gimsa boyama tekniğine göre boyanarak hergün incelenmişlerdir.

8.3.3.2. HFL1 hücreleri ile yapılan çalışmalar

HFL1 hücrelerine de A549 hücrelerine uygulanan yöntemin aynısı uygulanmıştır.

8.3.3.3. C2 hücreleri ile yapılan çalışmalar

C2 hücreleri normal büyüme ortamlarında yeterli sayıya ulaştıktan sonra transformasyon meydana gelip gelmeyeceğini gözlemleyebilmek için besiyerleri %10 Horse serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin ve %9.2 NaHCO₃ içeren besiyeri ile değiştirilerek 4 gün boyunca gözlenmişlerdir. Flasklara hergün taze besiyeri konulmuştur. Hücreler klasik May-Grünwald: Gimsa boyama tekniğine göre boyanarak hergün incelenmişlerdir.

8.3.3.4. CO25 hücreleri ile yapılan çalışmalar

CO25 hücreleri normal büyüme ortamlarında yeterli sayıya ulaştıktan sonra transformasyonu gözlemleyebilmek için besiyerleri %10 Horse serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin, % 9.2 NaHCO₃ ve 1µM/ml Deksamethasone (200 mM) içeren besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler klasik May-Grünwald: Gimsa boyama tekniğine göre boyanarak 4 gün süresince hergün incelenmişlerdir.

8.3.3.5. Hücrelerin May-Grünwald: Gimsa ile boyanması

Hücrelerin içerisinde bulunduğu flask içindeki besiyeri tamamen alınarak, hücreler steril 1X'lik steril fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 15 mM KH₂PO₄, 8 mM Na₂HPO₄; pH 7.3) ile iyice yıkanmışlardır.

Daha sonra hücreler % 100'lük soğuk Metanol ile 1 dakika muamele edilerek tespit edilmişlerdir. Kültür hücreleri May-Grünwald (Sigma) ile 2 dakika muamele edilmiş, sonra boyanın yarısı alınmış, geri kalan boya miktarına eşit oranda distile su eklenerek 1 dakika daha boyama işlemi sürdürülmüştür. Daha sonra flask içerisindeki tüm boya alınarak, hücreler distile su ile yıkanmış ve üzerlerine % 50 sulandırılmış Gimsa konularak 5 dakika boyanmışlardır. Boyama işlemi sonrasında distile su ile 3 kez yıkanarak mikroskopta incelenmişlerdir. Morfolojik farklılıkların analizi için Tolis ve ark. (1999) tarafından May-Grünwald: Gimsa boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada May-Grünwald: Gimsa boyama yöntemi, kültür hücrelerinin uygun boyanması için modifiye edilerek kullanılmıştır (Clark, 1981).

8.3.4. Hücre sayımları

8.3.4.1. A549 hücrelerinin hücre sayımları

Aynı pasaj numarasına sahip hücreler her flaska yaklaşık bir milyon hücre olacak şekilde aktararak 1000 mM, 500 mM, 250 mM ve 100 mM'lık Karvakrol 24 saat uygulanmıştır. DMSO'nun final konsantrasyonu tüm inkübasyon hacminin % 0.1'ini aşmamıştır. Negatif kontrol gruplarının herbirine sadece DMSO uygulanmıştır. Kontrol, negatif kontrol, 1000 mM, 500 mM, 250 mM ve 100 mM'lık inkübasyon setleri üç kez iki örnek ile tekrarlanmıştır. 24 saat sonunda flasklardaki besiyerleri uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 1 ml (2X) Tripsin uygulanarak hücreler birbirlerinden ve flask tabanından ayrılarak kaldırılmışlardır. A549 hücreleri Thoma lamı ile sayılmışlardır. Sayımlar 3 kez tekrarlanmıştır.

8.3.4.2. HFL1 hücrelerinin hücre sayımları

Her flaska yaklaşık 250.000 hücre olacak şekilde aktararak 1000 mM, 500 mM, 250 mM ve 100 mM'lık Karvakrol 24 saat uygulanmıştır. DMSO'nun final konsantrasyonu tüm inkübasyon hacminin % 0.1'ini aşmamıştır.

8.3.5. Karvakrolün hücreler üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan çalışmalar

8.3.5.1. A549 hücrelerine karvakrolün etkisi

Daha sonra aynı pasaj numarasına sahip hücreler bulundukları flasksı kapladıklarında, besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler tripsinlenerek yeni flasksı aktarılmışlardır. 1000 mM, 500 mM, 250 mM ve 100 mM Karvakrol flasksı hücrelerin ekildiği an ilave edilmiştir (Umino ve ark., 2000). Çeşitli karvakrol dozları 24 saat uygulanmıştır . DMSO'nun final konsantrasyonu tüm inkübasyon hacminin % 0.1'ini aşmamıştır (Binkova ve ark.2000). Negatif kontrol gruplarının herbirine sadece DMSO uygulanmıştır. Kontrol, negatif kontrol, 1000 mM, 500 mM, 250 mM ve 100 mM'lık inkübasyon setleri üç kez iki örnekle tekrarlanmıştır. 24 saat sonunda flasksıdaki besiyerleri uzaklaştırılmış ve hücreler May-Grünwald: Gimsa boyama tekniğine göre boyanarak incelenmişlerdir.

8.3.5.2. HFL1 hücrelerine karvakrolün etkisi

HFL1 hücrelerine de A549 hücrelerine uygulanan yöntemin aynısı uygulanmıştır.

8.3.6. Immünofluoresan çalışmalar

25 cm²'lik flasksılda büyütilen A549 ve HFL1 hücreleri; 1 ml (2X) tripsin ile flask tabanından kaldırıldıktan sonra, içlerinde steril 4 adet yuvarlak lamel bulunan plastik petrilere aktarılmış ve üzerlerine taze besiyeri konulmuş ve karvakrol dozları ilave edilerek 24 saat %95 hava ve %5 CO₂'li gaz ortamında ve 37°C'deki CO₂ inkübatöründe inkübe edilmişlerdir. Her hücre grubu için kontrol, negatif kontrol, 500 mM, 250 mM ve 100 mM'lık deney setleri kullanılmıştır. 24 saat sonunda besiyerleri petrilere uzaklaştırılmıştır. Yuvarlak lameller üzerine yapışmış bulunan hücreler 1X'lik steril fosfat tampon tuz çözeltisi (PBS) ile 1 dakika yıkanmışlar ve (-20°C)'deki metanol ile 10 dakika muamele edilerek tespit edilmişlerdir. Tespit işleminden sonra PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanmışlardır. Yıkama işleminin sonrasında % 0.5 Triton X-100 (Sigma) ile 3 dakika muamele edilmişlerdir (Song ve ark. 2000). Daha sonra lamellerin üzerindeki hücrelere ; Monoklonal Anti-Actin FITC Conjugate Clone AC-40 (Sigma), Monoklonal Anti- α Tubulin Conjugate Clone DM 1A (Sigma), 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ve Alcian blue-

Safranin uygulanmış ve nemli bir kutu içinde 37°C'deki bir inkübatörde 2.5 saat inkübe edilmişlerdir. Inkübasyon sonunda lameller 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanmış ardından kapatılarak floresan mikroskobunda incelenmişlerdir.

8.3.7. Toplam protein analizleri

8.3.7.1. A549 ve HFL1 hücrelerinin toplam protein ekstraksiyonları

A549 ve HFL1 hücreleri, protein analizlerinin yapılabilmesi için 5 gruba ayrılmışlardır. Bu gruplar; kontrol ve negatif kontrol grupları ile 500 mM, 250 mM ve 100 mM'lık deney gruplarıdır. A549 ve HFL1 hücreleri ile yapılan deneylerde, 1000 mM'lık gruptlarda hücrelerin % 90'ı öldüğü için bu grubun toplam protein analizleri her iki hücre grubunda da yapılmamıştır.

Hücrelerin 25 cm²'lik flask tabanında yeterli sayıda gelişmeleri sağlandıktan sonra, eski besiyeri alınmış, taze besiyeri konulmuş ve karvakrol dozları 24 saat süre ile uygulanmıştır. 24 saatlik sürenin sonunda toplam protein ekstraksiyonu Sambrook'a göre yapılmıştır (Sambrook ve ark. 1998). Hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri flasklardan uzaklaştırılmıştır. Flask tabanına yapışık şekilde bulunan hücreler soğuk PBS ile yıkandıktan sonra lizis solüsyonu (50 mM Tris-HCl , 150 mM NaCl, % 0.02 sodyum azid, % 1 NP-40, 100 µg/ml fenilmetilsulfonilflorid (PMSF) , 1 µg/ml aprotinin) ilave edilerek buz üzerinde, her 5 dakikada bir çalkalanarak 20 dakika bekletilmiştir. Daha sonra lizis edilmiştir hücreler, hücre sıyrıcı yardımı ile flasklardan sıyrılmış, mikropipet yardımı ile mikrosantrifüj tüplerine aktarılmış ve 13000 g'de (+4°C)'de 10 dakika soğutmalı santrifüjde (Heraus) santrifüj edilmişlerdir. Santrifüj işlemi sonrasında mikrosantrifüj tüplerindeki süpernatant kısım alınarak analiz için (-20°C)'de saklanmıştır. Bradford yöntemine göre protein konsantrasyonu spektrofotometre (Schimadzu) ile tespit edilmiştir (Bradford, 1976).

8.3.7.2. A549 ve HFL1 hücrelerinin jel elektroforezleri (SDS-PAGE)

A549 ve HFL1 hücrelerinin kontrol ve negatif kontrol grupları ile 500 mM, 250 mM ve 100 mM'lık deney gruplarına ait örneklerin, Zeytinoğlu ve ark. (1995)'de anlatılan metod ile elektroforez işlemleri yapılmıştır. Buna göre her örnek için, 60'ar µg protein, 10 µl 2X jel yükleme tamponu (% 4 SDS, % 20 Gliserol, 100 mM Tris-Cl (pH 6.8), 200 mM DTT, % 0.2 Bromfenol blue) ile karıştırıldıktan sonra 100°C'de 4-5 dakika denatüre edilmiş ve % 12'lik bir SDS-poliakrilamid

mini jelde yürütülmüştür. Moleküler ağırlık standardı (Sigma) aynı jelde örneklerin hazırlandığı şekilde hazırlanarak ayrı bir sütunda yürütülmüştür. Elektroforez, önce toplayıcı jel için 80 V sonra ayırıcı jel için 120 V elektrik akımı uygulanarak Tris-Glisin elektroforez tamponu (0.25 M Tris, 1.92 M glisin) içinde gerçekleştirilmiştir.

A549 ve HFL1 hücrelerine ait jeller daha sonra Coomassie Blue boyası içinde boyanmış ve Destain (% 20 metanol, % 13.3 glasiyal asetik asit) ile yıkanmış ve Jel Depo Solüsyonunda (% 7) saklanmış ve daha sonra incelenerek fotoğrafları çekilmiştir (Dunber, 1994).

8.4. Mikroskopi

A549, HFL1, C2 ve CO25 hücreleri Olympus CK2 inverted mikroskobuyla incelenmiştir. Kültür hücreleri boyandıktan sonra Olympus BX50 araştırma mikroskobu altında ve değişik büyütmelerde incelenmişlerdir. A549 ve HFL1 hücrelerinin immünohistokimyasal yapıları Olympus U-UHK floresans mikroskobuyla incelenmiştir.

Sıçanlardan çıkarılan akciğer dokuları Wild M3Z diseksiyon-stereo mikroskop altında ve değişik büyütmelerde morfolojik olarak incelenmişlerdir.

Akciğerlerinden hazırlanan preparatlar Olympus BX50 araştırma mikroskobu altında ve değişik büyütmelerde incelenmişlerdir.

8.5. Fotoğrafi

Kültür hücrelerinin mikroskop altında saptanan uygun görüntüleri, akciğer dokularının morfolojik görüntüleri, akciğer dokularının histolojik preparatlarının görüntüleri, Olympus PM-30 otomatik fotomikrografi aracı kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir.

9. BULGULAR

9.1. *In Vivo* Çalışmalar

9.1.1. Akciğer dokularının morfolojisi

Sağlam bir sıçan disekte edilerek akciğerleri çıkarıldığında, akciğerlerinin temiz görünümlü ve açık pembe renkli olduğu görülmüştür (Şekil 9.1).

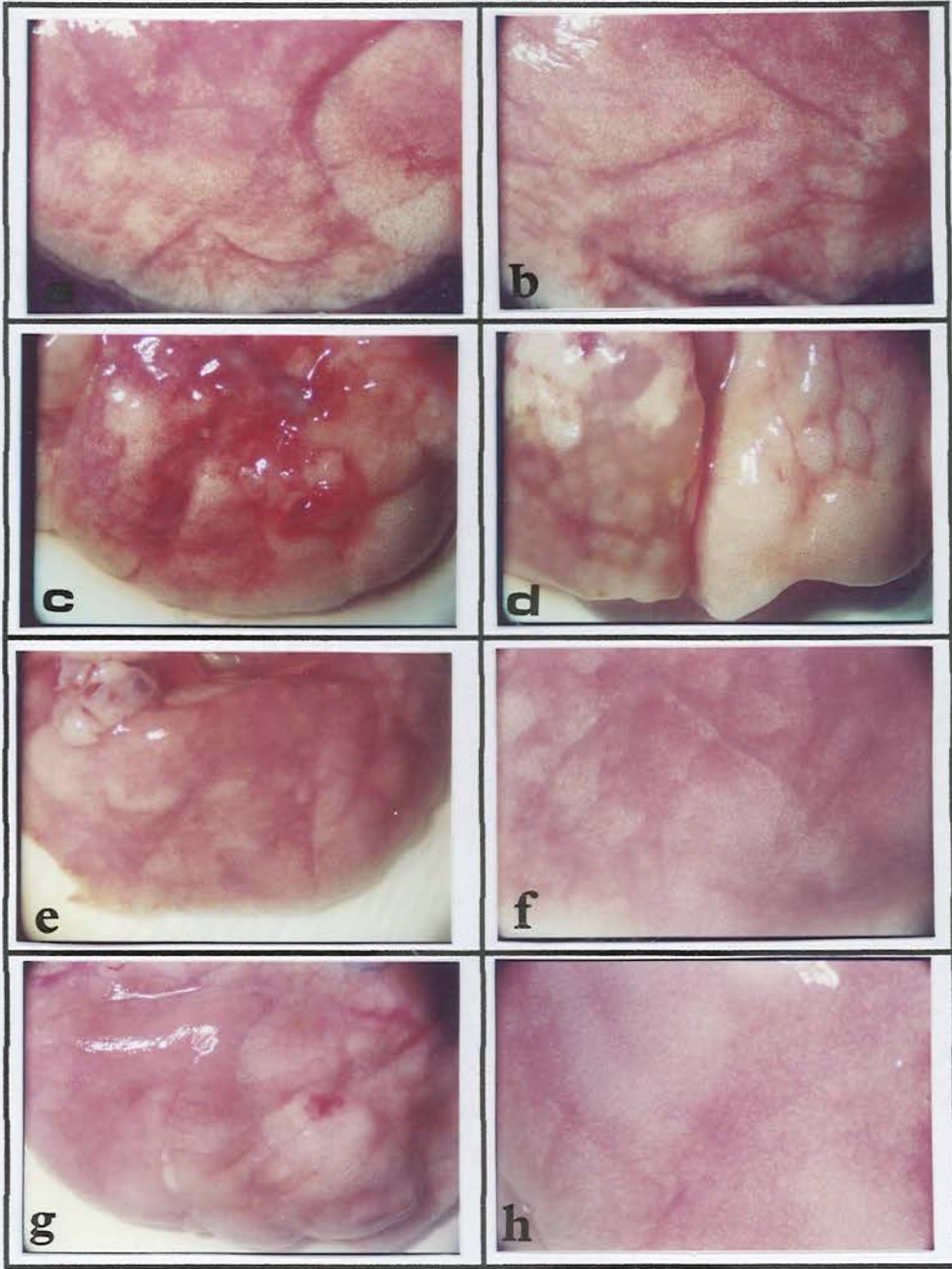
9,10-Dimetil-1,2-benzantrasen (DMBA) verildikten üç hafta sonra disekte edilen sıçanların akciğerleri incelendiğinde, sıçanlarda akciğer kanserinin meydana geldiği görülmüştür. Kanserli akciğerler ile sağlam bir sıçanın akciğerleri karşılaştırıldığında, DMBA verilen sıçanın akciğerlerinin hacimce küçülmüş olduğu, kirli, koyu kırmızı bir renk aldığı ve akciğer dokularında bozulmalar olduğu tespit edilmiştir (Şekil 9.1).

DMBA verildikten bir ay sonra sekiz gün süresince dört kez karvakrol uygulanan sıçanlar, karvakrol uygulamasının hemen ardından disekte edildiklerinde, akciğerlerinin hacimce küçülmüş olduğu fakat renklerinde sadece DMBA verilen sıçanların akciğerine oranla kenarlardan hafif renk açılmalarının olduğu saptanmıştır.

DMBA verildikten bir ay sonra sekiz gün süresince dört kez karvakrol uygulanan sıçanlar, karvakrol uygulamasının bitiminden dört ay sonra disekte edilerek akciğerleri çıkarılmıştır. Bu akciğerlerin sadece DMBA verilen akciğerlerle karşılaştırıldıklarında renklerinin, kenarlardan merkeze doğru açıldığı tespit edilmiştir.

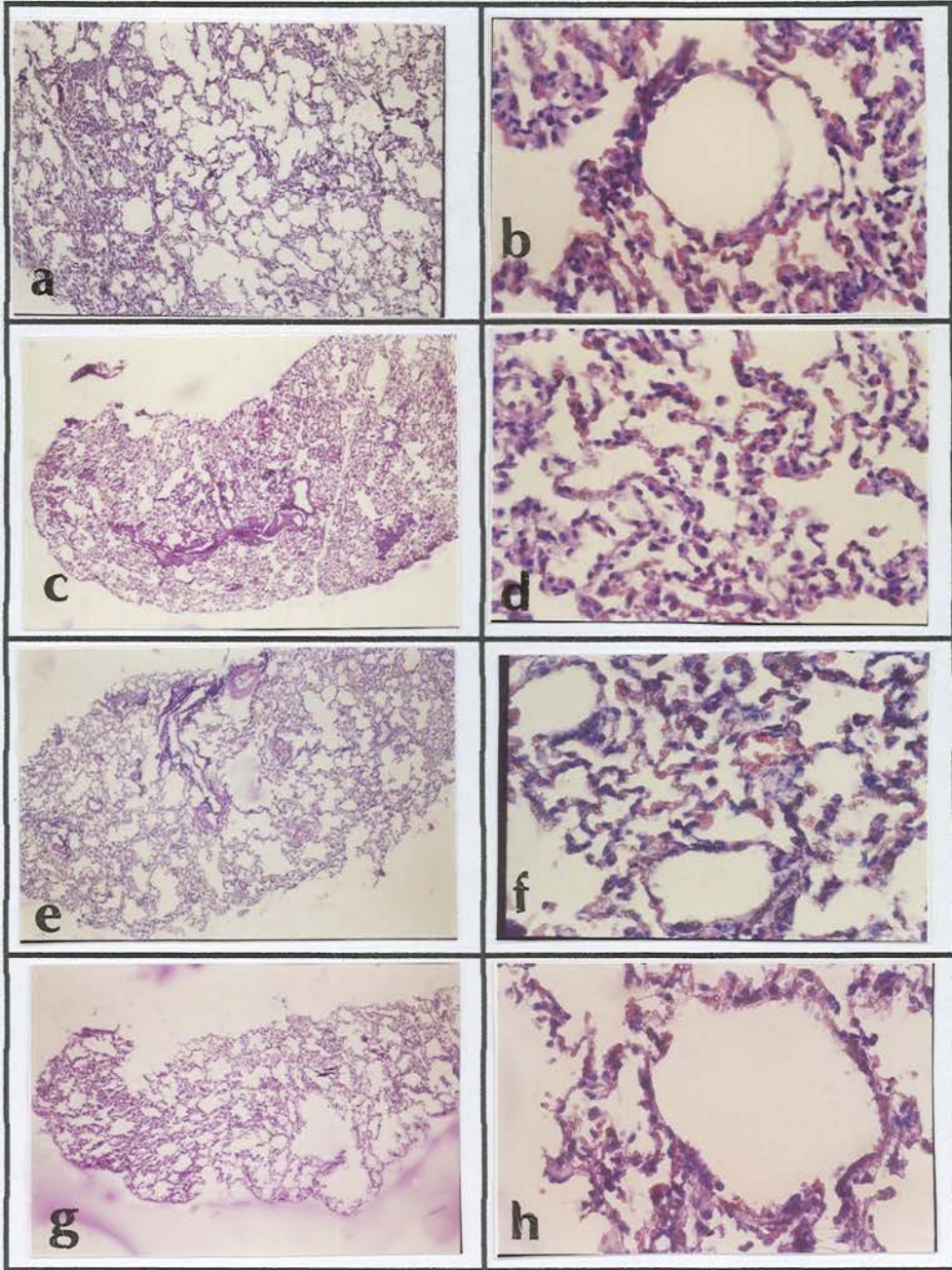
9.1.2. Akciğer dokularının histolojisi

Hematoksilin-Eosin boyama yöntemi uygulanarak boyanan sağlam sıçan akciğerlerinin histolojik preparatlarında alveollerin normal yapısı görülmüştür. Bu yapıda tip I hücrelerinin (yassı alveoler hücreler) sayıca daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Tip I hücrelerinin sitoplazmaları geniş bir yüzey alanına yayıldığı için nükleuslarına sayıca az rastlanmaktadır. Tip II hücrelerinin (büyük alveoler hücreler) ise normal bir akciğerin alveol yapısında çok az sayıda olduğu saptanmıştır. Bu hücrelerin büyük yuvarlak hücreler olduğu saptanmıştır. Tip II hücrelerinin genellikle alveollerin birleştikleri açılarda iki veya üç hücreden oluşan gruplar biçiminde bulundukları gözlenmiştir (Şekil 9.2).



Şekil 9.1. Akciğer dokularının morfolojik görüntüleri. a ve b) Sağlam sıçan akciğerinin morfolojik görüntüsü, c ve d) DMBA verilen sıçan akciğerinin 3 hafta sonraki görüntüsü. e ve f) DMBA verildikten 1 ay sonra karvakrol verilen ve hemen disekte edilen sıçan akciğerinin görüntüsü, g ve h) DMBA verildikten 1 ay sonra karvakrol verilen ve 4 ay sonra disekte edilen sıçan akciğerinin görüntüsü

DMBA verilerek akciğer kanserli hale getirilen sıçan akciğerlerinin Hematoksilin-Eosin boyama yöntemine göre boyanan histolojik preparatlarında alveoler yapının bozulduğu görülmüştür. Sağlam akciğer alveollerine göre alveol yapısının büzüldüğü gözlenmiştir. Tip I hücrelerde bozulmaların meydana geldiği



Şekil 9.2. Akciğer dokularının Hematoksilin Eosin boyama yöntemine göre boyanan histolojik görüntüleri. a ve b) Sağlam sıçan akciğerinin histolojik görüntüsü, c ve d) DMBA verilen sıçan akciğerinin 3 hafta sonraki görüntüsü. e ve f) DMBA verildikten 1 ay sonra karvakrol verilen ve hemen disekte edilen sıçan akciğerinin görüntüsü, g ve h) DMBA verildikten 1 ay sonra karvakrol verilen ve 4 ay sonra disekte edilen sıçan akciğerinin görüntüsü

ve sayılarında büyük oranda azalma olduğu tespit edilmiştir. Tip II hücrelerin sayısının ise artmış olduğu saptanmıştır (Şekil 9.2).

DMBA verilerek kanserli hale getirildikten bir ay sonra karvakrol uygulanan ve ardından disekte edilen sıçan akciğerlerinin Hematoksilin-Eosin boyama

yöntemine göre boyanan preparatlarında alveoler yapılarının, DMBA verilerek kanserli hale getirilen sıçan akciğerlerinin alveollerine göre açıldığı tespit edilmiştir. Tip I hücreleri sadece DMBA verilen akciğerlerin alveollerinde neredeyse görülmezken, bu deney grubundaki sıçanların akciğerlerindeki alveollerde görülmeye başlanmıştır. Tip II hücrelerinin sayısında ise azalma olduğu gözlenmiştir (Şekil 9.2).

DMBA verilerek kanserli hale getirildikten bir ay sonra karvakrol uygulanan ve karvakrol uygulamasının bitiminden dört ay sonra disekte edilen sıçan akciğerlerinin Hematoksilin-Eosin boyama yöntemine göre boyanarak hazırlanan preparatlarında alveoler yapının, DMBA verilerek kanserli hale getirilen akciğerlerin alveoler yapısına göre genişlediği tespit edilmiştir. Tip I hücrelerinin sayısının arttığı fakat tip II hücrelerinin sayısının ise çok azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 9.2).

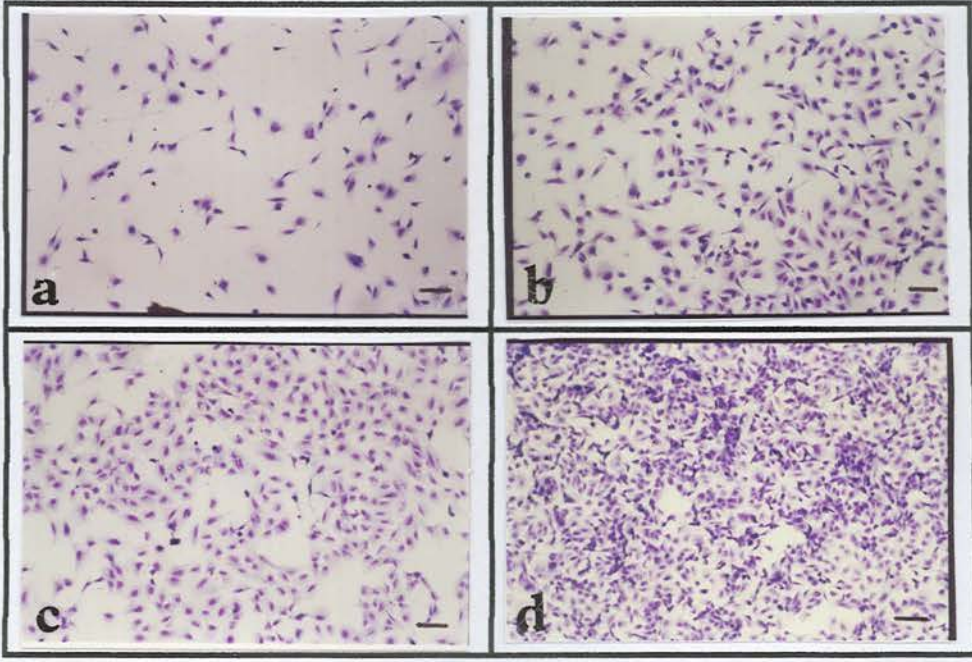
9.2. *In Vitro* Çalışmalar

9.2.1. Hücre morfolojilerinin incelenmesi

9.2.1.1. A549 hücrelerinin morfolojik incelenmesi

A549 cell line hücreleri %10'luk Fetal Bovine Serum, Nutrient Mixture F-12 (HAM) içeren besiyerlerinde büyütülmüşler ve May-Grünwald: Gimsa boyama yöntemine göre boyanarak ışık mikroskobunda incelenmişlerdir.

Flaskalara ekildikten 1 gün sonra incelenen A549 cell line hücrelerinin tek tabakalı olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerin genelde poligonal ve iğsi şekilli oldukları, mitoz geçiren hücrelerin ise yuvarlak biçimli oldukları gözlenmiştir. Hücrelerin çoğunluğunun tek çekirdekli olduğu bazılarının ise iki çekirdekli olduğu saptanmıştır. Çekirdek şeklinin oval olduğu gözlenmiştir. Çekirdeklerin, iğsi biçimli hücrelerde hücrenin merkezinde yer aldığı, poligonal biçimli hücrelerde ise hücrenin bir kenarına itilmiş biçimde yerleştikleri belirlenmiştir. Çekirdekçiklerin görülmediği fakat kromatin taneciklerinin homojen biçimde dağıldığı tespit edilmiştir. İğsi şekilli hücrelerin, hücrenin her iki kutbunda dallanmayan kısa uzantılara sahip oldukları görülmüştür. Hücre sınırlarının çoğunlukla düz olduğu saptanmıştır. May-Grünwald: Gimsa boyama tekniği uygulanarak boyanan hücrelerin çekirdeklerinin pembe, çekirdek içindeki kromatin taneciklerinin siyah renkte boyandığı belirlenmiştir. Çekirdek çevresindeki sitoplazmanın yoğun olduğu, perifere doğru gidildikçe sitoplazma yoğunluğunun azaldığı gözlenmiştir. 2 ve 3 günlük A549 cell line hücrelerinin sayıca arttıkları fakat tek tabakalı oldukları



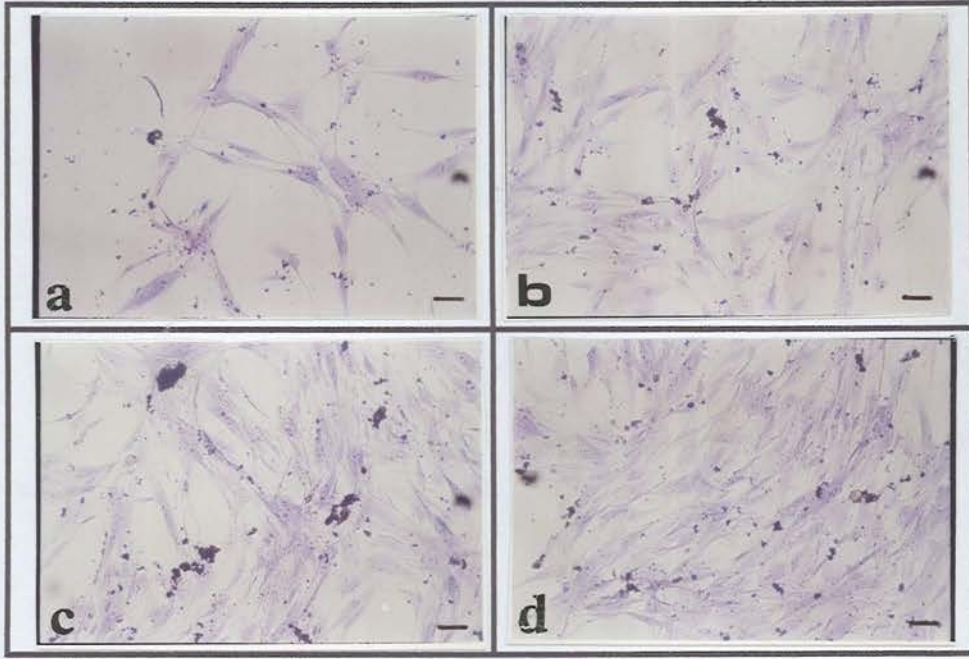
Şekil 9.3. A549 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile 4 günlük görüntüleri. a) 1 Günlük A549 cell line hücreleri, b) 2 Günlük A549 cell line, hücreleri, c) 3 Günlük A549 cell line hücreleri, d) 4 Günlük A549 cell line hücreleri. Ölçü birimi 125 μ m

morfolojik özelliklerinin ise 1 günlük hücrelerle aynı olduğu tespit edilmiştir. 4 günlük hücrelerde ise hücrelerin çoğunluğunun poligonal şekle sahip olduğu ve mitoz geçiren hücrelerin sayısında artış olduğu fakat hücrelerin tek tabakalı oldukları, diğer özelliklerinin ise 1 günlük hücrelerle aynı oldukları saptanmıştır (Şekil 9.3).

9.2.1.2. HFL1 hücrelerinin morfolojik incelenmesi

HFL1 cell line hücreleri %15'lik Fetal Bovine Serum, Nutrient Mixture F-12 (HAM) içeren besiyerlerinde 4 gün süreyle büyütülmüş ve May-Grünwald: Gimsa boyama yöntemine göre boyanarak incelenmişlerdir.

Flasklara ekildiklerinden 1 gün sonra incelenen HFL1 cell line hücrelerinin tek tabakalı oldukları belirlenmiştir. Hücrelerin genelde iğsi biçimli oldukları saptanmıştır. Hücrelerin genelde oval şekilli, hücrenin merkezinde yer alan tek bir çekirdeğe sahip oldukları gözlenmiştir. Çekirdekçiğin görülmediği hücrelerde kromatin taneciklerinin homojen dağıldıkları tespit edilmiştir. İğsi şekilli hücrelerin her iki kutbundan çıkan hücre uzantılarının çok uzun ve diğer hücrelerle kaynaşmış biçimde oldukları gözlenmiştir. May-Grünwald: Gimsa boyama tekniğine göre



Şekil 9.4. HFL1 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile 4 günlük görüntüleri. a) 1 Günlük HFL1 cell line hücreleri, b) 2 Günlük HFL1 cell line hücreleri, c) 3 Günlük HFL1 cell line hücreleri, d) 4 Günlük HFL1 Cell line hücreleri. Ölçü birimi 125 μ m

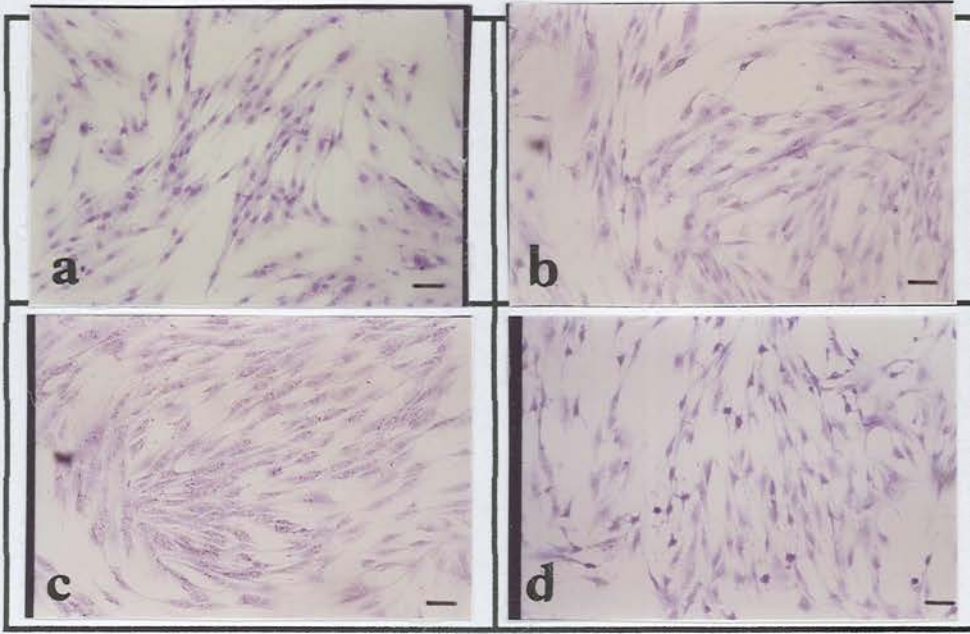
boyanan hücrelerin çekirdeklerinin açık pembe, kromatin taneciklerinin siyah renkte olduğu, sitoplazmanın ise çekirdeğe göre daha koyu renkte olduğu belirlenmiştir. A549 cell line hücrelerine uygulanan boyama tekniği ile boyanmalarına rağmen HFL1 cell line hücrelerinin A549 hücrelerine göre daha soluk bir biçimde boyandıkları saptanmıştır.

2 ve 3 günlük HFL1 cell line hücrelerinde hücrelerin sayıca arttığı fakat morfolojik özelliklerinin 1 günlük hücrelerle aynı olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin belirli yönlerde yoğunlaştıkları gözlenmiştir.

4 günlük hücrelerde hücre morfolojilerinin 1 günlük hücrelerle aynı olduğu fakat hücre uzantılarının diğer hücrelerin üzerinden geçerek birbirleriyle kaynaştıkları görülmüştür. .

9.2.1.3. C2 hücrelerinin morfolojik incelenmesi

C2 miyoblast hücreleri normal büyüme ortamlarında yeterli sayıya ulaştıktan sonra transformasyon meydana gelip gelmeyeceğini gözlemleyebilmek için besiyerleri %10 Horse serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin ve %9.2 NaHCO_3 içeren besiyeri ile değiştirilerek 4 gün boyunca gözlenmiştir.



Şekil 9.5. C2 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile 4 günlük görüntüleri. a) 1 Günlük C2 cell line hücreleri, b) 2 Günlük C2 cell line hücreleri, c) 3 Günlük C2 cell line hücreleri, d) 4 Günlük C2 cell line hücreleri. Ölçü birimi 125 μ m

Flasklara ekildikten bir gün sonra incelenen C2 miyoblast hücrelerinin tek tabakalı oldukları saptanmıştır. Hücre şekillerinin iğsi olduğu, her hücrenin bir adet ve oval biçimli bir çekirdeğe sahip olduğu belirlenmiştir. Çekirdekçiklerin görülmediği hücre çekirdeklerinde kromatin taneciklerinin homojen bir biçimde dağılmış oldukları gözlenmiştir. Hücre uzantılarının hücrelerin her iki kutbunda yer aldığı ve diğer hücrelerin uzantıları ile kaynaşmış şekilde oldukları görülmüştür. May-Grünwald: Gimsa boyama tekniği uygulanarak boyanan C2 miyoblast hücrelerinin çekirdeklerinin sitoplazmaya göre daha koyu renkte olduğu, sitoplazma renginin çekirdek çevresinde yoğun olduğu hücrenin periferine doğru ise azaldığı gözlenmiştir.

2 günlük C2 hücrelerinin tek tabakalı oldukları, morfolojik özelliklerinin 1 günlük C2 hücresiyle aynı olduğu, hücrelerde bir yönelme olduğu saptanmıştır.

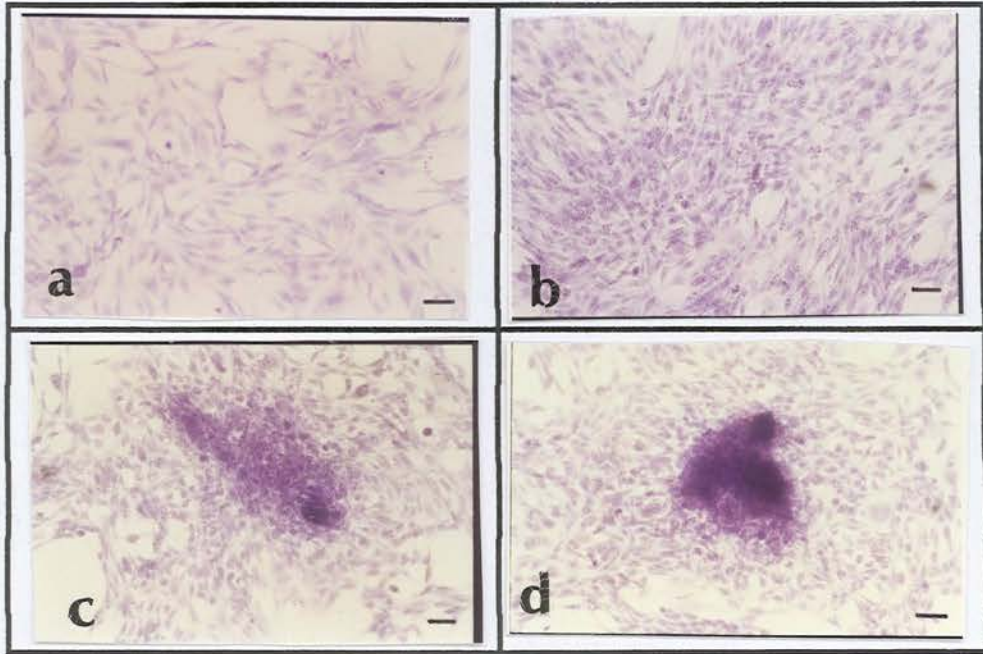
3 günlük hücrelerin tek tabakalı olduğu, hücrelerde bir yönelme olduğu fakat hücrelerde kromatin taneciklerinin sayısında artış olduğu belirlenmiştir.

4 günlük hücrelerin tek tabakalı oldukları fakat sayılarının azaldığı görülmüştür. Sitoplazma oranı da çekirdeğe göre azalmıştır. Hücre uzantılarının incelmesi ve hücrenin her yönünden çıktıkları tespit edilmiştir. hücrenin sağlıklı bir yapı kazandığı gözlenmiştir (Şekil 9.5).

9.2.1.4. CO25 hücrelerinin morfolojik incelenmesi

CO25 hücreleri normal büyüme ortamlarında yeterli sayıya ulaştıktan sonra transformasyonu gözlemleyebilmek için besiyerleri %10 Horse serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin, % 9.2 NaHCO₃ ve 1mM/ml Deksamethasone (200 mM) içeren besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler May-Grünwald: Gimsa boyama tekniğine göre boyanarak 4 gün süresince hergün incelenmişlerdir.

Flasklara ekildikten 1 gün sonra incelenen CO25 hücrelerinin tek tabakalı bir düzen gösterdikleri, çoğunlukla poligonal bir şekle sahip oldukları tespit edilmiştir. Hücrelerin genelde tek ve yuvarlak şekilli bir çekirdeğe, bazı hücrelerin ise iki adet çekirdeğe sahip oldukları belirlenmiştir. Hücre çekirdeklerinin genellikle hücrenin merkezinde bazı hücrelerde ise hücrenin bir kenarına itilmiş şekilde olduğu gözlenmiştir. Çekirdekçiklerin görülmediği hücrelerde kromatin taneciklerinin homojen dağıldığı görülmüştür. CO25 hücrelerinin hücrenin her yönünden çıkan kısa uzantılara sahip olduğu ve bu uzantıların diğer hücrelerin uzantıları ile kaynaşmış oldukları tespit edilmiştir. Çekirdeklerin sitoplazmaya göre daha koyu renkte boyandıkları gözlenmiştir.



Şekil 9.6. CO25 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile 4 günlük görüntüleri. a) 1 Günlük CO25 cell line hücreleri, b) 2 Günlük CO25 cell line hücreleri, c) 3 Günlük CO25 cell line hücreleri, d) 4 Günlük CO25 cell line hücreleri. Ölçü birimi 125 µm

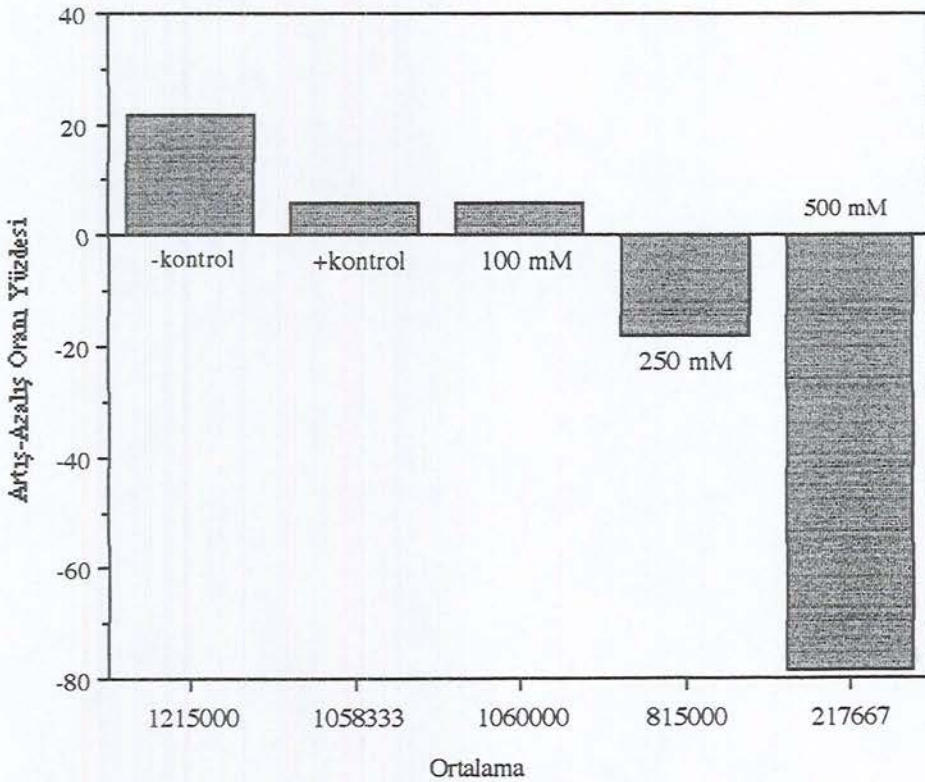
2 günlük hücrelerde, hücrelerin sayısında belirgin bir artışın olduğu belirlenmiştir. Hücre sınırlarının giderek kaybolmaya başladığı ve hücre uzantılarının diğer hücrelerin üzerinden geçtiği gözlenmiştir.

3 ve 4 günlük hücrelerde, CO25 hücrelerinin çok tabakalı hale gelerek, bir koloni oluşturdıkları belirlenmiştir. Koloniyi oluşturan hücrelerin sitoplazma sınırları kaybolmuştur. Koloninin etrafındaki hücrelerin çekirdeklerinin yuvarlak şekilli olduğu, çekirdeklerdeki kromatin taneciklerinin sayısında artış meydana geldiği ve sitoplazmalarının miktarında azalma olduğu saptanmıştır. Bu hücrelerin uzantılarının her yönde olduğu ve ağsı bir görünüme sahip oldukları tespit edilmiştir

9.2.2. Hücre Sayımları

9.2.2.1. Karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin hücre sayımları

Her flaska yaklaşık bir milyon hücre olacak şekilde konan A549 cell line



Şekil 9.7. A549 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar

Çizelge 9.1. A549 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sayımlar

Negatif Kontrol Grubu		Pozitif Kontrol Grubu		100 mM Doz Uyg. Grup		250 mM Doz Uyg. Grup		500 mM Doz Uyg. Grup		1000 mM Doz Uyg. Grup	
1 350 000	1 380 000	1 140 000	870 000	1 320 000	1 080 000	810 000	900 000	180 000	360 000	110 000	75 000
1 320 000	1 050 000	1 050 000	1 080 000	1 020 000	960 000	990 000	780 000	210 000	150 000	95 000	90 000
1 080 000	1 110 000	1 230 000	980 000	1 080 000	900 000	780 000	630 000	390 000	340 000	86 000	150 000

Çizelge 9.2. A549 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar

	Negatif Kont. Grubu	Pozitif Kont. Grubu	100 mM Doz Uyg. Grup	250 mM Doz Uyg. Grup	500 mM Doz Uyg. Grup
Ortalama	1 215 000	1 058 333	1 060 000	815 000	217 667
Artış-Azalış	%21.50	%5.80	%6.00	%18	%78.80
Oranı Yüzdesi	Arttı	Arttı	Arttı	Azaldı	Azaldı

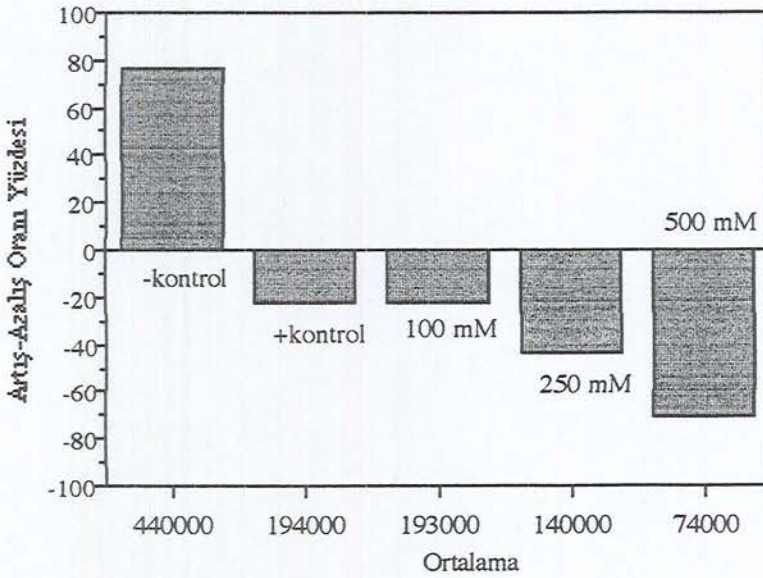
hücrelerine; 1000 mM, 500 mM, 250 mM ve 100 mM'lık Karvakrol 24 saat uygulanmıştır. Negatif ve pozitif kontrol grupları ile birlikte karvakrol uygulanan gruplara bu sürenin sonunda 2X Tripsin uygulanmış, flask tabanına yapışık olan hücreler flask tabanından kaldırılarak Thoma lamı ile sayılmışlardır.

Sayımlar sonucunda negatif kontrol grubu, DMSO uygulanan pozitif kontrol grubu ve 100 mM Karvakrol uygulanan gruplarda hücre sayısında artış görülmüştür. 250, 500 ve 1000 mM'lık Karvakrol uygulanan gruplarda hücre sayısında azalma tespit edilmiştir (Çizelge 1, 2 ve Şekil 9.7).

9.2.2.2. Karvakrol uygulanan HFL1 hücrelerinin hücre sayımları

Her flaska yaklaşık 250 000 olacak şekilde konan HFL1 hücrelerine 1000 mM, 500 mM, 250 mM ve 100 mM'lık Karvakrol 24 saat uygulanmıştır. Negatif ve pozitif kontrol grupları ile birlikte karvakrol uygulanan gruplara bu sürenin sonunda 2X Tripsin uygulanmış, flask tabanına yapışık olan hücreler flask tabanından kaldırılarak Thoma lamı ile sayılmışlardır.

Sayımlar sonucunda negatif kontrol grubunda artışın meydana geldiği, diğer gruplarda ise azalma olduğu görülmüştür (Çizelge 3, 4 ve Şekil 9.8).



Şekil 9.8. HFL1 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar

Çizelge 9.3. HFL1 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sayımlar

Negatif Kontrol Grubu		Pozitif Kontrol Grubu		100 mM Doz Uyg. Grup		250 mM Doz Uyg. Grup		500 mM Doz Uyg. Grup		1000 mM Doz Uyg. Grup	
450 000	432 000	196 000	222 000	232 000	210 000	150 000	160 000	100 000	95 000	< 10 000	< 10 000
416 000	440 000	176 000	180 000	208 000	200 000	120 000	140 000	65 000	58 000	< 10 000	< 10 000
450 000	454 000	200 000	192 000	160 000	150 000	138 000	130 000	60 000	65 000	< 10 000	< 10 000

Çizelge 9.4. HFL1 cell line hücreleri ile yapılan deneylerden elde edilen sonuçlar

	Negatif Kont. Grubu	Pozitif Kont. Grubu	100 mM Doz Uyg. Grup	250 mM Doz Uyg. Grup	500 mM Doz Uyg. Grup
Ortalama	440 000	194 000	193 000	140 000	74 000
Artış-Azalış	%76	%22.40	%22.80	%44	%70.40
Oranı Yüzde	Arttı	Azaldı	Azaldı	Azaldı	Azaldı

9.2.3. Karvakrolün hücreler üzerindeki etkisini belirlemek için yapılan çalışmalar

9.2.3.1. Karvakrolün A549 hücreleri üzerinde meydana getirdiği etkiler

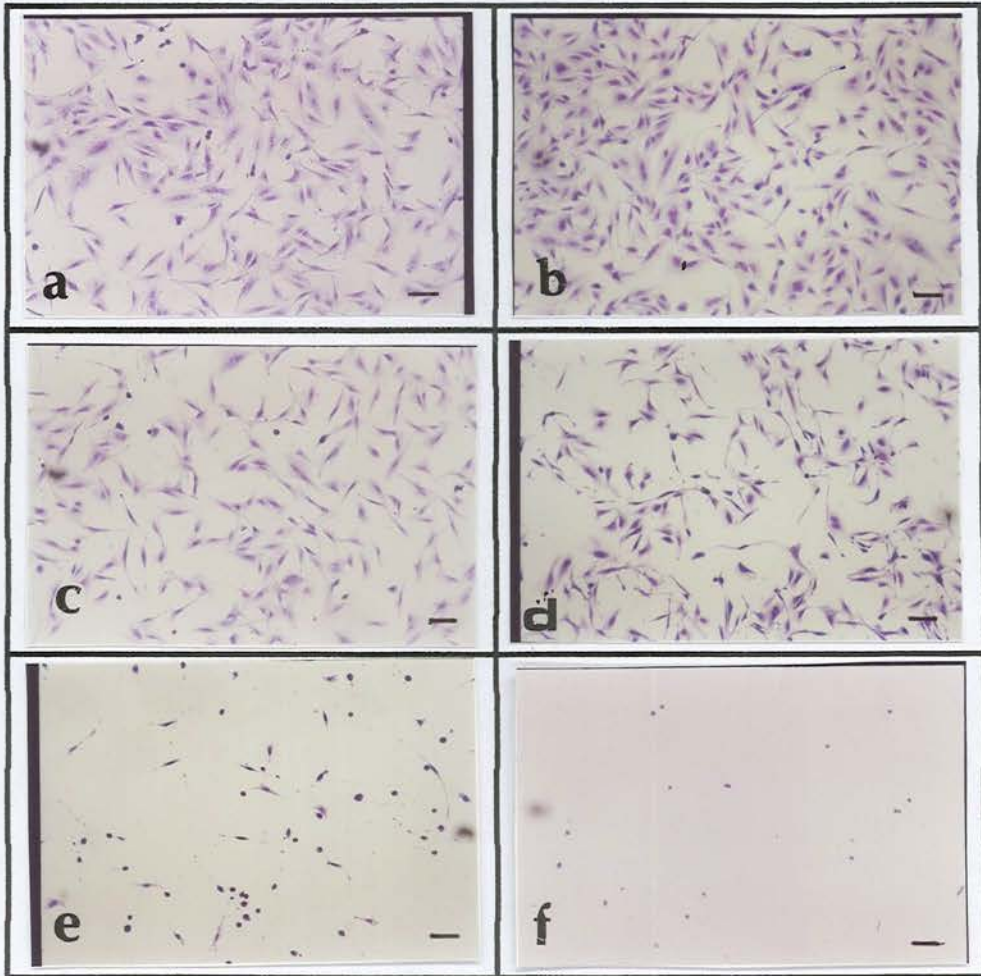
Negatif ve pozitif kontrol grupları ve Karvakrol uygulanan gruplar 24 saat sonra May-Grünwald: Gimsa tekniği ile boyanarak incelenmişlerdir.

Negatif kontrol grubundaki A549 hücrelerinin tek tabakalı oldukları gözlenmiştir. A549 hücrelerinin % 90'lık bir bölümünün poligonal şekle sahip olduğu geri kalan bölümünün ise üçgen ve iğsi şekilli oldukları tespit edilmiştir. Hücre çekirdek şeklinin oval olduğu saptanmıştır. Hücrelerin büyük çoğunluğunun tek çekirdeğe, çok az sayıdaki hücrenin birden fazla sayıda çekirdeğe sahip olduğu tespit edilmiştir. İğsili hücrelerde, çekirdeğin hücrenin merkezinde yer aldığı, poligonal şekilli hücrelerde ise çekirdeğin hücrenin bir kenarına itilmiş şekilde bulunduğu belirlenmiştir. Çekirdekçiğin belirgin olmadığı hücrelerde, kromatin taneciklerinin homojen dağıldığı gözlenmiştir. İğsili şeklindeki hücrelerin uzantılarının hücrenin iki kutbunda bulunduğu görülmüştür. Poligonal şekle sahip hücrelerin uzantılarının diğer hücrelerle birleşmiş olduğu saptanmıştır. Hücre sınırlarının çoğunlukla düz olduğu tespit edilmiştir. May-Grünwald: Gimsa boyama tekniğine göre boyanan hücre çekirdeklerinin açık pembe, çekirdek içindeki kromatin taneciklerinin ise siyah renkte olduğu görülmüştür. Çekirdek çevresindeki sitoplazmanın yoğun olduğu, perifere gidildikçe sitoplazma yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir (Şekil 9.9 ve 9.10).

Pozitif kontrol grubundaki A549 hücreleri incelendiğinde, hücrelerin çoğunluğunun poligonal şekilli, küçük bir bölümünün ise iğsili ve tek tabakalı oldukları saptanmıştır. Hücrelerin % 70'lik bölümünün tek çekirdekli olduğu geri kalan bölümünün ise birden çok sayıda çekirdeğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Hücre çekirdeklerinin oval biçimli olduğu ve çekirdeklerin hücrenin bir kenarına itilmiş şekilde yerleştikleri belirlenmiştir. Çekirdekçiğin belirlenemediği hücrelerde kromatin taneciklerinin homojen biçimde dağıldığı gözlenmiştir. Poligonal şekle sahip hücrelerin, hücre sınırlarının düz olmadığı ve her yönde uzantılara sahip oldukları görülmüştür. İğsili şekilli hücrelerin ise hücrelerin her iki kutbunda uzantılara sahip oldukları saptanmıştır. Çekirdeğin sitoplazmaya göre koyu renkte boyandığı ve sitoplazmanın yoğunluğunun çekirdek çevresinden perifere doğru gidildikçe azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 9.9 ve 9.10).

100 mM karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin poligonal ve iğsi şekilli oldukları tespit edilmiştir. Hücre çekirdek şekillerinde bozulmalarının meydana geldiği gözlenmiştir. Diğer morfolojik özelliklerin negatif ve pozitif kontrol grupları ile aynı olduğu belirlenmiştir (Şekil 9.9 ve 9.10).

250 mM karvakrol uygulanan gruptaki A549 hücrelerinin tek tabakalı yapı gösterdikleri, hücrelerin sitoplazmalarının çekirdeğe oranla azaldığı görülmüştür. Poligonal şekilli hücrelerin sayısının azaldığı, üçgen şekilli hücrelerin görüldüğü ve hücrelerin giderek iğsi şekil aldıkları belirlenmiştir. Genelde hücrelerin tek çekirdekli olduğu, çok az sayıda hücrenin iki çekirdeğe sahip olduğu gözlenmiştir. İğsi şekilli hücrelerin çekirdeklerinin yassılaştığı iğ biçiminde olduğu tespit edilmiştir. Poligonal ve üçgen şekilli hücrelerin çekirdeklerinin genelde oval biçimli olduğu saptanmıştır. Büyük büyütmelelerde çekirdek şekillerinde deformasyon

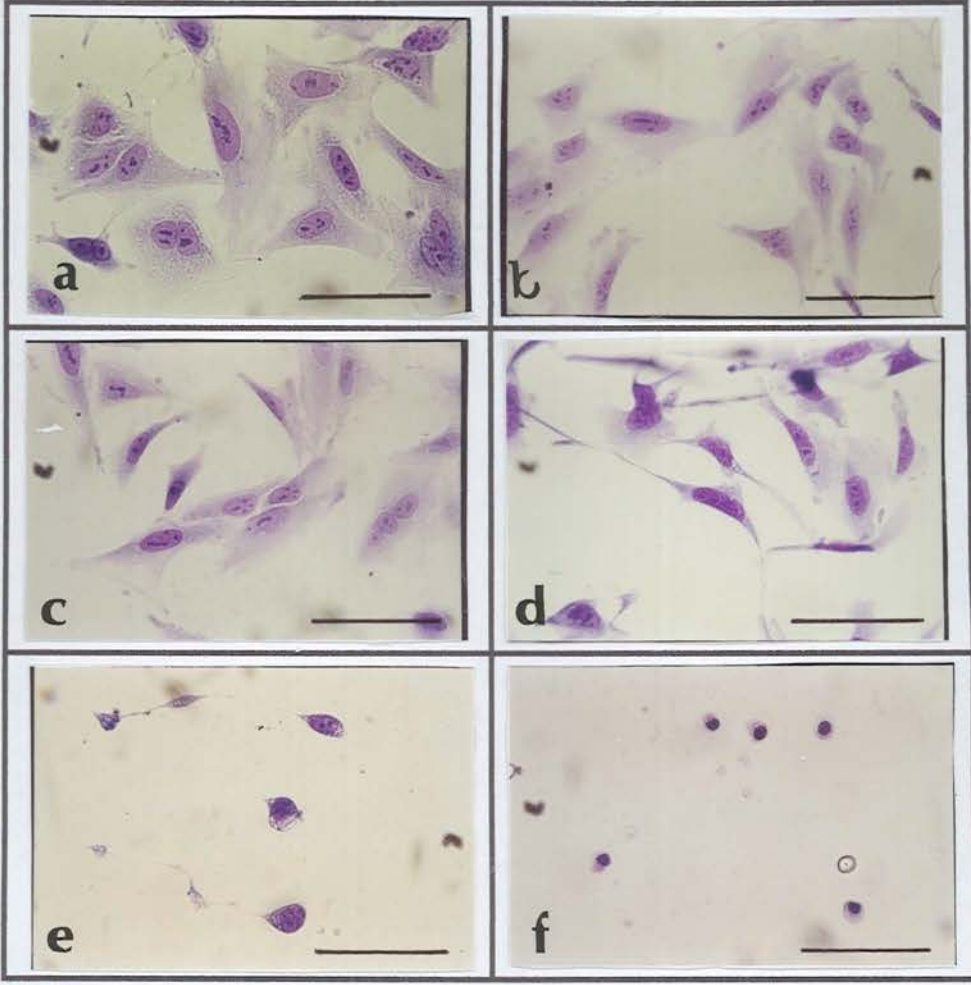


Şekil 9.9. A549 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup, f) 1000 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

belirlenmiştir. İğsi ve poligonal şekilli hücrelerin çekirdeklerinin, hücrenin merkezinde, üçgen şekilli hücrelerin çekirdeklerinin hücrenin bir kenarına itilmiş şekilde yer aldığı gözlenmiştir. Çekirdekçiğin gözlenemediği hücrelerde, kromatin taneciklerinin homojen dağıldığı görülmüştür. İğsi şekil alan hücrelerin birbirine zıt kutuplarda uzun ve dallanmış uzantılara sahip oldukları tespit edilmiştir. Üçgen şekilli hücrelerin tek yönde kısa uzantılara sahip olduğu belirlenmiştir. Çekirdek ve sitoplazma renginin, negatif ve pozitif kontrol grupları ve 100 mM'lık karvakrol uygulanan gruplardaki çekirdek ve sitoplazma rengine göre daha koyu renkte boyandığı saptanmıştır (Şekil 9.9 ve 9.10).

500 mM karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin bir bölümünün zeminden ayrıldıkları ve besiyeri içinde yüzdükleri belirlenmiştir. Hücrelerin % 70'inin yuvarlak ve oval biçimde, % 30'unun ise iğsi şekilde oldukları, tek tabakalı bir düzen gösterdikleri saptanmıştır. Hücre çekirdeğinin sitoplazmaya göre daha koyu renkte olduğu, hücrelerin bir bölümünde tek, bir bölümünde ise iki adet çekirdek bulunduğu, sitoplazmanın oranının çok azaldığı gözlenmiştir. Çekirdek şekli, iğsi hücrelerde oval, küresel hücrelerde yuvarlak biçimli olduğu tespit edilmiştir. Çekirdek hücrenin bir kenarına itilmiş biçimde yerleşmiş olarak gözlenmiştir. Kromatin tanecikleri homojen olarak dağılmış, çekirdek saptanamamıştır. İğsi hücrelerin her iki kutbundan çıkan uzantıların eşit uzunlukta oldukları bazı hücrelerin uzantılarının ise hücrenin sadece bir tarafında bulunduğu ve çok uzun oldukları, küresel hücrelerin uzantılarının olmadığı tespit edilmiştir. Sitoplazmanın renginin; kontrol grupları ve 100 ve 250 mM'lık karvakrol gruplarındaki hücrelerin sitoplazmalarına göre daha koyu renkte olduğu belirlenmiştir (Şekil 9.9 ve 9.10).

1000 mM karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin büyük bir bölümünün, zeminden ayrılarak besiyeri içinde yüzdükleri tespit edilmiştir. Zemine yapışık olarak kalan hücrelerin tümünün yuvarlak şekilli olduğu, çekirdeklerinin de hücrenin şekline uyum sağlayarak yuvarlak şekil kazandığı ve tek çekirdeğe sahip oldukları gözlenmiştir. Hücrelerin bir adet çekirdeğe sahip oldukları ve çekirdeğin hücrenin bir kenarında yerleşmiş olduğu belirlenmiştir. Çekirdek diğer gruplarla karşılaştırıldığında tamamen koyu bir renk almış ve çok yoğun bir biçimde olduğu saptanmıştır. Bu nedenle kromatin tanecikleri ayırt edilememiştir. Tüm hücre göz önüne alındığında sitoplazmanın oranının çekirdeğin kapladığı alana göre çok az olduğu gözlenmiştir.



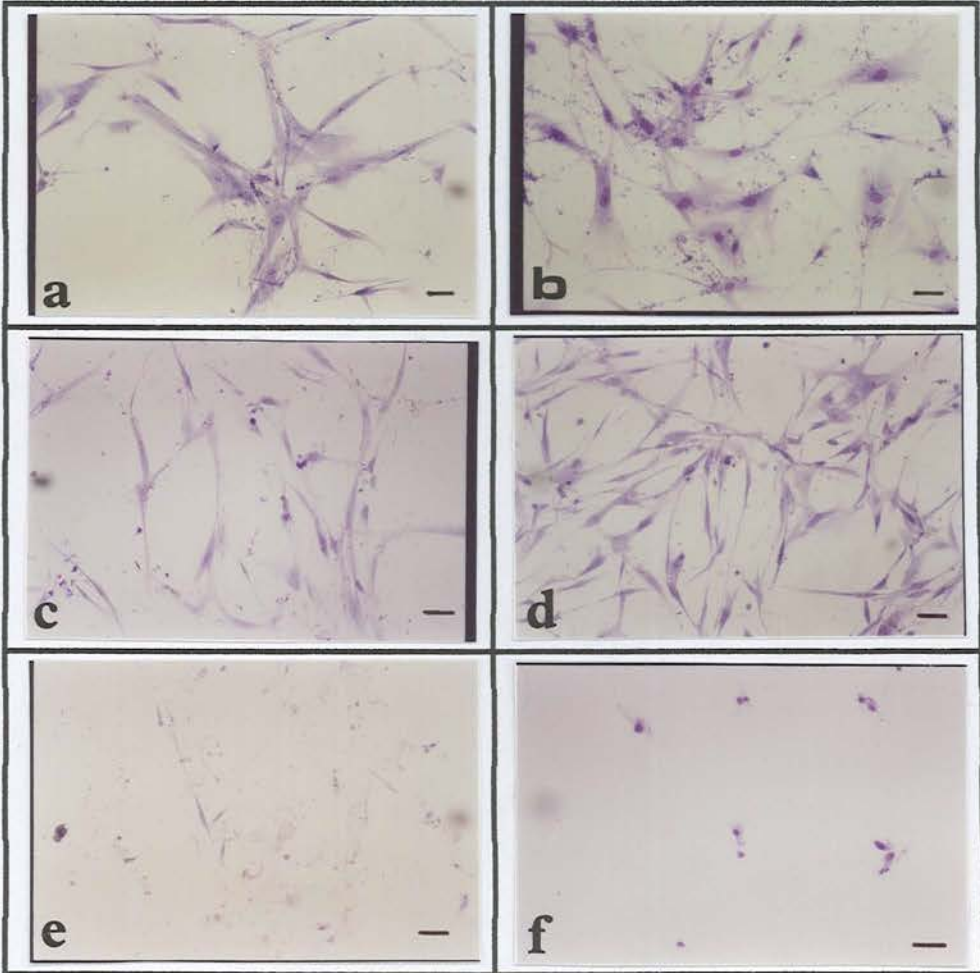
Şekil 9.10. A549 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup, f) 1000 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

9.2.3.2. Karvakrolün HFL1 hücreleri üzerinde meydana getirdiği etkiler

Negatif kontrol grubundaki HFL1 hücreleri May-Grünwald: Gimsa ile tekniği ile boyandıklarında, hücre şekillerinin iğsi ve poligonal olduğu, hücrelerin tek tabakalı oldukları tespit edilmiştir. Hücrelerin tümünün tek ve oval biçimli bir çekirdeğe sahip oldukları, çekirdeğin iğsi şekilli hücrelerde merkezde, poligonal şekilli hücrelerde ise hücrenin bir kenarına yerleşmiş konumda yer aldığı saptanmıştır. Çekirdekçiğin görülmediği hücrelerde kromatinin bir bütün halinde ve çekirdeğin merkezinde daha koyu renkte boyanmış biçimde yer aldığı gözlenmiştir. İğsi hücrelerin, hücrenin her iki kutbunda uzantıya, poligonal hücrelerin ise diğer

hücrelerle kaynaştıkları yönlerde birden fazla sayıda uzantıya sahip oldukları belirlenmiştir. Çekirdeğin sitoplazmaya göre daha koyu boyanmış ve pembe renkte olduğu görülmüştür. Sitoplazmanın çekirdek çevresinde daha koyu olduğu fakat perifere doğru açıldığı gözlenmiştir (Şekil 9.11 ve 9.12).

Pozitif kontrol grubunda yer alan ve sadece DMSO'nun uygulandığı HFL1 hücrelerinin tek tabakalı oldukları, hücrelerin büyük bölümünün poligonal biçimli, geri kalan bölümünün ise üçgen ve iğsi şekilli olduğu tespit edilmiştir. Hücrede tek ve oval şekilli olan çekirdeğin, poligonal ve üçgen hücrelerde, hücrenin bir kenarında yerleştiği, iğsi hücrelerde ise hücrenin merkezinde yer aldığı belirlenmiştir. Çekirdekçiğin görülmediği hücre çekirdeklerinde, kromatin taneciklerinin koyu renkte boyandığı, fakat negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütünlüğünün bozulduğu ve parçalandığı saptanmıştır



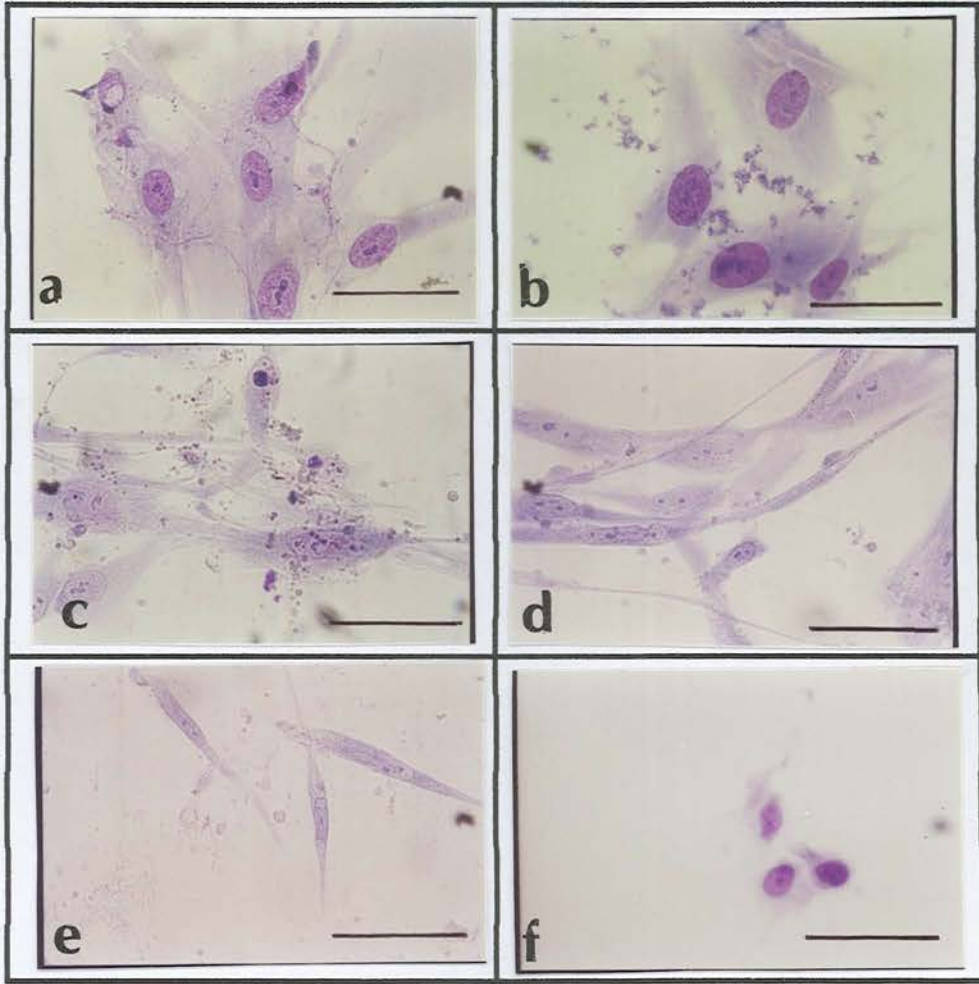
Şekil 9.11. HFL1 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup, f) 1000 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

İğsi biçimli hücrelerde hücrenin karşılıklı iki kutbundan çıkan uzun uzantılara sahip olduğu, poligonal hücrelerinde çok uzun ve kısa uzantılara sahip oldukları gözlenmiştir. Boyanma özelliklerinin negatif kontrol grubu ile aynı olduğu tespit edilmiştir (Şekil 9.11 ve 9.12).

May-Grünwald: Gimsa boyama tekniği uygulanarak boyanan 100 mM karvakrol uygulanmış A549 hücrelerinin tek tabakalı oldukları ve hücrelerin çoğunluğunun ise iğsi form kazandığı, birbirleriyle füzyon yapma eğiliminde oldukları belirlenmiştir. Çekirdeğin hücre merkezinde yerleştiği, tek ve oval biçimli olduğu gözlenmiştir. Kromatin taneciklerinin çekirdek içinde homojen dağıldığı, buna karşın çekirdekçiğin görülmediği saptanmıştır. İğsi şekilli hücrelerin her iki kutupta oldukça uzun uzantılara sahip oldukları tespit edilmiştir. Çekirdek ve sitoplazma renklerinin kontrol gruplarına göre açıldığı görülmüştür (Şekil 9.11 ve 9.12).

250 mM karvakrol uygulanan HFL1 hücrelerinin tek tabakalı oldukları, büyük bir kısmının iğsi şekil kazanmış olduğu, az sayıda poligonal ve üçgen şekil gösteren hücrenin bulunduğu gözlenmiştir. Hücrelerin çekirdeklerinin tek ve oval biçimli olduğu, iğsi şekilli hücrelerin çekirdeklerinin hücre merkezinde, diğer hücre çekirdeklerinin ise hücrenin bir kenarında yer aldığı saptanmıştır. Kromatin taneciklerinin homojen olduğu ve çekirdekçiğin bulunmadığı belirlenmiştir. İğsi şekilli hücrelerin uzun ve karşılıklı iki kutupta bulunan uzun uzantılarının olduğu görülmüştür. Hücreler boyanma özelliklerine göre incelendiklerinde, negatif ve pozitif kontrol gruplarının aksine çekirdek ve sitoplazma renginin birbirine çok yakın renkler kazandığı tespit edilmiştir sitoplazma renklerinin kontrol gruplarına göre açıldığı görülmüştür (Şekil 9.11 ve 9.12).

500 mM karvakrol uygulanan hücrelerde, hücrelerin tek tabakalı ve iğsi biçimli olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin büyük bir bölümünün zeminden ayrıldığı tespit edilmiştir. Hücre hacimlerinde küçülme görülmüştür. Çekirdeklerin hücre şekline uygun biçimde yassılaşmış iğsi şekil aldıkları gözlenmiştir. Kromatin taneciklerinin homojen dağıldığı, çekirdekçiğin olmadığı hücre çekirdeklerinin hücre ortasında bulunduğu tespit edilmiştir. İğsi hücrelerin karşılıklı iki kutupta kısa uzantılara sahip oldukları saptanmıştır. Hücre sitoplazmasında çok sayıda vakuol gözlenmiştir. Çekirdek ve sitoplazma renginin birbirlerine çok yakın oldukları belirlenmiştir sitoplazma renklerinin kontrol gruplarına göre açıldığı görülmüştür (Şekil 9.11 ve 9.12).



Şekil 9.12. HFL1 cell line hücrelerinin May-Grünwald : Gimsa boyama ile görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup, f) 1000 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

1000 mM karvakrol uygulanan HFL1 hücrelerinin zemine yapışık olarak kalan çok az bir bölümünün tek tabakalı olduğu, bir tane ve oval şekilli, hücrenin bir kenarında konumlanmış çekirdeklerinin olduğu tespit edilmiştir. Hücre hacminin azaldığı belirlenmiştir. Hücre çekirdeğinde bir yoğunlaşmanın olduğu, kromatin taneciklerinin homojen olduğu saptanmıştır. Hücre uzantılarının yok olduğu gözlenmiştir. Çekirdeğin sitoplazmaya göre çok koyu olarak pembe renkte boyandığı görülmüştür sitoplazma renklerinin kontrol gruplarına göre açıldığı görülmüştür (Şekil 9.11 ve 9.12).

9.2.4. Karvakrol Uygulanan Hücrelerin İmmünohistokimyasal Özellikleri

9.2.4.1. Karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin immünohistokimyasal özellikleri

Karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin tubulin hücre iskeletlerinde meydana gelen transformasyonun saptanması amacıyla, Monoklonal Anti- α Tubulin Conjugate Clone DM 1A ile hücreler muamele edilerek fluoressan mikroskopunda incelenmişlerdir.

Negatif ve pozitif kontrol grubundaki A549 hücrelerinde, hücre periferine doğru bulutsu görünümde monomer tubulin tespit edilmiştir. Hücre çekirdeğinin çevresinde tubulinlerin yoğun bir şekilde oldukları belirlenmiştir (Şekil 9.13).

100 mM karvakrol uygulanan A549 hücrelerinde çekirdek çevresi de dahil olmak üzere bulutsu görünümde monomer tubulin saptanmıştır (Şekil 9.13).

A549 hücrelerinin 250 mM'lık karvakrol uygulanan grubu 100 mM karvakrol uygulanan grup ile karşılaştırıldığında çekirdek çevresinde tubulin yoğunlaşmasının olduğu, hücre periferinde ise monomer tubulin miktarının arttığı tespit edilmiştir (Şekil 9.13).

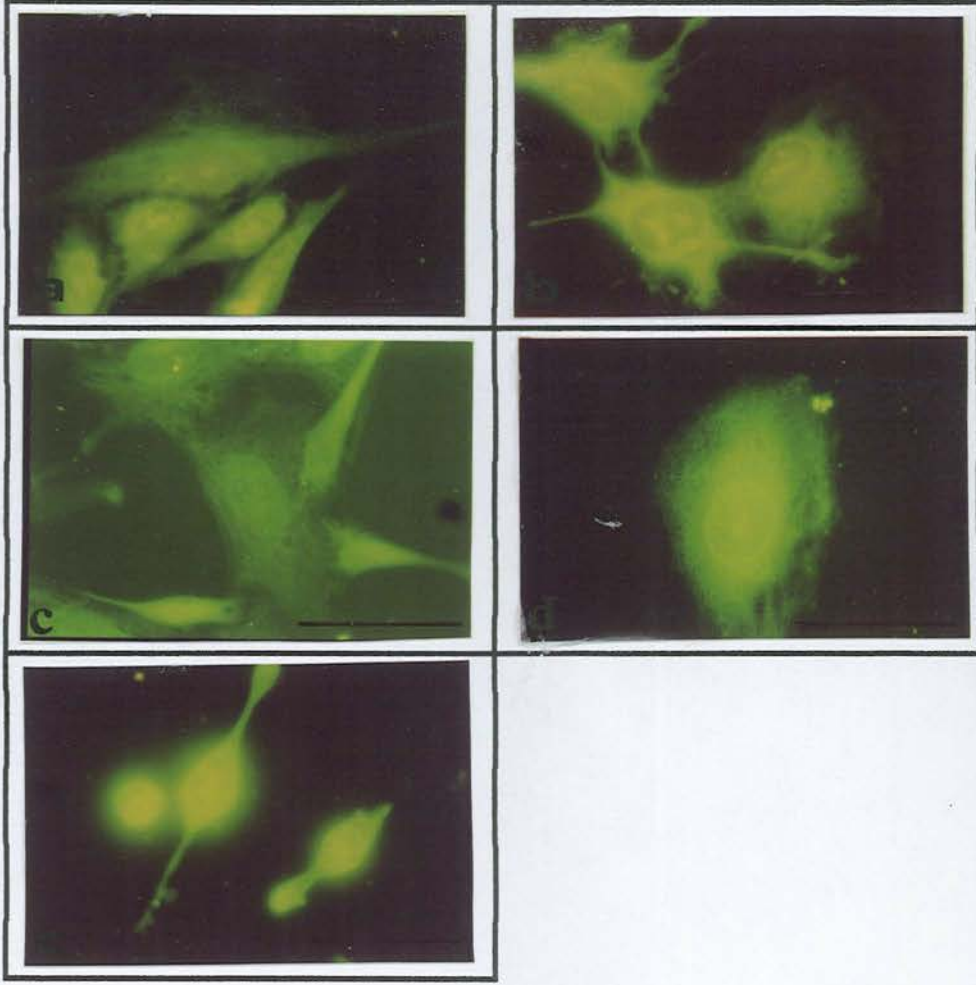
500 mM karvakrol uygulanan grupta, hücre şeklinin içi ve küresel şekil alması nedeniyle tubulin miktarının büyük ölçüde azalmış olduğu belirlenmiştir (Şekil 9.13).

1000 mM karvakrol uygulanan grubun ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerinde sitoplazma oranının çok azaldığı saptandığı için hücreler tubulin iskeleti bakımından incelenmemişlerdir.

A549 hücrelerinin aktin hücre iskeletlerinde karvakrol uygulamasıyla meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi amacıyla, hücreler Monoklonal Anti-Actin FITC Conjugate Clone AC-40 ile muamele edilmişlerdir.

Negatif kontrol grubundaki A549 hücreleri aktin hücre iskeleti bakımından incelendiklerinde düzenli demetler halinde aktin polimerlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Komşu hücrelerin bu aktin polimerleri sayesinde birbirleriyle kaynaştıkları tespit edilmiştir (Şekil 9.14).

Pozitif kontrol grubunda bulunan ve sadece DMSO uygulanan A549 hücrelerinde, düzenli aktin polimer demetlerinin düzeninin bozulduğu ve aktin polimerlerinin dağınık halde hücrede bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 9.14).



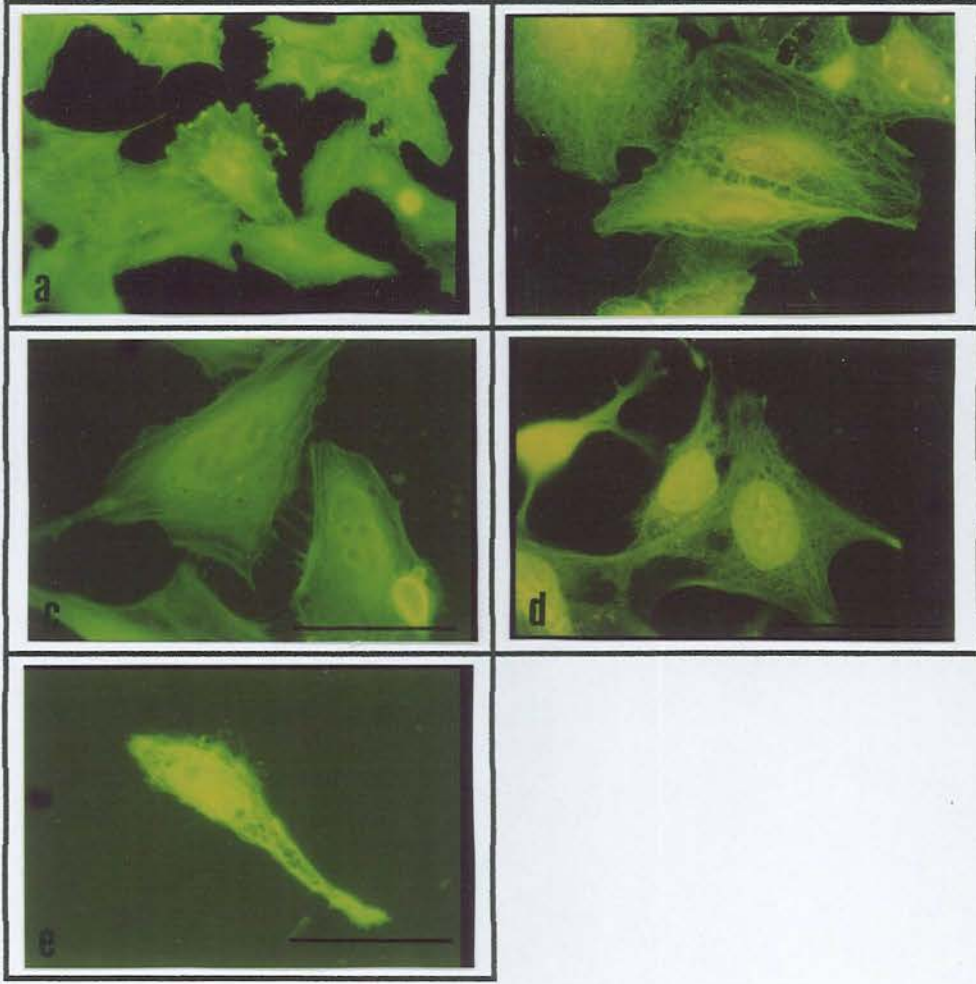
Şekil 9.13. A549 cell line hücrelerinin Monoclonal Anti- α Tubulin Conjugate Clone DM 1A boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

Aktin hücre iskeleti bakımından incelenen 100 mM karvakrol uygulanan gruptaki A549 hücrelerinde, negatif kontrol grubundaki hücrelerle karşılaştırıldığında düzenli aktin polimer demetlerinin kaybolduğu, monomer aktinin hücre yapısında yoğunlaştığı belirlenmiştir (Şekil 9.14).

250 mM karvakrol uygulanan A549 hücrelerinde aktin hücre iskeletinin yoğunluğunun azaldığı, sitoplazmada vakuollerin meydana geldiği gözlenmiştir.

Monoclonal Anti-Actin FITC Conjugate Clone AC-40 ile muamele edilerek aktin hücre iskeletleri incelenen 500 mM karvakrol uygulanmış A549 hücrelerinin iç şeklini aldıkları, aktin polimerlerinin görülemez hale geldiği ve çok sayıda vakuolün hücre sitoplazmasında yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 9.14).

1000 mM karvakrol uygulanan grubun ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerinde sitoplazma oranının çok azaldığı saptandığı için hücreler aktin



Şekil 9.14. A549 cell line hücrelerinin Monoclonal Anti-Actin FITC Conjugate Clone AC-40 ile boyanmış immünotokimyasal görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

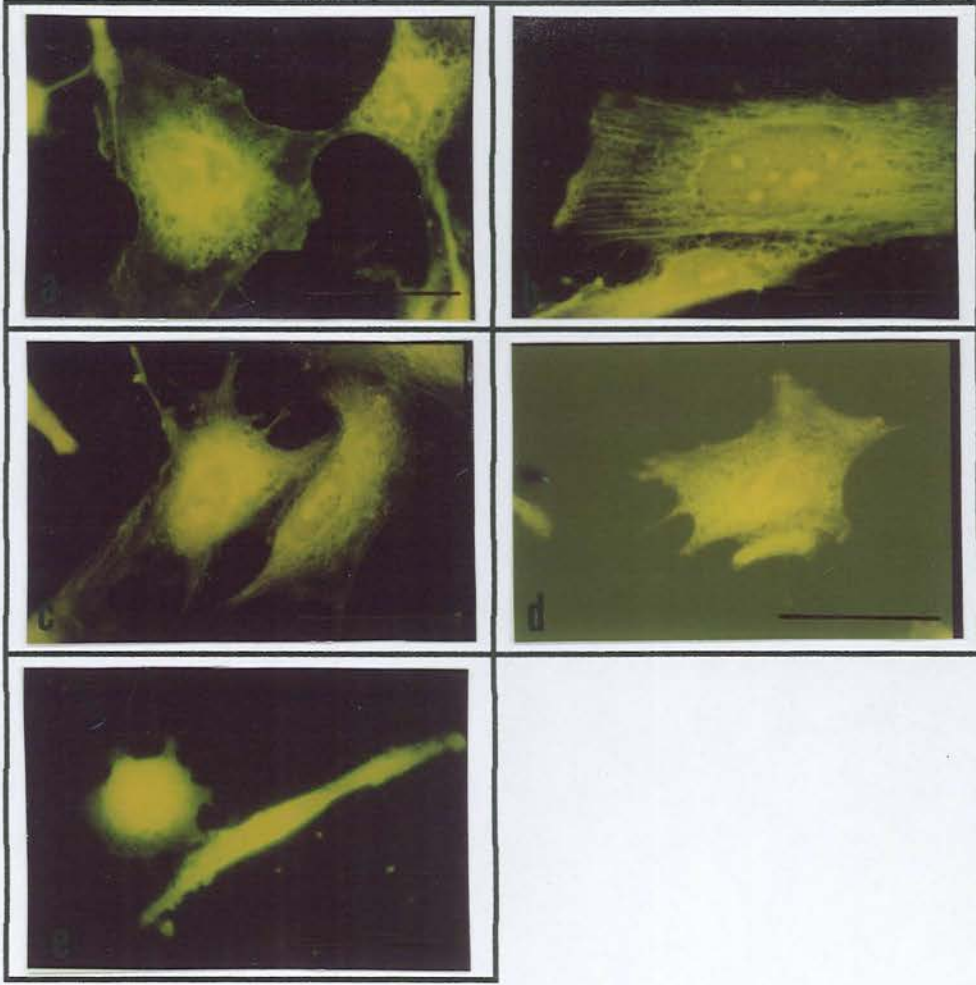
iskeletleri bakımından incelenmemişlerdir (Şekil 9.14).

Alcianblue-Safranin boyama tekniği uygulanan A549 hücreleri aktin hücre iskeletleri ve salgı granülleri bakımından incelenmişlerdir.

Negatif kontrol grubundaki hücreler Alcianblue-Safranin boyama yöntemi ile boyandıklarında, çekirdek etrafında aktin hücre iskeleti bakımından bir yoğunlaşma gözlenmiştir. Hücrelerin periferlerine doğru bulutsu görünümde monomer aktin tespit edilmiştir (Şekil 9.15).

Sadece DMSO uygulanan pozitif kontrol grubundaki A549 hücrelerinde polimer aktin saptanmıştır. Hücre periferinde salgı granülleri olabileceği düşünülen granüller belirlenmiştir (Şekil 9.15).

100 mM karvakrol uygulanan grupta sitoplazmada çok sayıda granül gözlenmiştir. hücre periferinde monomer aktin saptanmıştır. Çekirdek çevresinde



Şekil 9.15. A549 cell line hücrelerinin Alcianblue-Safranin boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

monomer aktinin yoğun bir biçimde yer aldığı gözlenmiştir (Şekil 9.15).

250 mM olarak karvakrol uygulanan grupta hücrelerde çok sayıda granül ve monomer aktin yoğunlaşması saptanmıştır (Şekil 9.15).

500 mM karvakrol uygulana A549 hücre grubunda hücre şeklinin bozulması nedeniyle monomer aktin yoğunlaşması görülmüştür (Şekil 9.15).

1000 mM karvakrol uygulanan grubun ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerinde sitoplazma oranının çok azaldığı saptandığı için hücreler Alcianblue-Safranin boyama tekniği ile boyanmamışlardır.

Bölünme ve fonksiyon özellikleri bakımından DAPI boyası uygulanarak floresan mikroskobunda incelenen A549 hücrelerinin negatif kontrol gruplarında çok parçalı kromatin yoğunlaşmasının olduğu belirlenmiştir (Şekil 9.16).

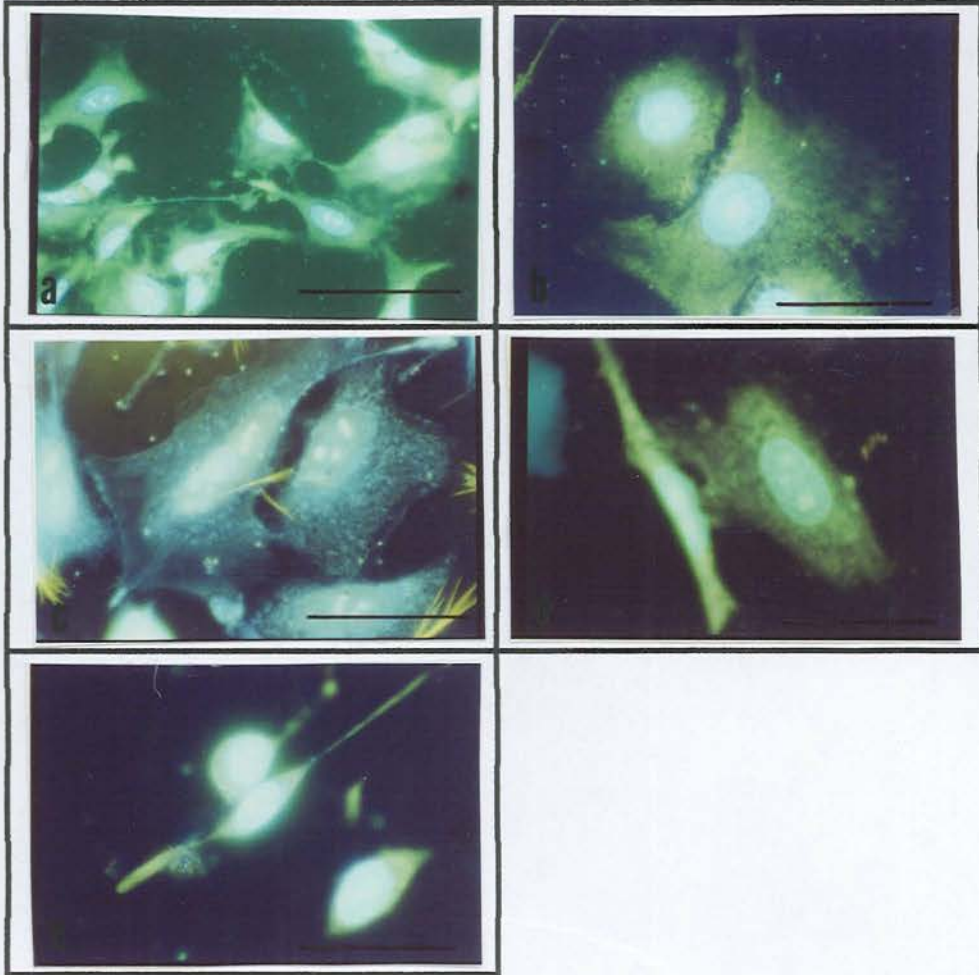
Pozitif kontrol grubundaki hücre çekirdeklerinde, çok parçalı komatin yoğunlaşmasının olduğu, hücre çekirdeğinin yuvarlak şekil almaya başladığı tespit edilmiştir (Şekil 9.16).

100 mM karvakrol uygulanan grupta çekirdeğin oval yapıda olduğu, kromatinin parçalanarak çekirdek içine dağıldığı gözlenmiştir.

250 mM karvakrol uygulanan DAPI ile boyanan A549 hücrelerinde çekirdek içeriğinde yoğunlaşma saptanmıştır (Şekil 9.16).

Karvakrolün 500 mM olarak uygulandığı grupta çekirdek içeriğinin çok yoğunlaştığı ve kromatinin çok parçalı olduğu görülmüştür (Şekil 9.16).

1000 mM karvakrol uygulanan grupta sitoplazma oranının çok azaldığı ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerde tespit edildiği için DAPI ile boyama yapılmamıştır.



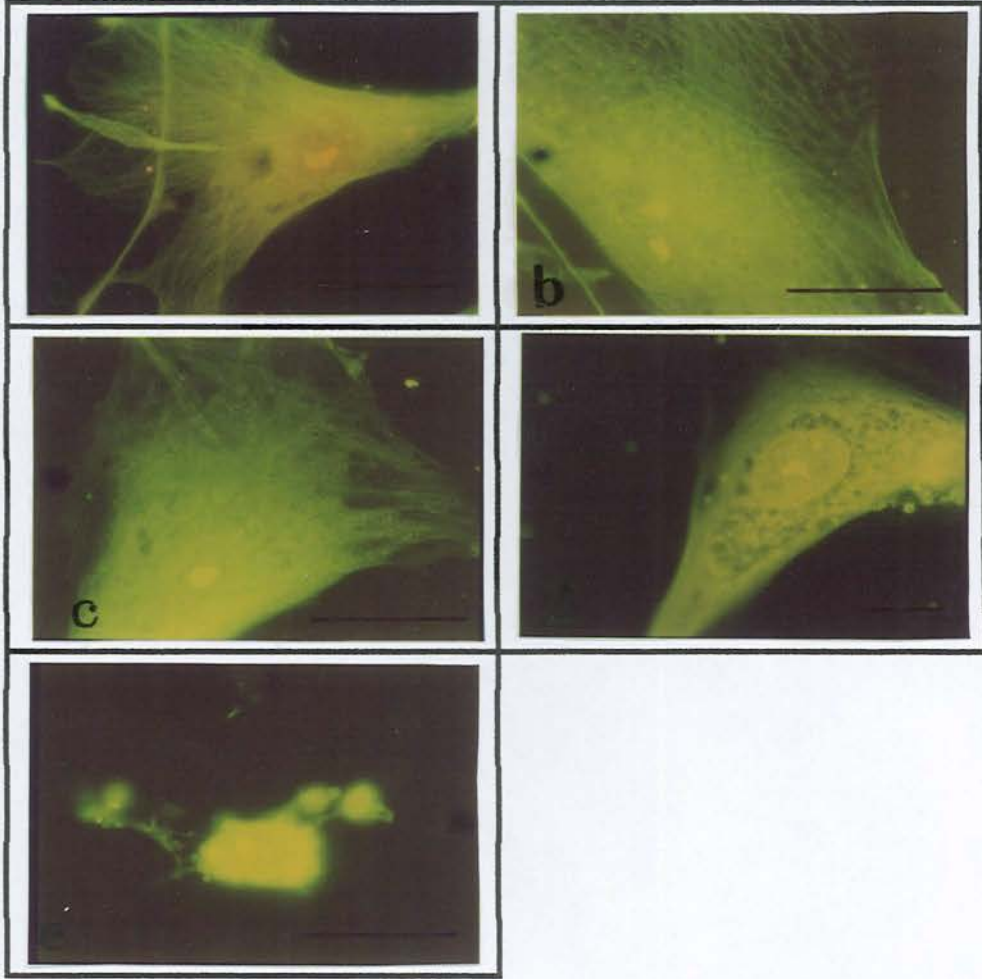
Şekil 9.16. A549 cell line hücrelerinin DAPI ile boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

9.2.4.2. Karvakrol uygulanan HFL1 hücrelerinin immünohistokimyasal özellikleri

HFL1 hücrelerinin, tubulin hücre iskeletlerinde karvakrol uygulamasıyla meydana gelen transformasyonun saptanması amacıyla, Monoklonal Anti- α Tubulin Conjugate Clone DM 1A ile hücreler muamele edilerek floresan mikroskopunda incelenmişlerdir.

Negatif ve pozitif kontrol grubundaki HFL1 hücrelerinde tubulin polimerleri net bir biçimde saptanmıştır (Şekil 9.17).

100 mM karvakrol uygulanan HFL1 hücrelerinin hücre iskeletlerinde, tubulin polimerlerinde azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 9.17).



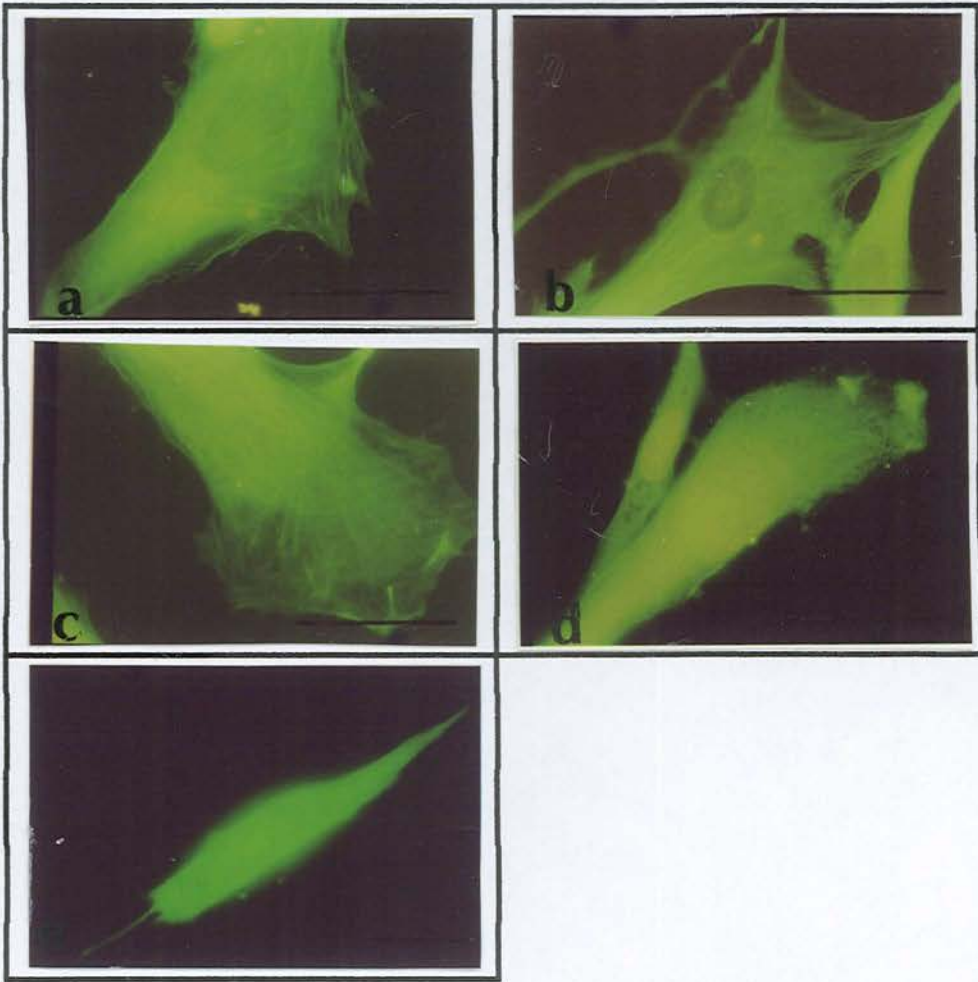
Şekil 9.17. HFL1 cell line hücrelerinin Monoklonal Anti- α Tubulin Conjugate Clone DM 1A boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

Karvakrolün 250 mM olarak uygulandığı hücrelerde tubulin polimerlerinin görülemez hale geldiği ve tubulin monomerlerinin görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca hücre sitoplazmasında çok sayıda vakuol görülmüştür (Şekil 9.17).

500 mM karvakrol uygulanan grupta tubulin hücre iskeletinin tamamen yok olduğu gözlenmiştir (Şekil 9.17).

1000 mM karvakrol uygulanan grubun ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerinde sitoplazma oranının çok azaldığı saptandığı için hücreler tubulin iskeleti bakımından incelenmemişlerdir.

HFL1 hücrelerinin aktin hücre iskeletlerinde karvakrol uygulamasıyla meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi amacıyla, hücreler Monoklonal Anti-Actin FITC Conjugate Clone AC-40 ile muamele edilmişlerdir.



Şekil 9.18. HFL1 cell line hücrelerinin Monoklonal Anti-Actin FITC Conjugate Clone AC-40 ile boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

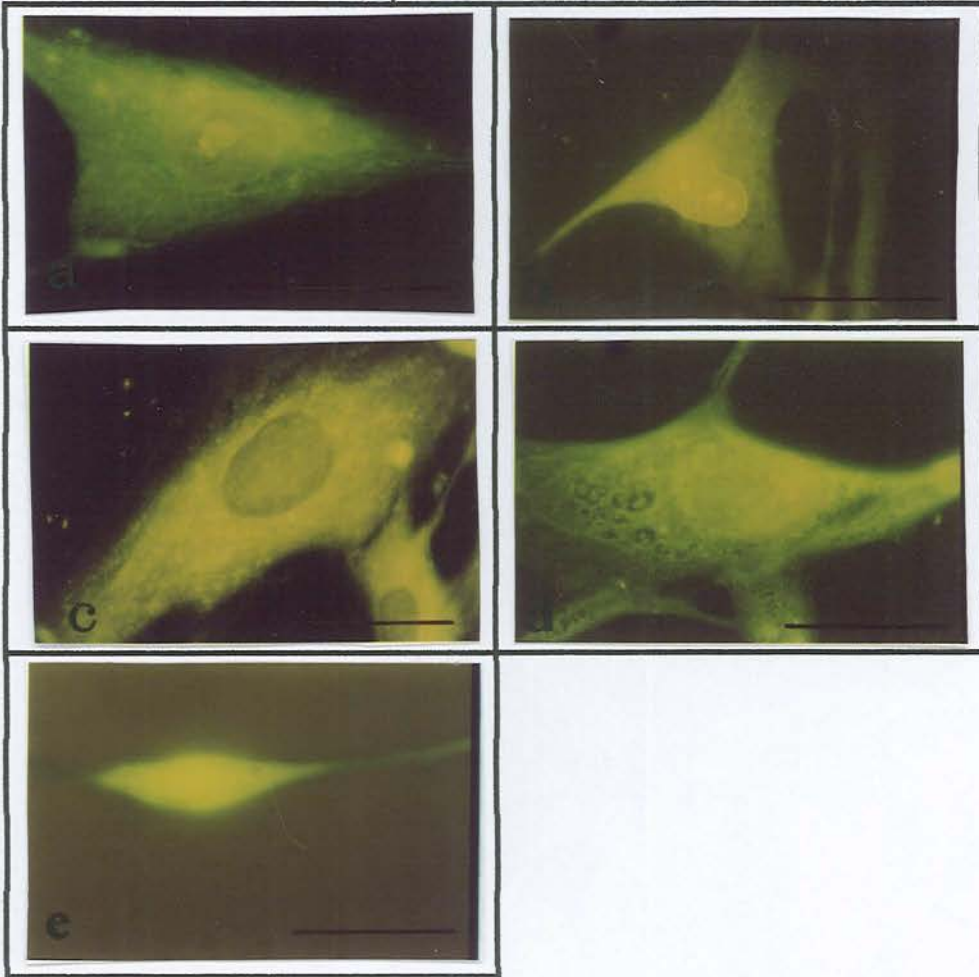
Negatif ve pozitif kontrol gruplarındaki HFL1 hücrelerinde aktin polimerlerinin düzenli demetler halinde olduğu, monomer aktin miktarının az olduğu belirlenmiştir (Şekil 9.18).

100 mM karvakrolün uygulandığı grupta, polimer aktin fibrillerinin sayısında azalma olduğu, bulutsu görünümdeki monomer aktinde artma olduğu gözlenmiştir (Şekil 9.18).

Karvakrolün 250 mM olarak uygulandığı grupta, diğer gruplarla karşılaştırıldığında monomer aktin oranının arttığı tespit edilmiştir.

500 mM karvakrolün uygulandığı grupta aktin monomerlerinin diğer gruplara göre azaldığı belirlenmiştir (Şekil 9.18).

Karvakrolün 1000 mM olarak uygulandığı grupta ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerde sitoplazma oranının çok azaldığı saptandığı için hücreler aktin iskeleti bakımından incelenmemişlerdir.



Şekil 9.19. HFL1 cell line hücrelerinin Alcianblue-Safranin boyama ile immünohistokimyasal görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

Alcianblue-Safranin boyama tekniği uygulanan HFL1 hücreleri aktin hücre iskeletleri ve salgı granülleri bakımından incelenmişlerdir.

Negatif kontrol grubunda salgı granülleri görölmektedir (Şekil 9.19).

Pozitif kontrol grubunda granül sayısında artış gözlenmiştir (Şekil 9.19).

100 mM karvakrol uygulanan HFL1 hücrelerinde granül sayısında artış saptanmış, granüllerin hücre içine dağılmış oldukları belirlenmiştir (Şekil 9.19)..

250 mM karvakrol uygulanan grupta, hücre içindeki granül sayısında azalmanın olduğu ve hücrede vakuol sayısında artış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 9.19).

Karvakrolün 500 mM olarak uygulandığı grupta çekirdek yoğunlaştığı için granüller görölememiştir (Şekil 9.19).

1000 mM karvakrolün uygulandığı grup sitoplazma oranı çok azaldığı için Alcianblue-Safranin boyama tekniğine göre incelenmemiştir.

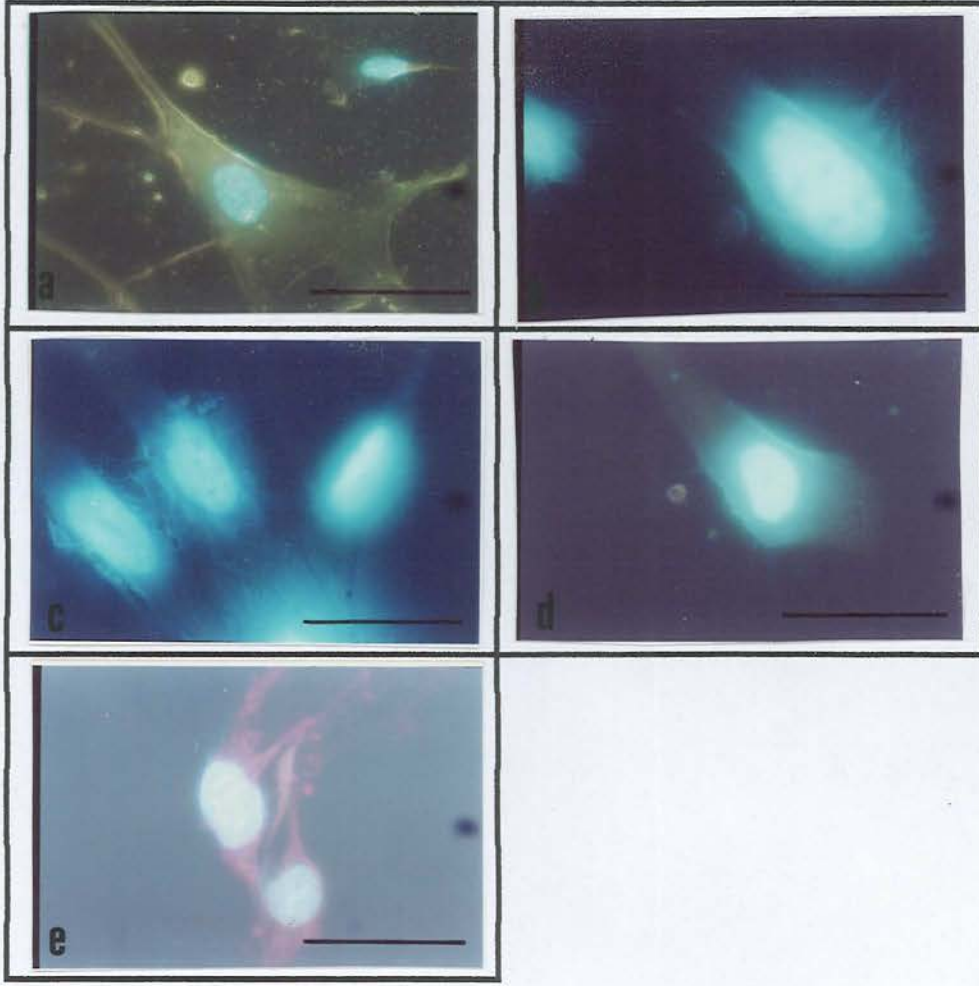
Karvakrolün bölünme ve fonksiyon özellikleri bakımından, HFL1 hücreleri üzerinde transformasyon meydana getirip getirmediğini araştırmak amacıyla DAPI boyası uygulanarak fluoresan mikroskobunda inceleme yapılmıştır.

Negatif ve pozitif kontrol grubundaki HFL1 hücrelerinin çekirdeklerinin yuvarlağa yakın oval biçimde olduğu ve kromatinin homojen dağılmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 9.20).

100 ve 250 mM karvakrol uygulanan HFL1 hücrelerinde çekirdeklerin tümünün oval olduğu ve kromatinin homojen dağılmış olduğu tespit edilmiştir.

500 mM karvakrol uygulanan grupta çekirdek içinde bir dalgalanmanın olduğu saptanmıştır (Şekil 9.20).

1000 mM karvakrolün uygulandığı grup sitoplazma oranı çok azaldığı için DAPI boyama tekniğine göre incelenmemiştir (Şekil 9.20).



Şekil 9.20. HFL1 cell line hücrelerinin DAPI ile boyanmış immünohistokimyasal görüntüleri. a) Negatif kontrol grubu, b) Pozitif kontrol grubu, c) 100 mM'lık karvakrol uygulanan grup, d) 250 mM'lık karvakrol uygulanan grup, e) 500 mM'lık karvakrol uygulanan grup. Ölçü birimi 125 μ m

9.2.5. Hücrelerin Toplam Protein Analizleri

9.2.5.1. A549 hücrelerinin toplam protein miktarlarının ölçümleri

Toplam protein analizlerinin yapılabilmesi için A549 hücreleri 5 gruba ayrılmışlardır. Negatif ve pozitif kontrol grupları, 100 mM, 250 mM ve 500 mM'lık karvakrol gruplarının Bradford yöntemine göre yapılan protein konsantrasyonu ölçümleri sonucunda elde edilen sonuçlar Çizelge 5'da görülmektedir.

Bu ölçümler sonucunda her iki hücre tipinde de 500 mM karvakrol uygulanan grupta protein miktarının azaldığı tespit edilmiştir.

A549 hücrelerinin jel elektroforezleri (SDS-PAGE) yapılmıştır.

Çizelge 9.5. A549 hücrelerinin spektrofotometrik protein ölçümleri

Örnekler	Protein ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Negatif Kontrol Grubu	26.2
Pozitif Kontrol Grubu	29.5
100 mM Doz Uyg. Grup	20.0
250 mM Doz Uyg. Grup	20.0
500 mM Doz Uyg. Grup	15.24



Şekil 9.21. A549 hücrelerinden elde edilen toplam protein ekstraktlarının SDS-poliakrilamid jel elektroforezinden sonra boyanarak bant örneklerinin gösterilmesi. 1. Moleküler ağırlık standardı, 2. 500 mM karvakrol uygulanan grup, 3. 250 mM karvakrol uygulanan grup, 4. 100 mM karvakrol uygulanan grup, 5. Pozitif kontrol grubu, 6. Negatif kontrol grubu. Sol taraftaki rakamlar kDa cinsinden moleküler standart proteinlerinin moleküler ağırlığını, sağ taraftaki rakamlara ise farklı proteinlerin bulunduğu moleküler ağırlıkları göstermektedir.

Negatif ve pozitif kontrol grupları ile karvakrol uygulanan gruplardaki A549 hücrelerinden ekstre edilen proteinler % 12'lik poliakrilamid jel üzerinde yürütülmüştür. Jel boyandıktan sonra incelendiğinde bu örnekler arasında protein bantlarında farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 9.21).

Şekil 9.21'de görüldüğü gibi 2. ve 3. sütunda 29.000 kDa 'nın altında A harfi ile işaretlenmiş bölümde bir bant görülmektedir. B ile gösterilen bantın ise 2. ve 3. sütunda kaybolduğu saptanmıştır. 29.000 kDa'nun üstünde 2. ve 3. sütunda C ile işaretlenen bantın bulunduğu diğerlerinde ise olmadığı belirlenmiştir. D ile işaretlenen bantın ise 2. ve 3. sütunda olmadığı tespit edilmiştir. E bantının ise 2. sütunda bulunduğu fakat diğer sütunlarda olmadığı görülmüştür. 54.000 kDa olarak belirlenen bantta 4. sütunda belirgin bir artışın olduğu saptanmıştır.

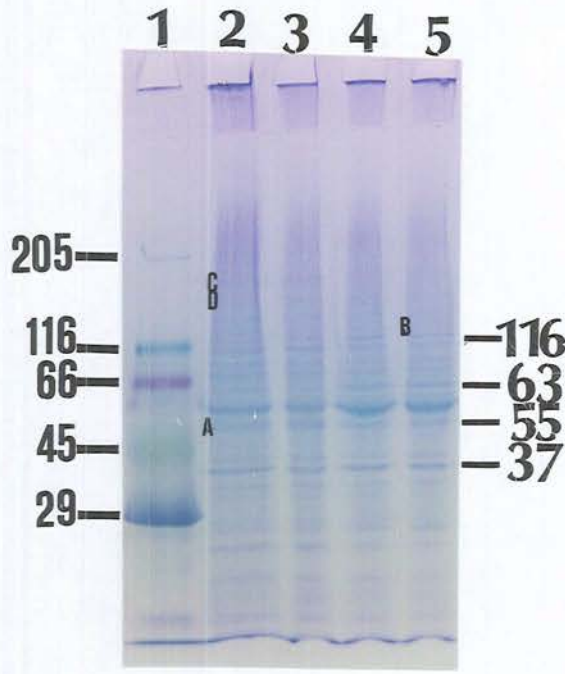
9.2.5.2. HFL1 hücrelerinin toplam protein miktarlarının ölçümleri

Çizelge 9.6. HFL1 hücrelerinin spektrofotometrik protein ölçümleri

Örnekler	Protein ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Negatif Kontrol Grubu	9.16
Pozitif Kontrol Grubu	8.98
100 mM Doz Uyg. Grup	9.16
250 mM Doz Uyg. Grup	7.59
500 mM Doz Uyg. Grup	4.35

Negatif ve pozitif kontrol grupları ile karvakrol uygulanan gruplardaki HFL1 hücrelerinden ekstre edilen proteinler % 12'lik poliakrilamid jel üzerinde yürütülmüştür. Jel boyanma işlemi tamamlanarak incelendiğinde bu örnekler arasında protein bantlarında farklılıklar gözlenmiştir (Şekil 9.21).

A ile işaretlenen bantta 2. ve 3. sütunda fazla bir artış olduğu saptanmıştır. B bandının ise 4. ve 5. sütunda olduğu, diğerlerinde bu bandın yok olduğu belirlenmiştir. C bandının ise 2. ve 3. sütunda bulunduğu tespit edilmiştir. D bandının ise 2., 3. ve 4. sütunda bulunduğu görülmüştür. 60.000 kDa olan bantın 4. ve 5. sütunda fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 9.22. HFL1 hücrelerinden elde edilen toplam protein ekstraktlarının SDS-poliakrilamid jel elektroforezinden sonra boyanarak bant örneklerinin gösterilmesi. 1. Moleküler ağırlık standardı, 2. Negatif kontrol grubu, 3. Pozitif kontrol grubu, 4. 100 mM karvakrol uygulanan grup, 5. 250 mM karvakrol uygulanan grup. Sol taraftaki rakamlar kDa cinsinden moleküler standart proteinlerinin moleküler ağırlığını, sağ taraftaki rakamlara ise farklı proteinlerin bulunduğu moleküler ağırlıkları göstermektedir.

10. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri en yaygın ve tüm kanserler arasında en yüksek ölüm oranına sahip olan kanserlerden biridir (Hirsch ve ark., 2001; Greenlee ve ark. 2000). Amerika Birleşik Devletleri'nde erkeklerde bu hastalığın insidansı azalırken, kadınlarda artmaya devam etmektedir (Khuder, 2001). Son zamanlarda adenokarsinoma olarak teşhis edilen akciğer tümörlerinin oranı artmıştır (Hoffman ve ark., 2000).

Fare ve sıçan gibi kemirici hayvanlar sınıfına giren deney hayvanları; tumor oluşumu için kısa süreye gereksinim duydukları, kolaylıkla bulunabildikleri ve beslenebildikleri için karsinojenite deneylerinde kullanılırlar. İnsanlarda kansere neden olan birçok karsinojen ve diğer kimyasallar deney hayvanlarında tumor oluşturur (Franks ve Teich, 1996). Bu özellikleri nedeniyle bu tez çalışmasında da sıçanlar kullanılmıştır.

Çalışmamızın başında ülkemizde de en çok görülen kanser tipi olması nedeniyle sağlam bir akciğerin kanserli hale geldiğinde alveoler yapısındaki değişiklikler daha sonra da verilen bitkisel bir ekstrakt ile bu alveoler yapıda değişikliğin meydana gelip gelmeyeceği araştırılmıştır. Bir çok araştırmacı tarafından kanserojen bir madde olarak tanımlanan ve gelişen teknolojinin sonucu olarak soluduğumuz havada ve sigara dumanında çok miktarda bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) sıçanlarda akciğer kanserinin oluşturulması için kullanılmıştır (El-Bayoumy, 1992; Pitot ve Dragan, 1996). Polisiklik aromatik hidrokarbon olarak DMBA sıçanlara enjekte edilmiş ve sıçanlarda akciğer kanserinin meydana geldiği morfolojik ve histolojik incelemeler sonrasında tespit edilmiştir. Histolojik incelemelerde, alveoler yapıda düzeni sağlayan tip II hücrelerinde artış olması ve tip I hücrelerinin sayısındaki azalma nedeniyle akciğerlerin alveoler yapısında bozulmaların meydana geldiği ve alveoler yapıda büzülme olduğu saptanmıştır.

Önce DMBA verilen bir ay sonra da karvakrol uygulanan ve ardından disekte edilen sıçanların akciğerlerinin alveoler yapılarında ve aynı şekilde karvakrol verildikten dört ay sonra disekte edilerek akciğerleri çıkarılan sıçanların alveoler yapılarında genişleme tespit edilmiş ve tip I hücrelerinin sayısında azalma olduğu gözlenmiştir. Akciğerin hasar gördüğü durumlarda tip II hücrelerinin mitotik aktivitelerinin fazlaştığı bilinmektedir. Tipik olarak, tip II pnömosit hücreleri, çoğalma kapasiteleri ve akciğerin hasar gördüğü durumlarda tip I hücrelerine farklılaşabilme yeteneğine sahip olmaları nedeniyle kök hücre gibi davranırlar (Swamidas ve ark., 1999). Tip I hücreleri alveolar yüzeylerin pek çoğunu

kaplamalarına rağmen çoğaldıklarına inanılmamaktadır. Bunun sonucu olarak, alveolar bütünlüğün korunmasında Tip II hücrelerinin önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır (Leiber ve ark.1976; Nardone ve Andrews, 1979; Umimo ve ark. 2000). Kanserli hale geldiklerinde sayılarında artış gözlenen fakat karvakrol verildikten sonra sayılarında düşüş olan ve tip I hücrelerini oluşturan tip II hücrelerinin akciğerin yapılan histolojik preparatlarında görülmesi diğer araştırmacıların bulgularını destekler nitelikte gözükmemektedir. Ayrıca, tip II pnömositler; solunumu kolaylaştıran ve alveolün yüzey tansiyonunu azaltan, fosfolipidler ve proteinlerden oluşan surfektantı üretir ve salgılarlar (Swamidas ve ark., 1999).

Hücre kültürleri biyolojik ve diagnostik, hücre farklılaşma olaylarının incelenmesi, onkojen maddelerin analizi, gen bankası çalışmaları ve hücre hareketlerinin incelenmesinde büyük önem taşımaktadır (Zeytinoğlu ve ark., 1993). Birkaç yıldan beri, in vitro hücre sistemleri, toksikolojik araştırmalar için kullanılmaktadır. Bu sistemler; hayvanlarla yapılan çalışmaların yerine geçmesi için kültür hücreleri üzerinde etkilerin değerlendirilmesine izin vermektedir.

Transformasyon, in vivoda tümör oluşumunda ulaşılan en son noktada meydana gelen hücresel olayların in vitrodaki karşılığı olarak düşünülür (Boschek ve ark. 1981). Kanser gelişmesi sırasında normal somatik bir hücre, çevresel ve kalıtsal olaylar nedeniyle kompleks çok basamaklı bir mekanizma ile malignant bir tümör hücresine transforme olur (Wijnhoven ve ark. 2001; Hemminki ve Mutanen, 2001). Neoplastik hücreler onkogenlerin ve tümör supressor genlerin ekspresyonunu ve fonksiyonunu etkileyen nokta mutasyonlarından kromozomal anormalliklere kadar çok sayıda genetik değişikliklere uğrarlar (Wijnhoven ve ark. 2001).

Hanahan ve Weinberg (2000) yüzden fazla değişik kanser tipinin çoğunda malignansi yolunda altı temel değişiklik olduğunu bildirmektedirler. Bunlar; büyüme sinyallerinden bağımsız olma, büyümeyi engelleyici sinyallere karşı duyarsızlık, programlanmış hücre ölümünden kaçma, sonsuz çoğalma potansiyeli, anjiogenezin devam ettirilmesi, doku istilası ve metastastır.

HFL1 ve A549 cell line hücreleri, hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılan hücrelerdir (Barile ve ark., 1992; Torres ve Horwitz, 1998; Grassi ve ark., 1999; Lehnert ve ark., 2001;). A549 hücreleri insan akciğer karsinomadan türeyen malignant bir hücre ırkıdır (Raghu ve ark., 1986). A549 hücreleri birçok önemli morfolojik ve biyokimyasal özellikleri bakımından Tip 2 hücrelerine benzerler ve bu nedenle insan kaynaklarından türerler ve kolayca kültür edilirler, yaygın olarak Tip 2 hücrelerinin modeli olarak kullanılırlar (Leiber ve

ark.1976; Nardone ve Andrews, 1979; Umimo ve ark. 2000). Son yıllarda akciğer adenokarsinomasında artış olması, çalışmanın histolojik bölümünü ile paralellik sağlaması ve tip II hücrelerinin modeli olarak *in vitro* çalışmalarda kullanılması nedeniyle A549 hücreleri *in vitro* çalışmalarda kullanılmak üzere seçilmiştir. Karvakrolün etkisinin normal akciğer hücresinde belirlenmesi amacıyla HFL1 hücreleri seçilmiştir.

CO25 hücreleri steroid bir hormon ile muamele edilerek transformasyonun gözlenebilmesi amacıyla, C2 hücreleri ise CO25 hücrelerinin kontrolü olarak seçilmişlerdir. A549 ve HFL1 hücrelerinin karvakrol ile muamele edilmesi sonucunda hücrelerde meydana gelen değişiklikler ile C2 ve CO25 hücrelerinin dexamethasone ile muamelesi sonucunda oluşan değişiklikler karşılaştırılmıştır. CO25 hücreleri dexamethasone ile muamele edildiklerinde çok tabakalı düzen gösteren koloniler oluşturmuşlardır. C2 hücrelerinde bu olay gözlenmemiştir. Karvakrol ile muamele edilen A549 ve HFL1 hücrelerinin tek tabakalı düzen gösterdikleri tespit edilmiştir.

A549 hücresi normal tek tabakalı bir kültürde epitel kökenli olması ile benzeşen poligonal bir şekle ve yaprak benzeri bir modele sahiptir (Umino ve ark. 2000). Dört gün boyunca gözlenen A549 hücrelerinin, negatif ve pozitif kontrol gruplarındaki A549 hücrelerinin bu özellikleri gösterdiği saptanmıştır.

Dört gün süresince özellikleri saptanmaya çalışılan HFL1 hücrelerinin fibroblast kökenli olması ile uyuşan iğsi bir şekle sahip olduğu belirlenmiştir.

C2 hücreleri %10 Horse serum, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin ve %9.2 NaHCO₃ içeren besiyeri ile dört gün boyunca kültüre edilmişler ve bunun sonucunda bu hücrelerde bir sağlıksızlaşmanın meydana geldiği görülmüştür.

CO25 hücreleri ise dexamethasone ile muamele edildiklerinde sahip oldukları *N-Ras* onkogeni yüzünden çok tabakalı hale gelerek koloni oluşturdıkları ve bu hücrelerde kanserleşmenin başladığı tespit edilmiştir.

Karvakrol, oregano ve kekikde doğal olarak meydana gelen essensiyel yağ fraksiyonlarında bulunan antimikrobiyal bir bileşiktir (Ultee ve Smida, 2001). Ethereal yağlar yada essensiyel yağlar olarak adlandırılan, uçucu yağlar genellikle çok çeşitli tipteki kimyasal bileşiklerin kompleks karışımlarından oluşur. Bu tipler içerisinde fenol en yaygındır. Karvakrol ve timol, bu fenollerin yaygın olarak bilinen örnekleridirler (Austgulen ve ark. 1987). Doğal antioksidantların, oksidatif stres tarafından meydana getirilen yaşlanma, dejeneratif hastalıklar ve kanser gibi hasarlardan organizmaları ve hücreleri korunma kapasitesi yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bitkiler ve baharatlar zararsız doğal antioksidan kaynaklarıdır.

Laminacea ailesinden olan baharatların antioksidan aktiviteleri Yanishlievaa ve ark. (1999) tarafından araştırılmıştır. Bu baharatlarda timol ve karvakrol bulunmaktadır.

Karvakrol önemli bir antioksidant aktivite göstermektedir (Milos ve ark. 2000). Anti mikrobiyal bir bileşik olması nedeniyle kanserli sıçanlara uygulanan karvakrolün, A549 ve HFL1 hücreleri üzerindeki morfolojik, immünohistokimyasal etkileri ve toplam protein miktarları araştırılmıştır.

Karvakrolün hücre sayıları üzerinde etkileri araştırılırken, 500 mM'lık dozun hücrelerin % 50'sinin yapıştıkları yüzeyden ayrılmasına, yüzeye yapışık kalan hücrelerin ise morfolojik ve immünohistokimyasal yapılarının değişikliğe uğramasına neden olduğu saptanmıştır. He ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada karvakrolün, B16 melanoma hücrelerinin sayısında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (He ve ark. 1997). Elde edilen sonuçlar He ve arkadaşlarının çalışmalarının sonuçları ile benzeşmektedir.

100 mM karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin morfolojik özelliklerinde bir değişme saptanamamıştır. Buna karşın 250 mM karvakrol uygulanan A549 hücrelerinin iğsi şekil kazandıkları gözlenmiştir. Umino ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları bir çalışmada uygulanan madde sonrasında hücrelerin iğ şekli kazandıkları ve mezenşim hücrelerine benzedikleri bildirilmektedir. Deney sonuçları bu araştırmacıların sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Helander ve ark. (1998) yapılan bir çalışmada karvakrolün; E.coli hücrelerinde hücre içi ATP içeriğini azaltırken aynı zamanda hücre dışı ATP'nin artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

A549 küçük hücreli olmayan akciğer kanserine ait bir hücre tipidir (NSCLC) ve NSCLC'ler epitelyal orijinli, yüzeye yapışma gösteren hücrelerdir (Salgia ve ark.1999). Stamatii ve ark. (1999) Hep-2 hücreleri üzerinde karvakrolün etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada karvakrolün; Hep-2 hücrelerinin bağlandıkları yüzeyden ayrılmasına, apoptotik fenotipin belirtileri olan bazı çıkıntılar ile düzensiz bir anormal bir şekil almasına ve hücrelerin nükleusların parçalara ayrılmasına (fragmentation) neden olduğunu saptamışlardır. 1000 mM'lık karvakrol uygulanan A549 ve HFL1 hücrelerinde yaklaşık olarak hücrelerin tümünün yapıştıkları zeminden ayrıldıkları belirlenmiştir. 500 mM'lık karvakrol dozunun hücre şeklinde ve hücre morfolojisinde değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir.

Ultee ve arkadaşları (1999) karvakrolün hücre membranını K^+ ve H^+ için geçirgen hale getirdiğini ve bunun sonucunda da proton hareket ettirici gücün yok olmasıyla ATP sentezinin engellendiğini bildirmişlerdir.

Hücre iskeleti, dinamik ve duyarlı bir sistemdir, madde ile indüklendikten sonra hücrede meydana gelen değişikliklerin incelenmesinde değerli bir morfolojik

parametre olarak gösterilmektedir (Kohler ve ark., 1994). Hücre iskeletinin; hücre şeklinde, hücre hareketinde, yüzeye-bağlı gelişmede, hücre yüzey proteinlerinin dağılımında, mitokondri ve poliribozomlar gibi organellerin hücre içindeki yerleşiminde görevi olduğu görülmektedir (Bernal ve ark. 1983).

Apoptosis ve programlanmış hücre ölümü; hücre büzülmesi, membran kabarcıklaşması, kromatin yoğunlaşması ve sonuçta 180 bp DNA merdivenleşmesine (tabakalaşma) neden olan internükleosomal DNA ayrılması olaylarını kapsayan hücrenin kendi kendini yok etmesi için enerjiye bağımlı olan aktif bir işlemdir (Kerr ve ark. 1994). Bu kriter apoptosisi nekrosisden yada mitotik katastroftan ayırır (Ianzini ve Mackey, 1997). Karvakrolün yüksek dozlarında, hücre şekillerinde bir büzülmenin ortaya çıkmasının apoptosisin bir belirtisi olabileceği düşünülmektedir.

Farklı hücre iskelet değişiklikleri malignant hücre transformasyonu ile bağlantılıdır ve ön teşhis faktörleri olarak kullanılırlar (Bichat ve ark.1997). Birçok antikanser ilacın etkisi, hücre morfolojisi ve hücre iskeleti üzerinde araştırma yapılarak incelenmektedir (Vilpo ve ark., 2000; Bursch ve ark., 2000).

Mikrotübüller, hücre iskeletinin temel filamentlerinden biridirler ve mitoz, hücre hareketi ve hücre içi transfer gibi biyolojik fonksiyonlarda rol oynarlar. Bu nedenle, mikrotübüller kanser kemoterapisi için en önemli moleküler hedeflerden biri olarak düşünülmürler. Tubulin temel mikrotubuler bileşenlerden birisidir, tubulinin polimerizasyonu ve depolimerizasyonu mikrotübüler dinamikleri düzenler (Fukuoka ve Saijo, 1997).

İlaçlar mikrotübüllerin polimerizasyonunu etkiler. Anti-mikrotübül ilaçlar doğal ve sentetik kaynaklardan izole edilirler. Klinik olarak önemli paclitaxel (taxol) ve vinca alkaloidleri (vinblastin, vinkristine) epothilone, discodermolide, nokadozole ve kolsijin anti-mikrotübül ilaçlardır. Yüksek konsantrasyonlarda taxol, epothilone ve discodermolide mikrotübülleri stabil (sabit) tutarlar fakat diğer ilaçlar mikrotübülleri sağlamlaştıramazlar (destabil). Bu ilaçların doğrudan doğruya biyokimyasal hedefinin serbest tubulin yada biraradaki mikrotübüller olduğu saptanmıştır. Anti-mikrotübül ilaçların düşük konsantrasyonlarda hücre iskeletinin mikrotübül yapısının tümünü etkilemedikleri fakat kültür ortamında hücreler üzerinde çoğalmayı engelleyici etkisi bildirilmiştir. Taxol ve vinca alkaloidleri düşük konsantrasyonlarda mikrotübüllerin (+) ucunda polimer dinamiklerini baskılar oysa yüksek konsantrasyonlarda mikrotübüllerin üzerinde ters etkileri vardır. Düşük konsantrasyonlarda taxol, çok çekirdekli hücreleri oluşturur (Sorger ve ark. 1997). Doğa, ya tubulinin polimerizasyonunu engelleyen yada mikrotübüllerin parçalanmamasını sağlayan birçok ajan sağlar. Bu ajanların bazıları

antikanser ilaçları olarak kullanılmaktadır fakat uygulamalara karşı direnç kazanılmıştır (VonAngerer, 2000). Zhang ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan bir çalışmada antikanser ilaç adaylarının tubulinin polimerizasyonunu engellediği görülmüştür.

Akciğer kanserinde, transformasyonda önemli rol oynayan aktin hücre iskeletinin yapısında anormallikler gözlenebilir. Ras, Myc, Bcl-2 ve c-Erb-2 gibi onkogenlerde ve Rb, p53, p16^{INK4A} gibi tümör supressor genlerdeki anormallikler akciğer kanserinin patolojisine katkıda bulunabilir. Akciğer kanserindeki anormallikler, hücre iskeleti ve hücre iskeletine bağlı proteinlerde değişikliklere de neden olabilir (Salgia ve ark., 1999).

Hücre iskeleti birçok bölümden oluşur ve aktin hücre iskeleti, hücre şeklinin düzenlenmesine, hücre hareketine ve adezyona katılır. Hücre iskelet fonksiyonlarının bozulması transformasyona yol açar (Salgia ve ark., 1999). Transforme ve malignant hücrelerdeki değişmiş hücre morfolojisi genellikle aktine-bağlı proteinlerin azalması ile beraber olur. Aktin oluşumunu kontrol eden çok sayıda protein, aktin ağlarının kesinlikle hücre hareketi ve farklılaşması sırasında düzenlendiği izlenimini verir. Aktine-bağlı proteinlerin bazılarının seviyeleri neoplastik hücrelerde azalır ve bazı durumlarda hücre transforme olmamış fenotipe geri döndüğünde artar (Janmey ve Chaponnier, 1995).

Hücre transformasyonu süresince, hücre iskeleti organizasyonunda ve hücre iskeletini oluşturan çeşitli kısımlar arasındaki karşılıklı etkileşimde büyük değişiklikler meydana gelir. Mikrotübüller ve intermediate filamentler arasındaki etkileşim bozulur. Fakat iyi gelişmiş mikrotübüller ve intermediate filament sistemleri birçok transforme olmuş hücrede mevcuttur. Tümör hücrelerinde varlıklarını koruyan intermediate filamentlerin doku türünün saptanması, cerrahi patoloğlar için tümörlerin tespiti ve sınıflandırılmasında son derece faydalı bir araç olduğu ispatlanmıştır. Buna karşılık, tümör hücrelerinde mikrofilamentlerin organizasyonunda ve onlarla bağlantılı proteinlerde göze çarpan değişiklikler saptanmıştır. Bunlar adhezyon plağının düzeninin ve öğelerinin bozulmasını içerir ki bu, hücre yüzeyi fibronektinin salınması, azalan adhezyon, daha yuvarlak hücre morfolojisi ve aktinin membrana bağlanmaktaki yetersizliği ve sonuçta "stres fiberlerinin" kaybına neden olur (Ben-Ze'ev, 1985).

Onkogenlerdeki ve tümör supressor genlerdeki anormallikler sonuçta hücre iskeletinde anormalliklere neden olur. Hücre iskeletindeki anormallikler akciğer kanserinin karsinogenezinde çok önemlidir (Salgia ve ark., 1999)

Göç, membran kırışması, lamellipodia ve filopodia teşekkülü olarak adlandırılan hücre hareketi akciğer kanser cell line hücrelerinde paxillinin aşırı

sentezi ile inhibe edilir. Hücre iskeleti hücre hareketinde çok önemlidir. Lamellipodia ve filopodiadaki aktin hücre iskeletinin bozulması ve yeniden oluşması bazal membran boyunca hücrenin hareketine yardım eder. Normal hücrelerde, hücre iskeleti çok sabittir ve hücre hareketi yavaştır. Kanserli hücrelerde, hücre iskeleti, hücrenin hareketindeki artış nedeniyle bozulur. Normal hücreler membrana sıkıca bağlanır ve bir yerden kalırken, kanserli hücrelerde ise normal hücre iskeletinin kaybolması nedeniyle bazal membran boyunca hareketlerinde artış olacaktır. Önceki çalışmalarda metastaz yapan akciğer kanserlerinde, hücre iskeletinin düzenlenmesinde F-aktin (fibröz) miktarının azalması ve hücre iskeletinin bütünlüğünün bozulması şeklinde değişiklikler olduğu bulunmuştur. F-aktin hücrenin periferinde toplanır ve bazı dışı doğru büyümelerde görülür. Metastaz yapan hücreler kümeler oluşturma eğilimindedirler ve hücre-hücre etkileşimi göstermezler, bu özelliklerde normal hücre fonksiyonlarının tersinedir. NSCLC'deki yapışkan epitel hücrelerde paxillinin aşırı sentezinin hareketin azalmasına ve morfolojinin değişmesine neden olduğu gözlenmiştir (Salgia ve ark.1999).

Paxillin kanserli hücreleri metastazdan alıkoymaktadır(Salgia ve ark.1999).

Hücre transformasyonu sırasında F-aktin (fibröz aktin) filamentlerinin konsantrasyonunda bir azalma olduğu Auvinen (1997) tarafından yapılan araştırmada belirtilmiştir.

Çalışmamızda karvakrolde doz artışı olduğunda A549 (kanserli akciğer hücre tipi) hücrelerinde, tubulin ve aktin hücre iskeletlerinde bozulmaların meydana gelmesi ile karvakrolün kanserli hücreler üzerinde etkin olduğu sonucuna varılmıştır. Başka hücre tipleri kullanılarak karvakrolün benzer etkiyi bu hücrelerde de gösterip göstermeyeceği araştırılmalıdır.

Alcianblue-Safranin boyama yöntemi genellikle salgı üreten hücrelere uygulanmasının yanısıra kası sarı renkte boyamaktadır (Bancroft ve Stevens, 1977). Kası sarı renkte boyadığı için aktin hücre iskeleti ve salgı granülleri hakkında bilgi verebileceği düşünülerek bu boyama yöntemi A549 hücrelerine uygulanmıştır. 100 mM ve 250 mM'lık karvakrol dozları bu hücrelere uygulandığında sitoplazmada salgı granülü olabileceği düşünülen granüllerin sayısında artış gözlenmiştir. Bu hücreler tip II'ye model oldukları için salgı yapmaya devam ediyorlar diyebiliriz. Kanserli hücreler fizyolojik olarak aktivite göstermezler, 100 mM ve 250 mM karvakrol uygulanan hücrelerde salgı salgılamak anlamında biyolojik aktivitenin az olsa olduğu sonucuna varılmıştır. Hücre şeklinin tam küresel olmaması da bunu desteklemektedir. .

A549 ve HFL1 hücreleri DAPI ile boyanarak bölünme ve fonksiyon değişiklikleri yönünden incelenmişlerdir. Bu hücrelerde DAPI boyamasının sonucunda çok parçalı kromatin yoğunlaşmasının olduğu gözlenmiştir. Mitotik aktivite tespit edilememiştir.

Karvakrolün hücrelere uygulanabilmesi için çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. Pozitif kontrol grubundaki A549 hücrelerinde çekirdek şeklinin yuvarlak biçim almaya başlaması hücre sayımlarındaki artış ile örtüşmektedir. HFL1 hücrelerinin pozitif kontrol gruplarının sayımlarında düşüşün saptanması, bu hücrelerin fetustan alınarak üretilen hücreler olması sebebiyle olabileceği düşünülmektedir.

Anormal çekirdek yapıları ve hücresel yapılar malignant transformasyonun özellikleridir. Hücre şekli; ekstraselüler matriks, hücre iskeleti ve nükleer matriksi içeren dinamik bir doku matriksi tarafından düzenlenir. Mekanik ve kimyasal sinyaller nükeusa ulaşarak genlerin üç boyutlu kromatin organizasyonunda değişikliklere neden olurlar (Holth ve ark.1998).

Günümüzde kanseri tedavi metodları radyasyon ve kemoterapidir (Schiller, 1998). Radyasyon ve kemoterapi uygulamaları sırasında kanserli hücrelerin yanısıra sağlam hücreler de zarar görmektedir. Sağlam hücrelere en az zarar verecek şekilde kanserli hücrelerin yok edilmesini sağlamak üzere yeni araştırmaların yapılması gerektiğine inanılmaktadır. Bitkisel ekstraktların da bu amaçla kullanılabileceği düşünülmektedir.

Chiou ve Wu (1999) tarafından yapılan çalışmada sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) temel elektroforetik tekniklerden biri olarak kabul edilmektedir. Rao ve arkadaşları (2001) tarafından yapılan çalışmada da toplam hücre ekstraktları SDS-PAGE ile çözümlenmiştir.

A549 ve HFL1 cell line hücrelerinden elde edilen protein ekstratları, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yapılarak incelendiğinde, moleküler ağırlıklarına bağlı olarak proteinlerin bantlanma örneklerinde farklılıklar bulunmuştur.

Boyanmış protein bantları incelendiğinde, birçok farklı moleküler ağırlıkta bantların bulunduğu görülmüştür. Kullanılan bu yöntemde, proteinler moleküler ağırlıklarına göre jel üzerinde ayrıldıkları için aynı moleküler ağırlığa sahip ama farklı proteinler gözlenmeyebilir. Bu durumda ise daha ayrıntılı analizler için iki boyutlu jel elektroforezinin kullanılması önerilmektedir (Klemenz ve ark., 1989; Hames ve Rickwood, 1990). Protein analizi seviyesinde, farklılıkların araştırılması için ilk etapta yapılabilecek basit ve analiz hassasiyeti çok fazla olan SDS-poliakrilamid jel elektroforez yöntemini kullanmak uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- AKAY, M.T., *Sitoloji*, İmaj Yayınevi, Ankara, Türkiye, 137 (1996).
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. ve WATSON, J.D., *Molecular biology of the cell*, 2nd ed., Garland Publishing Inc., New York, USA (1989).
- ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. ve WALTER, P., *Essential cell biology, an introduction to the molecular biology of the cell*, Garland Publishing Inc., New York, USA (1998).
- AMES, B.N. ve GOLD, L.S., *Environmental pollution, pesticides, and the prevention of cancer: misconcepts*. FASEB Journal **11**: (13), 1041-1052 (1997).
- ANDERSON, D.C., HUGHES, B.J., WIBLE, L.J., PERRY, G.J., SMITH, C.W. ve BRINKLEY, B.R., *Impaired motility of neonatal PMN leukocytes: relationship to abnormalities of cell orientation and assembly of microtubules in chemotactic gradients*, J. Leukoc. Biol., **36**, 1-15 (1984).
- ANONYMOUS, *American Type Culture Collection (ATCC) Media Handbook*, ATCC Publication, rockville, USA, 84 (1984).
- AUSTGULEN, L-T., SOLHEIM, E. ve SCHELINE, R.R., *Metabolism in rats of p-Cymene derivatives: carvacrol and thymol*, Pharmacology-Toxicology, **61**, 98-102 (1987).
- AUVINEN, M., *Cell transformations, invasion, and angiogenesis: a regulatory role for ornithine decarboxylase and polyamines?*, Journal of the National Cancer Institute, **89**: (8), 533-537 (1997).
- AYDIN, S., *Kekik (Origanum onites L.) Yağ-Altı-Suyunun Farmakolojisi*, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 229 (1996).
- BANCROFT, J.D. ve STEVENS, A., *Theory and practice of histological techniques*, Churchill Livingstone, Edinburg, UK (1977).
- BARBACID, M., *Ras genes*, Annu. Rev. Biochem., **56**, 779-827 (1987).
- BARILE, F.A., ARJUN, S. ve SENECHAL, J-J, *Paraquat alters growth, DNA and protein synthesis in lung epithelial cell and fibroblast cultures*, Alternatives to Laboratory Animals, **20**, 251-257 (1992).
- BAYTOP, T., *Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi Geçmişte ve Bugün*, İlaveli İkinci Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye, 253 (1999).
- BEARDSLEY, T., *Testing, testing*, Scientific American, **274**: (6), 38-39 (1996).
- BELLAMY, C.O.C., MALCOMSON, R.D.G., HARRISON, D.J. ve WYLLIE, A.H., *Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis*, Seminars in Cancer Biology, **6**, 3-16 (1995).
- BEN-ZE'EV, A., *The cytoskeleton of cancer cells*, Biochimica et Biophysica Acta: Gene and Expression, **780**, 197-222 (1985).

KAYNAKLAR (Devam)

- BERNAL, S.D., BAYLIN, S.B., SHAPER, J.H., GAZDAR, A.F. ve CHEN, L.B., *Cytoskeleton-associated proteins of human lung cancer cells*, Cancer Research, **43**, 1798-1808 (1983).
- BICHAT, F., MOUWAD, R., SOLIS-RECENDEZ, G., KHAYAT, D. ve BASTIAN, G., *Cytoskeleton alteration in MCF7R cells, a multidrug resistant human breast cancer cell line*, Anticancer Research, **17**, 3393-3401 (1997).
- BINKOVA, B., GIGUERE, Y., RÖSSNERJR, P., DOSTAL, M. ve J.RAM, R., *The effect of dibenzo(a,l)pyrene and benzo(a)pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21WAF1 proteins and cell cycle distribution*, Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, **471**: (1-2), 57-70 (2000).
- BISHOP, J.M., *The molecular genetics of cancer*, Science, **235**, 305-311 (1987).
- BISHOP, J.M., *Molecular theories in oncogenesis*, Cell, **64**, 235-248 (1991).
- BORING, C.C., SQUIRES, T.S., TONG, T. ve MONTGOMERY, S., *Cancer statistics*, Cancer J Clin, **44**, 7-26 (1994).
- BOSCHEK, C.B., JOCKUSCH, B.M., FRIIS, R.R., BACK, R., GRUNDMANN, E. ve BAUER, H., *Early changes in the distribution and organization of microfilament proteins during cell transformation*, Cell, **24**, 175-184 (1981).
- BRACHET, J., *Molecular Cytology*, Vol I The cell cycle, Academic Press Inc., New York, USA, 424 (1985).
- BRACHET, J., *Molecular Cytology*, Vol II Cell interactions, Academic Press Inc., New York, USA, 512 (1985).
- BRADFORD, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Analytical Biochemistry, **72**, 248-254 (1976).
- BREUL, S.D., BRADLEY, K.H., HANCE, A.J., SCHAFER, M.P., BERG, R.A. ve CRYSTAL, R.G., *Control of collagen production by human diploid lung fibroblasts*, The Journal of Biological Chemistry, **255**: (11), 5250-5260 (1980).
- BUENDIA, B., BRE, M.H., GRIFFITHS, G. ve KARSENTI, E., *Cytoskeletal control of centrioles movement during the establishment of polarity in Madin-Darby Canine kidney cells*, J. Cell Biology, **110**, 1123-1135 (1990).
- BURSCH, W., HOCHEGGER, K., TOROK, L., MARIAN, B., ELLINGER, A. ve HERMANN, R.S., *Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments*, Journal of Cell Science, **113**: (7), 1189-1198 (2000).
- CARNEY, D., GAZDAR, A.F., BEPLER, G., GUCCION, J.G., MARANGOS, P.J., MOODY, T.W., ZWEIG, M.H. ve MINNA, J.D., *Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features*, Cancer Research, **45**, 2913-2923 (1985).

KAYNAKLAR (Devam)

CASTELL, J.V. ve GOMEZ-LECHON, M.J., *In Vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, San Diego, USA, 467 (1997).

CHIOU, S.H. ve WU, S.H., *Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology*, *Analytica Chimica ACTA*, **383**: (1-2), 47-60 (1999).

CHITRA, C.K., VISHWANATHAN, H., DEEPA, E. ve USHA-RANI, M.W., *Cytogenetic monitoring of men occupationally exposed to airborne pollutants*, *Environmental Pollution*, **112**: (3), 391-393 (2001).

CLARK, G., *Staining Procedures*, 4th edition, William-Wilkins, London, UK (1981).

CLARKE, R.M., LUND, E.K., JOHNSON, I.T. ve PINDER, A.C., *Apoptosis can be detected in attached colonic adenocarcinoma HT29 cells using annexin-v binding, but not by TUNEL assay or sub-GO DNA content*, *Cytometry*, **39**, 141-150 (2000).

CLYNES, M., *Animal cell culture techniques*, Springer Lab Manual (1998).

CRISS, W.E. ve BAYSAL, E., *Kanserden Korunmak İçin Beslenme Rehberi*, Hatiboğlu Basımevi, Ankara, Türkiye, 72 (1999).

CROWELL, R.E. ve BELINSKY, S.A., *Genetic changes in lung cancer: potential biomarkers for early detection and prevention*, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, **130**: (6), 550-557 (1997).

COOK, J.S., *Physiological cell death*, *News in Physiological Sciences*, **9**, 2 (1994).

COTTER, T.G., LENNON, S.V., GLYNN, J.M. ve GREEN, D.R., *Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis*, *Cancer Research*, **52**, 997-1005 (1992).

COWELL, J.K., *Molecular genetics of cancer*, Bios Scientific Publishers (1995).

CUNNINGHAM, C.C., *Actin structural proteins in cell motility*, *Cancer ve Metastasis Reviews*, **11**, 69-77 (1992).

DANCEY, J. ve LE CHEVALIER, T., *Non-small cell lung cancer: an overview of current management*, *European Journal of Cancer*, **33**: (1), 2-7 (1997).

DEVEREUX, T.R., TAYLOR, J.A. ve BARRETT, J.C., *Molecular mechanisms of lung cancer-interaction of environmental and genetic factors*, *Chest*, **109**: (3), 14-19 (1996).

DINGEMANSA, A.M.C., VAN ARK-OTTEA, J., SPANA, S., SEAGLIOTTID, G.V., VAN DER VALKE, P., POSTMUSB, P.E. ve GIACCONE, G., *Topoisomerase II and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer*, *Lung Cancer*, **32**: (2), 117-128 (2001).

KAYNAKLAR (Devam)

DUNBER, B.S., *Protein Blotting A Practical Approach*, Oxford University Press (1994).

DUSTIN, P., *Microtubules*, Springer, Berlin, Almanya (1978).

EL-BAYOUMY, K., *Environmental carcinogens that may be involved in human breast cancer etiology*, Chem. Res. Toxicol., **5**, 585-590 (1992).

ERBENGİ, T., *Histoloji 2*, 2. baskı, Güneş Kitabevi, Ankara (1990).

FANG, K.M., ZIMMERMAN, P.V. ve SMITH, P.J., *Lung pathology: the molecular genetics of non-small cell lung cancer*, Pathology, **27**: (4), 295-301 (1995).

FAWCETT, D.W., *A textbook of histology*, 11th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA (1986).

FRANKS, L.M. ve TEICH, N.M., *Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 3 rd Edition, Oxford University Press, 458 (1996).

FRESHNEY, R.I., *Animal Cell Culture*, I.R.L. Press Oxford Washington, USA, 248 (1989).

FRESHNEY, R.I., *Culture of Animal Cells*, 3rd Edition, John Wiley and Sons Inc. Publication, New York, USA, 486 (1994).

FUKUOKA, K. ve SAIJO, N., *Antimitotic agents*, Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy, **24**: (11), 1519-1525 (1997).

GAZDAR, A.F., *Molecular markers for the diagnosis and prognosis of lung cancer*, Cancer, **69**, 1592-1599 (1992).

GRASSI, M., MOENS, G., ROUSSELLE, P., THIERY, J.P. ve JOUANNEAU, J., *The SLF activity secreted by metastatic carcinoma cells is related to laminin 5 and mediates cell scattering in an integrin-independent manner*, Journal of Cell Science, **112**: (15), 2511-2520 (1999).

GREENLEE, R.T., MURRAY, T., BOLDEN, S. ve WINGO, P.A., *Cancer statistics*, CA Cancer J. Clin, **50**, 7-33 (2000).

GOSSET, L.A., ZHANG, W. ve OLSON, E.N., *Dexamethasone-dependent inhibition of differentiation of C2 myoblasts bearing steroid inducible N-ras oncogene*, Journal of Biological Chemistry, **106**, 2127-2137 (1988).

GUENTHER E., *The Essential Oils*, Volume Two, The Constituents of Essentials Oils, Robert E. Krieger Publishing Company Huntington, New York, USA, 503 (1975).

HACIHANEFİOĞLU, U., *Akciğer Hastalıkları Patolojisi*, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, Türkiye, 302 (1993).

HAMES, B.D. ve RICKWOOD, D., *Gel electrophoresis of proteins*, 2nd ed., IRL Press, Washington, USA (1990).

KAYNAKLAR (Devam)

HANAHAN, D. ve WEINBERG, R., *The hallmarks of cancer*, Cell, **100**, 57-70 (2000).

HARRIS, C.C., *Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s*, Cancer Research, **51** (Suppl.), 5023-5044 (1991).

HE, L., MO, H., HADISUSILO, S., QURESHI, A.A. ve ELSON, C.E., *Isoprenoids suppress the growth of murine B16 melanomas in vitro and in vivo*, American Society for Nutritional Sciences, **127**: (5), 668-674 (1997).

HECHT, S.S., *Tobacco smoke carcinogens and lung cancer*, Journal of National Cancer Institute, **91**: (14), 1194-1211 (1999).

HELANDER, I.M., ALAKOMI, H-L., LATVA-KALA, K., MATTILA-SANDHOLM, T., POL, I., SMID, E.J., GORRIS, L.G.M. ve VON WRIGHT, A., *Characterisation of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria*, J. Agric. Food Chem., **46**, 3590-3595 (1998).

HEMMINKI, K. ve MUTANEN, P., *Genetic epidemiology of multistage carcinogenesis*, Mutation Research, **473**, 11-21 (2001).

HIRSCH, F.R., FRANKLIN, W.A., GAZDAR, A.F. ve BUNN, P., *Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology*, Clin. Cancer Res., **7**: (1), 5-22 (2001).

HOFFMAN, P.C., MAUER, A.M. ve VOKES, E.E., *Lung cancer*, Lancet, **355**: (9202), 479-485 (2000).

HOFFMANN, D., HECHT, S.S. ve WYNDER, E.L., *Tumor promoters and cocarcinogens in tobacco carcinogenesis*, Environ Health Perspect, **50**, 247-257 (1983).

HOLTH, L.T., CHADEE, D.N., SPENCER, V.A., SAMUEL, S.K., SAFNECK, J.R. ve DAVIE, J.R., *Chromatin, nuclear matrix and the cytoskeleton: role of cell structure in neoplastic transformation*, Int. J. Oncol., **13**: (4), 827-837 (1998).

HONMA, M., HAYASHI, M., OHNO, T., MIZUSAWA, H., SAIJO, K. ve SOFUNI, T., *Heterogeneity of the Y chromosome following long-term culture of the human lung cancer cell line A549*, In Vitro Cellular and Developmental Biology, **32**, 262-264 (1996).

HUOBER, J.B., NAKAMURA, S., MEYN, R., ROTH, J.A. ve MUKHOPADHYAY, T., *Oral administration of an estrogen metabolite-induced potentiation of radiation antitumor effects in presence of wild-type p53 in non-small-cell lung cancer*, International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, **48**: (4), 1127-1137 (2000).

IANZINI, F. ve MACKEY, M.A., *Spontaneous premature chromosome condensation and mitotic catastrophe following irradiation of HeLa S3 cells*, Int. J. Radiat. Biol., **72**, 409-421 (1997).

KAYNAKLAR (Devam)

IARC/NCI/EPA Working Group, *Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols*, Cancer Research, **45**, 2395-2399 (1985).

JAKOBY, B.W. ve PASTAN, H.I., *Cell Culture*, Academic Press Ltd, San Diego, USA, 642 (1979).

JANMEY, P.A. ve CHAPONNIER, C., *Medical aspects of the actin cytoskeleton*, Current Opinion in Cell Biology, **7**: (1), 111-117 (1995).

JONES, D.R., BROAD, M., MADRID, L.V., BALDWIN, A.S. ve MAYO, M.W., *Inhibition of NF-B sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis*, The Annals of Thoracic Surgery, **70**: (3), 930-936 (2000).

JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. ve KELLEY, R.O., *Temel histoloji*, Çev ed.: Yener Aytekin, Barış Kitabevi, İstanbul, Türkiye (1993).

KARP, G., *Cell and molecular biology, concepts and experiments*, 2nd edition, John Wiley Sons Inc., New York, USA (1999).

KERR, J.F.R., WINTERFORD, C.M. ve HARMON, B.V., *Apoptosis: its significance cancer and cancer therapy*, Cancer, **73**, 2013-2026 (1994).

KHUDER, S.A., *Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis*, Lung Cancer, **31**:(2-3), 139-148 (2001).

KLEMENZ, R., HOFFMANN, S., JAGGI, R. ve WERENSKIOLD, A-K., *The v-mas and c-Ha-ras oncoproteins exert similar effects on the pattern of protein synthesis*, Oncogene, **4**, 799-803 (1989).

KOHLER, M., AUFDERHEIDE, M. ve RAMM, D., *Method for the description of differences in the filamentous structure of the cytoskeleton in cultured cells*, Toxicology Letters, **72**, 33-42 (1994).

KOHLERT, C., VAN RENSEN, I., MARZ, R., SCHINDLER, G., GRAEFE, E.U. ve VEIT, M., *Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans*, Planta Medica, **66**: (6), 495-505 (2000).

KOPTAGEL, E., *Histoloji-embriyoloji laboratuvar kılavuzu*, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Basımevi, Sivas (1993).

KURODAA, Y. ve HARAB, Y., *Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols*, Mutation Research / Reviews in Mutation Research, **436**: (1), 69-77 (1999).

KUZNETSOV, D.V. ve BLOKHIN, A.V., *Cell proliferation in normal and malignant transformed cells: thermodynamic model of signal transduction*, Physical Review Letters, **85**: (13), 2833-2836 (2000).

LACKIE, J.M. ve DOW, J.A.T., *The dictionary of the cell biology*, Academic Press Inc., San Diego, USA, 262 (1989).

KAYNAKLAR (Devam)

- LANDIS, S.H., MURRAY, T., BOLDEN, S. ve WINGO, P.A., *Cancer statistics*, CA Cancer J. Clin., **49**, 8-31 (1999).
- LEIBER, M., SMITH, B., SZAKAL, A., NELSON-REES, W. ve TODARO, G., *A continuous human cell line from a human lung carcinoma with properties of Type II alveolar epithelial cells*, Int. J. Cancer, **17**, 62-70 (1976).
- LEHNERT, N.M., GARY, R.K., MARRONE, B.L. ve LEHNERT, B.E., *Inhibition of normal human lung fibroblast growth by beryllium*, Toxicology, **160**: (1-3), 119-127 (2001).
- LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A., ZIPURSKY, S.L., MATSUDAIRA, P. ve DARNELL, J., *Molecular cell biology*, 3rd Edition, Scientific Amerikan Books, New York, USA, 1344 (1995).
- LOZA-TAVERA, H., *Monoterpenes in essential oils: biosynthesis and properties*, Advances in Experimental Medicine and Biology, **464**, 49-62 (1999).
- MACDONALD, F. ve FORD, C.H.J., *Molecular biology of cancer*, Bios Scientific Publishers, 218 (1997).
- MARO, B., GUETH-HALLONET, C., AGHION, J. ve ANTONY, C., *Cell polarity and microtubule organization during mouse embryogenesis*, Dev. Supp., **1**, 17-25 (1991).
- MELLENDEZ-COLON, V.J., LUCH, A., SEIDEL, A. ve BAIRD, W.M., *Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures*, Chem Res Toxicol, **13**: (1), 7-10 (2000).
- MILOS, M., MASTELIC, J. ve JERKOVIC, I., *Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from Oregano (Origanum vulgare l. ssp. hirtum)*, Food Chemistry, **71**: (1), 79-83 (2000).
- MINNA, J.D., *The molecular biology of lung cancer pathogenesis*, Chest, **103**: (4), 449-456 (1993).
- MÖLLER, W., KREYLINGA, W.G., KOHLHAUFLB, M., HAUSSINGERB, K. ve HEYDERA, J., *Macrophage functions measured by magnetic microparticles in vivo and in vitro*, Journal of Magnetism and Magnetic Materials, **225**: (1-2), 218-225 (2001).
- MURATHANOĞLU, O., *Histoloji*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul (1996).
- NARDONE, L.L. ve ANDREWS, S.B., *Cell line A549 as a model of the Type II pneumocyte-phospholipid biosynthesis from native and organometallic precursors*, Biochem. Biophys. ACTA, **573**, 276-295 (1979).
- OAKLEY, C. ve BRUNETTE, D.M., *The sequence of alignment of microtubules, focal contacts and actin filaments in fibroblasts spreading on smooth and grooved titanium substrata*, J. Cell Sci., **106**, 343-354 (1993).

KAYNAKLAR (Devam)

OZBAN, N., *Hücre*, 2.Baskı, İstanbul Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi Basımevi, 283 (1988).

ÖZYARDIMCI, N., *Nonspesifik akciğer hastalıkları*, Cilt I solunum sistemi-hastalıklar, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, Türkiye (1999).

ÖZYARDIMCI, N., *Nonspesifik akciğer hastalıkları*, Cilt II akciğer hastalıklar, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa, Türkiye (1999).

PAUWELS, E.K.J., RIBEIRO, M.J., STOOOTH, J.M.M.B., MCCREADY, V.R., BOURGUIGNON, M. ve MAZIERE, B., *FDG accumulation and tumor biology*, Nuclear Medicine and Biology, **25**: (4), 317-322 (1998).

PAWLAK, G. ve HELFMAN, D.M., *Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis*, Current Opinion in Genetics-Development, 11: (1), 41-47 (2001).

PEAKALL, D., *Ecotoxicology Series I Animal Biomarkers as Pollution Indicators*, Chapman and Hall, London, U.K., 180 (1992).

PEARSON, D.A., FRANKEL, E.N., AESCHBACH, R. ve GERMAN, J.B., *Inhibition of endothelial cell-mediated oxidation of low-density lipoprotein by rosemary and plant phenolics*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **45**, 578-582 (1997).

PENNO, M.B., AUGUST, J.T., BAYLIN, S.B., MABRY, M., LINNOILA, R.I., LEE, V.S., CROTEAU, D., YANG, X.L. ve ROSADA, C., *Expression of CD44 in human lung tumors*, Cancer Research, **54**, 1381-1387 (1994).

PIMENTAL, E., *Oncogenes*, CRC Press, Boca Raton, FL (1989).

PITOT, H.C. ve DRAGAN, Y.P., *Chemical carcinogenesis*, In Klassen, C.D. (ed), Casarett and Doull's Toxicology, McGraw-Hill, New York, USA, 201-267 (1996).

POLLARD, W.J. ve WALKER, M.J., *Animal Cell Culture*, Humana Press, New Jersey, USA, 713 (1990).

RAGHU, G., STRIKER, L., HARLAN, J., GOWN, A. ve STRIKER, G., *Cytoskeletal changes as an early event in hydrogen peroxide-induced cell injury: a study in A549 cells*, Br. J. Exp. Path., **67**, 105-112 (1986).

RAO,S., ABERG, F., NIEVES, E., HORWITZ, S.B. ve ORR, G.A., *Identification by mass spectrometry of a new α -tubulin isotype expressed in human breast and lung carcinoma cell lines*, Biochemistry, **40**: (7), 2096-2103 (2001).

RAJEWSKY, M.F., ENGELBERGS, J., THOMALE, J. ve SCHWEER, T., *DNA repair: counteragent in mutagenesis and carcinogenesis accomplice in cancer therapy resistance*, Mutation Research / Reviews in Mutation Research, **462**: (2-3), 101-105 (2000).

KAYNAKLAR (Devam)

- REPLOGLESCHWAB, T.S., PIENTA, K.J. ve GETZENBERG, R.H., *The utilization of nuclear matrix proteins for cancer diagnosis*, Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, **6**: (2-3), 103-113 (1996).
- RICHARDSON, G.E. ve JOHNSON, B.E., *The biology of lung cancer*, Seminars in Oncology, **20**, 105-127 (1993).
- ROBERTIS, K. ve HYAMS, J.S., *Microtubules*, Academic Press, New York, USA (1979).
- ROSS, M.H. ve REITH, E.J., *Histology a text and atlas*, Harper-Row Publishers, New York, USA (1985).
- SALGIA, R., LI, J-L., EWANIUK, D.S., WANG, Y-B., SATTler, M., CHEN, W-C., RICHARDS, W., PISICK, E., SHAPIRO, G.I., ROLLINS, B.J., CHEN, L.B., GRIFFIN, J.D. ve SUGARBAKER, D.J., *Expression of the focal adhesion protein paxillin in lung cancer and its relation to cell motility*, Oncogene, **18**, 67-77 (1999).
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. ve MANIATIS, T. , *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Harbor Lab. Press (1998).
- SARAN,A, BOUTHILLIER, Y., PIOLI, C., MOUTON, D., COVELLI, V., DORIA, G., NEVEU, T. ve BIOZZI, G., *3. Tissue-specificity of the genes controlling susceptibility and resistance to skin carcinogenesis in the mouse.*, Carcinogenesis, **17**: (11), 2463-2468 (1996).
- SARAN, A.,BOUTHILLIER, Y., PIOLI, C. MOUTON, D., COVELLI, V., DORIA, G., NEVEU, T. ve BIOZZI, G., *Genetics of chemical carcinogenesis. 3. tissue-specificity of the genes controlling susceptibility and resistance to skin carcinogenesis in the mouse*, Carcinogenesis, **17**: (11), 2463-2468 (1996).
- SCHILLER, J.H., *Lung cancer: therapeutic modalities and cytoprotection*, Lung, **176**: (3) 145-164 (1998).
- SHEELER, P. ve BIANCHI, D.E., *Cell and molecular biology*, 3rd ed., John Wiley Sons Inc., New York, USA (1987).
- SLEBOS, R.J. ve RODENHUIS, S., *The molecular genetics of human lung cancer*, European Respir. J., **2**: (5), 461-469 (1989).
- SONG, H.S., LEE, K.H., KANG, M.S. ve LEE, Y.J., *Role of paxillin in metabolic oxidative stress-induced cytoskeletal reorganization: involvement of SAPK signal transduction pathway and PTP-PEST gene expression*, Free Radical Biology and Medicine , **29**: (1), 61-70 (2000).
- SORGER, P.K., DOBLES, M., TOURNEBIZE, R. ve HYMAN, A.A., *Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics*, Current Opinion in Cell Biology, **9**: (6), 807-814 (1997).
- SOZZI, G ve CARNEY, D., *Molecular biology of lung cancer*, Curr. Opin. Pulm. Med., **4**: (4), 207-212 (1998).

KAYNAKLAR (Devam)

- STAMMATIA, A., BONSA, P., ZUCCOB, F., MOEZELAARE, R., ALAKOMID, H.-L. ve VON WRIGHTD, A., *Toxicity of selected plant volatiles in microbial and mammalian short-term assays*, Food and Chemical Toxicology, **37**: (8), 813-823 (1999).
- SUMIMITO, S., OKKAMOTO, Y., MIZUTANI, G., KUDEKEN, W., MORI, M. ve TAKAI, Y., *Immunohistochemical study of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in experimental squamous cell carcinoma of rat submandibular gland.*, Oral Oncology, **35**: (1), 98-104 (1999).
- SWAMIDAS, G.P., BASARABA, R.J. ve BAYBUTT, R.C., *Dietary retinol inhibits inflammatory responses of rats treated with monocrotaline*, Journal of Nutrition, **129**: (7), 1285-1290 (1999).
- ŞİMŞEK, B., *Farelerde Akciğer Adenomu Oluşmasında C Vitamininin Önleyici Etkisi ve Akciğer Prostoglandin Sentezi ile Olan İlişkisi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Birimi, Ankara, Türkiye (1982).
- TAKAHASHI, M., IIZUKAA, S., WATANABEA, T., YOSHIDAA, M., ANDOS, J., WAKABAYASHIB, K. ve MAEKAWAA, A., *Possible mechanisms underlying mammary carcinogenesis in female wistar rats by nitrofurazone*, Cancer Letters, **156**: (2), 177-184 (2000).
- TANNHEIMER, S.L., BARTON, S.L., ETHIER, S.P. ve BURCHIEL, S.W., *Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons increase intracellular Ca^{2+} and cell proliferation in primary human mammary epithelial cells*, Carcinogenesis, **18**: (6), 1177-1182 (1997).
- TOLIS, C., PETERS, G.J., FERREIRA, C.G., PINEDO, H.M. ve GIACCONE, G., *Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines*, Eur. J. Cancer, **35**: (5), 796-807 (1999).
- TOPINKA, J., SCHWARZ, L.R., KIEFER, F., WIEBEL, F.J., GAJDO, O., VIDOVA, P., DOBIA, L., FRIED, M., RAM, R.J. ve WOLFF, T., *DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract*, Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, **419**: (1-3), 91-105 (1998).
- TORRES, K. ve HORWITZ, S.B., *Mechanisms of taxol-induced cell death are concentration dependent*, Cancer Research, **58**: (16), 3620-3626 (1998).
- TSUKITA, S., YANEMURA, S. ve TSUKITA, S., *ERM (ezrin / radixin / moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction*, Current Opinion in Cell Biology, **9**: (1), 70-75 (1997).
- TUNCER, İ., BURGUT, R., BOZDEMİR, N ve COŞAR, E., *Türkiye'de Kanser Sıklığı*, Çukurova Üniversitesi Basımevi, Adana, Türkiye, 188 (1994).
- UCKUN, F.M., MAO, C., VASSILEV, A.O., NAVARA, C.S., NARLA, R.K.S. ve JAN, S-T., *A rationally designed anticancer drug targeting a unique binding cavity of tubulin*, Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, **10**: (10), 1015-1018 (2000).

KAYNAKLAR (Devam)

UMINO, T., WANG, H., ZHU, Y., LIU, X., MANOULIOVA, L.S., SPURZEM, J.R., LEUSCHEN, M.P. ve RENNARD, S.I., *Modification of type I collagenous gels by alveolar epithelial cells*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., **22**, 702-707 (2000).

ULTEE, A., KETS, E.P.W. ve SMID, E.J., *Mechanism of action of carvacrol on the food-borne pathogen*, Applied and Environmental Microbiology, **65**: (10), 4606-4610 (1999).

ULTEE, A. ve SMIDA, E.J., *Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus*, International Journal of Food Microbiology, **64**: (3), 373-378 (2001).

VONANGERER, I., *Tubulin as a target for anticancer drugs*, Current Opinion in Drug Discovery and Development, **3**: (5), 575-584 (2000).

WADE, P.A., *Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin*, Human Molecular Genetics, **10**: (7), 693-698 (2001).

WADE, R.H. ve HYMAN, A.A., *Microtubule structure and dynamics*, Current Opinion in Cell Biology, **9**: (1), 12-17 (1997).

WASILEWSKA, A.C., WIERZEWSKA, A., NIZANKOWSKA, E., GRACA, B., HUGHES, J.A. ve ANDERSON, D., *Cytogenetic damage and ras p21 oncoprotein levels from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), untreated lung cancer and healthy controls*, Mutation Research, **431**, 123-131 (1999).

WEINBERG, R.A., *Oncogenes, antioncogenes, and the molecular basis of multistep carcinogenesis*, Cancer Research, **49**, 3713-3721 (1989).

WHEATER, P.R., BURKITT, H.G. ve DANIELS, V.G., *Functional histology*, Churchill Livingstone, Edinburg, UK (1979).

WUEST, J.S., FRANKLIN, W.A., DRABKIN, H., GEMMILL, R., SIDRANSKY, D. ve ANDERSON, W.A., *Genetic markers for early detection of lung cancer and outcome measures for response to chemoprevention*, Journal of Cellular Biochemistry Supplements, **28-29**, 64-73 (1997).

WIJNHOFEN, S.W.P., KOOL, H.J.M., VAN TEIJLINGEN, C.M.M., VAN ZEELAND, A.A. ve VRIELING, H., *Loss of heterozygosity in somatic cells of the mouse an important step in cancer initiation?*, Mutation Research, **473**, 23-36 (2001).

VILPO, J.A., KOSKI, T. ve VILPO, L.M., *Selective toxicity of vincristine against chronic lymphocytic leukemia cells in vitro*, European Journal of Hematology, **65**: (6), 270-378 (2000).

WOLPAW, D.R., *Early detection in lung cancer-case finding and screening*, Medical Clinics of North America, **80**: (1), 63-68 (1996).

KAYNAKLAR (Devam)

YAFFE, D. ve SAXEL, O., *Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle*, Nature, **270**, 725-727 (1977).

YAKAR, N., *Sitoloji*, 2. Baskı, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları Gençlik Yayınevi, İstanbul, 299 (1987).

YAMAZAKI, K., REPLOGLESCHWAB, T.S. ve PIENTA, K.J., *Nuclear matrix protein composition of human lung carcinoma cell lines*, Oncology Reports, **3**: (4), 737-741 (1996).

YANISHLIEVA, N.V., MARINOVA, E.M., GORDON, M.H. ve RANEVA, V.G., *Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems*, Food Chemistry, **64**: (1), 59-66 (1999).

ZEYTİNOĞLU, M., *Changes in cytoskeletal organization during myotube formation in vitro*, Doktora Tezi, School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich, UK (1992).

ZEYTİNOĞLU, H., GIBSON, I. ve ZEYTİNOĞLU, M., *Microscopic analysis of a cell line which switches between the differentiated and the transformed phenotype*, Micron, **24**: (3), 265-272 (1993).

ZEYTİNOĞLU, H., GRIFFITHS, S.L., DAWSON, A.P. ve GIBSON, I., *The effects of N-Ras oncogene expression on PDGP-BB stimulated responses in cultured mouse myoblasts*, Cellular Signaling, **7**: (3), 235-246 (1995).

ZEYTİNOĞLU, M., AYDIN, S., ÖZTÜRK, Y., BAŞER, K.H.C., *Inhibitory effects of carvacrol on DMBA induced pulmonary tumorigenesis*, Acta Pharmaceutica Turcica, **XXX**: (2), 93-98 (1998).

ZHANG, SBX., BASTOW, K.P., TACHIBANA, Y., KUO, S.C., HAMEL, E., MAUGER, A., NARAYANAN, V.L. ve LEE, K.H., *Antitumor agents. 196. Substituted 2-thienyl-1,8-naphthyridin-4-ones.: Their synthesis, cytotoxicity and inhibition of tubulin polymerization*, Journal of Medicinal Chemistry, **42**: (20), 4081-4087 (1999).

ZIENOLDDINY, S., RYBERG, D., ARAB, M.O., SKAUG, V. ve HAUGEN, A., *Loss of heterozygosity is related to p53 mutations and smoking in lung cancer*, Br J Cancer, **84**: (2), 226-231 (2001).