



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİZEL EGZOZ PARÇACIKLARININ (DEP) SOLUNUM YOLU EPİTEL
HÜCRELERİNİN ÇOĞALIMINI VE ÖLÜMÜNÜ DÜZENLEYEN
PROTEİNLERİN GEN İFADESİ VE BU HÜCRELERDEN İNFLAMATUAR
SİTOKİN SALINIMINA ETKİSİ**

Recep BAYRAKTAR
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Prof. Dr. Hasan BAYRAM

Gaziantep

2011

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİZEL EGZOZ PARÇACIKLARININ (DEP) SOLUNUM YOLU EPİTEL
HÜCRELERİNİN ÇOĞALIMINI VE ÖLÜMÜNÜ DÜZENLEYEN
PROTEİNLERİN GEN İFADESİ VE BU HÜCRELERDEN İNFLAMATUAR
SİTOKİN SALINIMINA ETKİSİ

Recep BAYRAKTAR

Tez Savunma Tarihi: 27.07.2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof.Dr.A.Tuncay DEMİRYÜREK
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr.Ahmet ARSLAN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanları

I. Prof.Dr.Ahmet ARSLAN

II. Prof.Dr.Hasan BAYRAM

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası

Prof.Dr.Ahmet ARSLAN

Doç.Dr.Hüseyin KAYA

Yrd.Doç.Dr.Mehri İĞCİ

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

27.07.2011

Recep Bayraktar

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve tez çalışmamın bütün aşamalarında bilgi, destek ve hoşgörülerini esirgemeyen tez danışmanlarım Prof. Dr Ahmet ARSLAN'a ve Prof. Dr. Hasan BAYRAM'a ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hücre kültürü laboratuvarında birlikte çalıştığım, yardımlarını her zaman yanımda hissettiğim Bülent GÖĞEBAKAN'a, tez çalışmam boyunca katkı, öneri ve desteklerini esirgemeyen Yrd.Doç.Dr Serdar ÖZTUZCU, Yrd.Doç.Dr Beyhan CENGİZ, Yrd.Doç.Dr Yusuf Ziya İĞCİ, Yrd.Doç.Dr Mehri İĞCİ, Prof. Dr Ali Ecir ÇAKMAK ve Yrd.Doç.Dr Mustafa ULAŞLI'ya teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında desteklerini esirgemeyen Ahmed BULUT ve Esmâ ÖZKARA'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KAPAK	i
TEZ ONAYI SAYFASI	ii
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Solunum Hücre Biyolojisi.....	6
2.1.1. Epitelyumun anatomisi.....	6
2.1.1.1 Silyalı hücreler	7
2.1.1.2 Mukus hücreleri.....	8
2.1.1.3 Bazal hücreler.....	9
2.1.2. Havayolu epitelinin görevleri.....	9
2.1.3. Bronş epitel hücrelerinin elde edilmesi ve kullanılan yöntemler..	11
2.1.3.1 Fırçalama yöntemi ile BEH elde edilmesi	11

2.1.3.2 Primer eksplant tekniği ile BEH elde edilmesi	11
2.1.4. Alveol epitelyum hücreleri.....	12
2.1.5.Havayolu epitelyum hücre hatları	12
2.1.5.1 A549 hücreleri	13
2.2. Hava kirliliği	13
2.2.1. Hava kirleticileri.....	14
2.2.1.1. Kükürt dioksit (SO ₂).....	14
2.2.1.2. Ozon (O ₃)	15
2.2.1.3. Nitrojen oksitler (NO _x)	16
2.2.1.4. Partiküler madde (PM)	16
2.2.1.4 A. Dizel egzoz partikülleri (DEP)	16
2.3. Hücre döngüsü (Cell cycle) ve programlı hücre ölümü (apoptozis).....	17
2.3.1. Hücre döngüsü (Cell cycle).....	18
2.3.1.1. Siklinler	19
2.3.1.2.Siklin bağımlı kinazlar (CDK)	20
2.3.1.3.Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI)	20
2.3.2. Hücre döngüsü kontrol noktaları (Checkpoint).....	21
2.3.3. Programlı hücre ölümü (Apoptozis).....	21
2.3.3.1 Programlı hücre ölümünün düzenlenmesi	22
2.3.3.2. Apoptozis ile nekrozisin karşılaştırılması	23
2.3.3.3. Hücre döngüsü ile apoptozisin bağlantısı	25

2.3.3.4. Onkogenler	25
2.3.3.4.A Myc ailesi	26
2.3.4. Çalışılan gen bölgeleri.....	26
2.3.4.1. Siklin E1	27
2.3.4.2. Siklin bağlı kinaz 2 (CDK2).....	27
2.3.4.3. Siklin bağlı kinaz inhibitörü 1(P21)	27
2.3.4.4. Mitojen aktif protein kinaz 1(MAPK1).....	28
2.3.4.5 Mitojen aktif protein kinaz 9 (MAPK9).....	29
2.3.4.6 Nükleer faktör-kappa-B1 (NF- κ B).....	29
2.3.4.7. Proto onkogen protein C-Myc	31
2.3.4. Sitokinler	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. A549 hücreleri ile yapılan çalışmalar	34
3.1.1. A549 hücrelerinde kullanılan kültür vasatının hazırlanması	34
3.1.2. A549 hücrelerinin kaldırılması	35
3.1.3. A549 hücrelerinin sayılması	35
3.1.4. A549 hücre ekimi ve hücrelerin SF'e alınması.....	35
3.1.5. Dizel egzoz partiküllerinin (DEP) hazırlanması	35
3.1.6. A549 hücrelerinin DEP'e ve ajanlara maruz bırakılması.....	36
3.2. Bronş epitelyum hücre kültürü elde edilmesi	36
3.2.1. Bronş epitelyum hücre kültüründe kullanılan besiyerleri	36

3.2.2. Örneğin alınması ve kesilip parçalanması.....	37
3.2.3. Bronş epitelyum hücrelerinden kültür elde edilmesi	38
3.2.4. Bronş epitelyum hücreleri ile yapılan deneyler.....	39
3.3. RNA elde edilmesi	40
3.4. cDNA elde edilmesi	40
3.5. Real-Time Revers Transcriptase(Polimeraz zincir reaksiyonu)	41
3.5.1. RT-PCR tepkime protokolü	42
3.6. Çalışmada kullanılan primer ve prop dizileri.....	42
3.7.ELISA analizi	42
4. BULGULAR ve SONUÇ	45
5.TARTIŞMA	61
6. KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	74

SİMGE VE KISALTMALAR

AT1	Alveolar epitel tip 1 hücresi
ATII	Alveolar epitel tip 2 hücresi
ATCC	American Type Culture Collection
BEH	Bronş epitel hücreleri
CCNE1	Siklin-E1
CDK	Siklin-bağlı kinaz
CDKI	Siklin-bağlı kinaz inhibitörü
CDKN1A	Siklin bağı kinaz inhibitorü 1
C-MYC	Proto-onkogen protein
DEP	Dizel egzoz parçacığı
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
FCS	Fötal buzağı serumu
GAPDH	Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz
GM-CSF	Granulosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
Ig	İmmunglobulin E
IL	İnterlökin
JNK	C-jun N-terminal kinaz
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
MAPK1	Mitojen aktif protein kinaz1
MAPK9	Mitojen aktif protein kinaz 9
NAC	N-Asetil sistein
NF-κB	Nükleer faktör kappa B
NO	Nitrik oksit
NO _x	Nitrojen oksit
NO ₂	Nitrojen dioksit
O ₃	Ozon
PM	Partiküler madde
PM _{2.5}	2.5 µm'den küçük partiküller
PM ₁₀	10 µm'den küçük partiküller
PPM	Milyonda bir ölçüm birimi

RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SF	Serumsuz kültür vasatı
SFT	Solunum fonksiyon testi
SO ₂	Kükürt dioksit
TNF α	Tümör nekrozis faktör alfa
TNFR-1	Tümör nekroz faktör reseptörü-1

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Bronş epitel hücreleri tarafından üretilen moleküller ve bunları uyaran moleküller	10
Tablo 2. Nekrozis ve apoptozisin karşılaştırılması	24
Tablo 3. Çalışılan gen bölgelerinin adları	26
Tablo 4. cDNA elde edilmesi sırasında eklenen madde ve miktarları	40
Tablo 5. cDNA elde edilmesi sırasında eklenen madde ve miktarları	41
Tablo 6. RT-PCR protokolünde eklenen maddeler ve miktarları	41
Tablo 7. RT PCR Tepkime Koşulları	42
Tablo 8. Çalışmada Kullanılan Primer ve Prop Dizileri	42
Tablo 9. A549 hücrelerinde DEP ve NAC'a maruz bırakılan örneklerdeki mRNA gen ifadesi değerleri	46
Tablo 10. A549 hücrelerinde DEP ve JNK inhibitörüne maruz bırakılan örneklerdeki mRNA gen ifadesi değerleri	48
Tablo 11. A549 hücrelerinde DEP ve ERK inhibitörüne maruz bırakılan örneklerdeki mRNA gen ifadesi değerleri	50
Tablo 12. KOAH'lı hastalardan elde edilen primer bronş epitel hücrelerinin mRNA gen ifadesi değerleri	52
Tablo 13. Sigara içen hastalardan elde edilen primer bronş epitel hücrelerinin mRNA gen ifadesi değerleri	54
Tablo 14. Sigara içmeyen hastalardan elde edilen primer bronş epitel hücrelerinin mRNA gen ifadesi değerleri	56

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Solunum epitelі.....	7
Şekil 2. İnsan bronş epitel hücrelerinin elektron mikroskopik görünümü	8
Şekil 3. Yedinci günde, kültür ortamında doku eksplantı ve çevreye doğru çoğalan insan bronş epitel hücreleri	11
Şekil 4. DEP'nin şematik diyagramı	17
Şekil 5. Memeli hücrelerinde hücre döngüsündeki geçişlerin düzenlenmesi.....	19
Şekil 6. Siklin bağımlı protein kinaz (CDK) sistemi	20
Şekil 7. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları (check point)	21
Şekil 8. Apoptozisin genel görünümü	23
Şekil 9. P53 tümör süpresör gen yolu	25
Şekil 10. Hücre döngüsünde G1 fazından S fazına geçişin kontrolü	27
Şekil 11. Hücre döngüsü boyunca siklinler, CDK'lar ve CDKI'leri arasındaki ilişkilerin gösterilmesi	28
Şekil 12. MAPK1 aktivasyon şeması ve hücre çoğalması	29
Şekil 13. NF-κB'nin TNF-α ve IL-1 tarafından aktivasyonu	30
Şekil 14. C-Myc ile, tahmini hedef genler, hücre büyümesi ve hücre sel fonksiyonlar arasındaki ilişki	31
Şekil 15. CCNE1, CDK2, CDKN1A, MAPK1, MAPK9, NFKB1 ve MYC arasındaki tahmini bağlantıların gösterilmesi	32
Şekil 16. Primer eksplant yöntemi ile bronş epitelyumu elde edilmesi.....	38
Şekil 17. Bronş epitelyumu primer hücre kültürünün aşamaları	39
Şekil 18. A549 hücrelerinde DEP ve NAC'a maruz bırakılan örneklerdeki mRNA gen ifadesi değerleri	47

Şekil 19. A549 hücrelerinde DEP ve JNK inhibitörüne maruz bırakılan örneklerdeki mRNA gen ifadesi değerleri	49
Şekil 20. A549 hücrelerinde DEP ve ERK inhibitörüne maruz bırakılan örneklerdeki mRNA gen ifadesi değerleri	51
Şekil 21. KOAH'lı hastalardan elde edilen primer bronş epitel hücrelerinin mRNA gen ifadesi değerleri	53
Şekil 22. Sigara içen hastalardan elde edilen primer bronş epitel hücrelerinin mRNA gen ifadesi değerleri	55
Şekil 23. Sigara içmeyen hastalardan elde edilen primer bronş epitel hücrelerinin mRNA gen ifadesi değerleri	57
Şekil 24. Bronş epitelyum hüceleinde GMC-SF düzeylerinin gösterilmesi	58
Şekil 25. Bronş epitelyum hüceleinde IL-8 düzeylerinin gösterilmesi	59

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DİZEL EGZOZ PARÇACIKLARININ (DEP) SOLUNUM YOLU EPİTEL HÜCRELERİNİN ÇOĞALIMINI VE ÖLÜMÜNÜ DÜZENLEYEN PROTEİNLERİN GEN İFADESİ VE BU HÜCRELERDEN İNFLAMATUAR SİTOKİN SALINIMINA ETKİSİ

Recep BAYRAKTAR

Gaziantep Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanlar:

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN, Prof. Dr. Hasan BAYRAM
Temmuz -2011, 74 sayfa

Kentsel alanlarda havada uçuşan partiküler maddenin çok önemli bir kısmını dizel yakıtlarının yanması ile dışarıya salınan dizel egzoz partikülleri (DEP) oluşturmaktadır. DEP'e maruziyetle, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), şiddetli astım, solunum enfeksiyonlarına hassasiyetin artması ve pulmoner inflamasyonlar gibi çok ciddi sağlık problemleri arasında yakından ilişki vardır. Bununla birlikte DEP'e bağlı oluşan akciğer hastalıklarının mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Bu çalışmada DEP'in insan primer bronş epitel hücreleri ve akciğer alveol hücre dizileri olan A549 hücrelerinin hücre döngüsü ve apoptozisini düzenleyen genlerin mRNA ekspresyon seviyelerine olan etkisi araştırılmıştır. KOAH'lı, sigara içen ve sigara içmeyen hastalardan elde edilen primer bronş epitel hücrelerine; Serumsuz kültür vasatı, 10 µg/ml DEP ve 100 µg/ml DEP olmak üzere üç farklı çalışma grubu maruz bırakılmıştır. Akciğer alveol hücre dizileri olan A549 hücreleri serumsuz kültür vasatı, serumlu kültür vasatı (%10FCS) ve 50 µg/ml DEP'e maruz bırakılmıştır. Ayrıca 50 µg/ml DEP varlığında JNK ve ERK inhibitörleri (10 µM, 33 µM,) ve n-asetil sistein (NAC33 mM) içeren çalışma grupları eklenerek bu maddelerin DEP'in etkilerini nasıl etkileyeceği de araştırılmıştır. Bu hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri ile bu hücrelerdeki hücre döngüsü ve apoptozisini düzenleyen siklinE, siklin bağımlı kinaz2, siklin-siklin bağımlı kinaz inhibitörü P21, transkripsiyon faktörü NF-κB, proto onkogen c-MYC, MAPK yolağı düzenleyicileri Jnk2 ve Erk2 genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR yöntemiyle çalışılmıştır. Ayrıca hücrelerin DEP maruziyeti sonrasında enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile interlökin (IL)-8 ve granulosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) salınımı araştırılmıştır. Çalışma sonucunda DEP'in insan primer bronş epitel hücreleri ve akciğer alveol hücre dizileri olan A549 hücrelerinin hücre döngüsü ve apoptozisini düzenleyen genlerin mRNA ekspresyon seviyelerinde önemli değişiklikler meydana getirebileceğini destekleyen sonuçlar bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: A549 hücreleri, Dizel egzoz parçacıkları, Gen ifadesi, Hücre döngüsü ve apoptozis, Primer bronş epitel hücreleri

ABSTRACT

M.S. Thesis

EFFECTS OF DIESEL EXHAUST PARTICLES ON GENE EXPRESSION OF THE PROTEINS REGULATING PROLIFERATION AND APOPTOSIS OF RESPIRATORY EPITHELIAL CELLS AND RELEASE OF INFLAMMATORY CYTOKINES FROM THESE CELLS

Recep BAYRAKTAR

University of Gaziantep-Graduate School of Health Sciences,
Department of Medical Biology

Supervisors:

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN, Prof. Dr. Hasan BAYRAM

July-2011, 74 pages

Diesel exhaust particles, which exits by burning diesel fuel, consist of a considerable amount of particular matters wandering in the urban. There is a quite close relationship between diesel exhaust particles and very crucial health problems such as chronic obstructive pulmonary disease, brutal asthma, being sensitive against respiration infection and pulmonary inflamations. On the other hand, the contrivance of pulmonary diseases thanks to diesel exhaust particles has not ever been explained clearly. In this work, cell cycle of A549 cells of which human primer bronch epithelial cells of diesel exhaust particles and lung alveolar cell arrays and also the affect of genes that order apoptosis to mRNA expression levels have been researched. Primer bronch epithelial cells acquired from smoking and non-smoking patients with chronic obstructive pulmonary disease were exposed to three different study groups who are free-serum culture medium, 10 µg/ml DEP ve 100 µg/ml DEP. Pulmonary alveolar cell sequences that are A549 cells were exposed to free-serum culture medium, culture medium with serum (10% FCS) and 50 µg/ml DEP. Besides, study groups which include JNK and ERK inhibitors (10 µM, 33 µM) and n-acetylcysteine (NAC33 mM) in the substances of 50 µg/ml of DEP were added up and examined how these elements effect the affect of DEP. cDNA samples obtained from these cells with cell cycle and silkinE that regulates apoptosis, siklin dependent kinase inhibitory P21, transcription factor NF- Kb, proto onkogenic c-MYC, MAPK path regulators Jnk2 ve Erk2 genes mRNA expression levels were studied by the method of RT-PCR. Moreover, after the DEP exposition of the genes, the release of interleukin (IL)-8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was researched by the method of linked immunosorbent assay (ELISA). In the conclusion of this study, what was learnt is DEP might make a remarkable change in the expression levels of mRNA, that human primery bronchial epithelial cells and pulmonary alveolar cell sequences that are A549 cells cell cycle apoptosis regulator.

Key words: A549 cells, Diesel exhaust particles, Gene expression, Cell cycle and apoptosis, Primary bronchial epithelial cells

1.GİRİŞ

Hava Kirliliği; soluduğumuz dış havada kükürt dioksit (SO_2), partiküler madde (PM), nitrojen oksitleri ve ozon (O_3) gibi kirleticilerin çevre ve sağlık üzerinde olumsuz etkileri yapacak düzeylerde olması şeklinde tanımlanabilir. Bu kirlilik atmosferde doğal süreçleri bozmakta ve toplum sağlığını olumsuz yönde etkilemekte olup, dünyada son 30 yıldır hava kirliliği düzeyleri düzenli olarak izlenmesine ve mücadele edilmesine rağmen, özellikle büyük metropollerde kirlilik düzeyleri halen güvenli kabul edilen sınırların üzerinde seyretmektedir (1). Dünyada hava kirleticisi emisyonlarında 2030 yılına kadar beş katlık bir artış beklenmektedir (1). Özellikle gelişmekte olan bölgelerde hızlı kentleşme ve enerji tüketiminin artışı ile birlikte kirlilik de artmaktadır. Son yıllarda evlerde ve endüstriyel tesislerde kullanılan gaz ve yakıtların artması sonucu solunabilir partikül madde, nitrojen oksit ve atmosferik hidrokarbon derişikliklerinin yükselmesiyle hava kirliliği önemli derecede artmaya devam etmektedir (1).

PM'lerin bileşimine bakıldığında birden fazla kirleticiden ibaret olduğu, aerosol, duman, is, yanma ürünleri, toz, deniz tuzu ve polen gibi maddelerden oluştuğu görülmektedir (2). Solunum yollarına alınan PM'in $10\mu\text{m}$ ' den büyük kısmı burun ve nazofarenkste tutulmakta, 10 mikrondan küçük kısmı ise bronşlarda birikirken, 1-2 mikron çapındakiler. alveollerde toplanmakta, 0.5 mikron çapındaki partiküller ise alveollerden intrakapiller aralığa sızmaktadır (2). Gaz kirleticilerden SO_2 burun ve farenkste elimine edilirken, suda çözünür olmayan gazlardan O_3 ve NO_2 solunum sisteminin derinliklerine ulaşabilmektedir. Karbon Monoksit (CO) ise alveoler kapiler zardan sızarak hemoglobine bağlanmaktadır (2).

Kentsel alanlarda havada uçuşan partiküler maddenin çok önemli bir kısmını dizel yakıtlarının yanması ile dışarıya salınan dizel egzoz partikülleri (DEP) oluşturmaktadır (3). Tipik DEP binlerce organik ve inorganik bileşenlerin oluşturduğu esas itibariyle karbonlu parçalar içerir (4). Organik bileşenler; aromatik hidrokarbonlar, nitro aromatik bileşikler, aldehitler ve heterosiklik bileşiklerden oluşur (4). DEP'e maruziyetle, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), şiddetli astım, solunum hastalıklarına hassasiyetin artması ve pulmoner inflamasyonlar gibi çok ciddi sağlık problemleri arasında yakından ilişki vardır (5). Bununla birlikte DEP'nin bağlı oluşun akciğer hastalıklarının

mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (5). Oksidatif stresin DEP ilişkili solunum sistemi toksititesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (6). Hidrojen peroksit ve süperoksit radikal içeren reaktif oksijen türleri oksidatif stres ve inflamasyonun yanında DNA protein ve yağlarda hasara neden olabilir (6).

Hücreler oksidatif strese cevap olarak inflamasyon ve hücre korumasını içeren genlerin ekspresyonu ile çeşitli sinyal yollarını aktif hale geçirirler. Bu yollar arasında MAP kinaz yolağı önemli yer tutar (7). İnsan havayolu epitelyum hücreleriyle yapılan çalışmalarda DEP 'in MAP kinaz ailesini fosforilasyon yolu ile aktif hale getirerek NF- κ B ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (8). Bu moleküller sitokin ve kemokin türlerinin genlerini kodlayan özendirici bölgelerine bağlanarak onların ekspresyonlarını artırır (8).

Solunum sistemini hava yolu ile alınan zararlılara karşı koruması ve metabolik olarak aktif bir bariyer rolü oynaması nedeniyle, hava kirlenmelerinin solunum yolu epiteli üzerindeki etkileri yoğun araştırma konusu olmuştur. DEP ile yapılan çalışmalarda, bu parçacıkların hem sağlıklı hemde astımlı bireylerin bronş epitelyum hücre kültürlerinin silya titreşim frekansını durdurduğu gösterilmiştir (11). Diğer bir çalışmada ise DEP'in akciğer alveol hücre dizilerinin (A549) hücre çoğalmasını artırdığı gösterilmiştir (11). DEP'in bu etkiyi hücre döngüsünü hızlandırarak ve apoptozisini baskılayarak gerçekleştirdiği düşünülmektedir (11). DEP'in bu etkisinin N-asetil sistein ve çeşitli hücre içi sinyal iletim yolu engelleyicileri tarafından baskılandığı gösterilmiştir (11). Genetik yapısı hasara uğrayan hücrenin apoptozisinde önemli işlevi olan p21 proteinin gen ifadesine bakıldığında da, DEP'in bu proteinin gen ifadesini baskıladığı bulunmuştur (12).

P21 hücre döngüsü boyunca kritik öneme sahiptir. Siklin-siklin bağlı kinaz bileşenini engelleyerek hücre döngüsü geçişlerini kontrol eder (9). Tümör baskılayıcı transkripsiyon faktör p53, p21 gen ifadesinin güçlü bir düzenleyicisidir (9). P21'in DNA tamiri apoptozis ve hücre çoğalması gibi fizyolojik fonksiyonları vardır (10). P21 gen ifadesinin artışı ile hücre büyümesi durdurularak DNA hasarı tamir edilir (10).

Bu çalışmada insan bronş epitel hücreleri ve akciğer alveol hücre dizileri olan A549 hücreleri kullanılmıştır. DEP'in bu hücrelerdeki hücre döngüsü ve apoptozisini düzenleyen siklinE, siklin bağımlı kinaz2, siklin-siklin bağımlı kinaz engelleyici P21,

transkripsiyon faktörü NF- κ B, proto onkogen c-myc, MAPK yolağı düzenleyicileri Jnk2 ve Erk2 genlerinin gen ifade seviyeleri RT-PCR yöntemiyle çalışılmıştır. Ayrıca insan bronş epitel hücrelerinde enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile interlökin (IL)-8 ve granulosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) aracılarının salınımı araştırılmıştır.

Bu çalışmanın dizel egzoz partiküllerinin solunum yolları ve akciğerler üzerine olan olumsuz etkilerinin araştırılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Aynı zamanda hava yolları epitel hücrelerinin yaşamında ve ölümünde DEP'in yol açtığı etkilerin altında yatan mekanizmaları aydınlatmaya katkıda bulunacağı düşünülmektedir. Ayrıca DEP'in kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi kronik hava yolu hastalıklarının patogenezindeki etkileri hakkında yeni bir fikir vereceği düşünülmektedir.

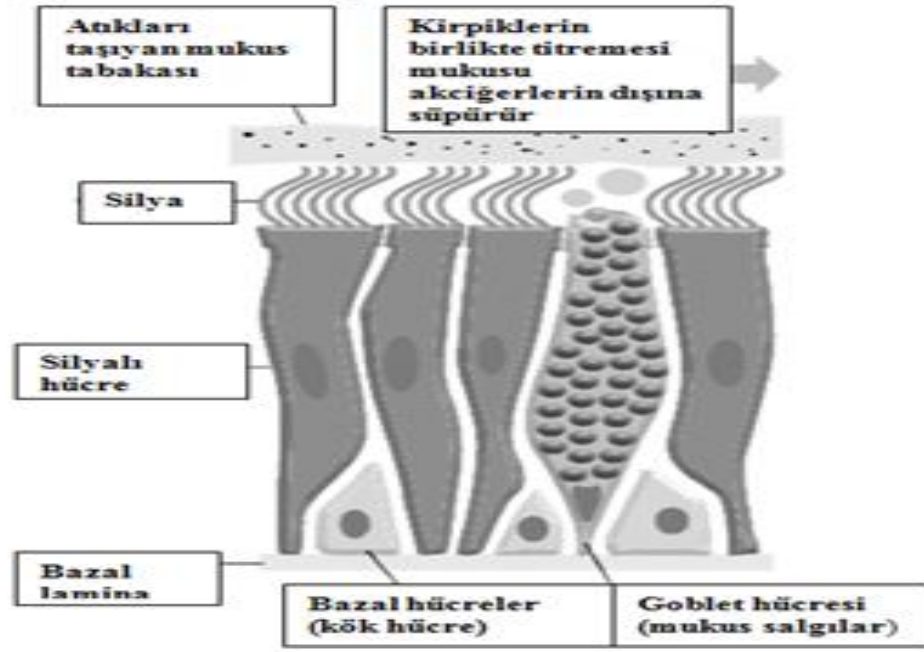
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Solunum Hücre Biyolojisi

Solunum sisteminde hava yolları; akciğer ile dış ortam arasında hava taşınmasını sağlayan kanallar sistemini oluşturmaktadır (13). Bu kanalların görevi; içinden geçen havanın gidip gelmesini sağlamak ve dış ortamdan vücut içine alınan havayı uygun hale getirmektir (13). Bu kanallar sisteminin önemli kısmını oluşturan trakea ve bronşlar kendilerine has epitelyum dokusuna sahiptir (13). Hava yollarının epitelyum tabakası hava yolları ile alınan toksik ve bulaşıcı etmenlere karşı birincil savunma engelini oluşturur (14). Bu hücreler aynı zamanda çeşitli metabolik işlevlere de sahiptir (14). Trakea ve ana bronşlar belirgin bir bazal lamina üzerine oturan yalancı çok katlı sili silindirik epitelyum ile örtülüdür (14). Burada birçok hücre tipi ayırt edilebilir. Lümenenden bazal laminaya uzanan bu hücrelerin önemli kısmını sili prizmatik hücreler oluşturur (14). Goblet hücreleri sayıca fazla olup silya bulundurmayan, bazal lamina ve lümenle ilişkili hücrelerdir. Bazal hücreler bazal lamina üzerine oturur ve lümeneye kadar uzanmazlar. Trakeanın epitelyum örtüsünde ayrıca endokrin hücrelerde bulunur. Bu hücreler küçük granülleri ile epitelyumun bazal bölümü içinde görülebilir ve toplam hücre popülasyonunun yaklaşık %8'ini oluştururlar (14). Memeli solunum yolları özelleşmiş görevleri olan çok çeşitli hücreler ile kaplıdır (14). Bu hücrelerin görevleri akciğer sıvı dengesinin ayarlanması solunan hava ile alınan ajanların metabolize edilmesi ya da temizlenmesi, yaralanma ve hasar durumunda inflamatuvar sistemin harekete geçirilmesinden ve hava yolları düz kas hücrelerinin fonksiyonlarının düzenlenmesinden sorumludur (14).

2.1.1. Epitelyumun anatomisi

İnsan solunum sistemi epitelyumu en az sekiz çeşit farklı hücreden oluşmaktadır (16). Ancak moleküler yapıları, işlevleri ve biyokimyasal özellikleri ele alındığında bazal, silyalı ve salgı hücreleri olmak üzere temel olarak üç gruba ayrılır (16).

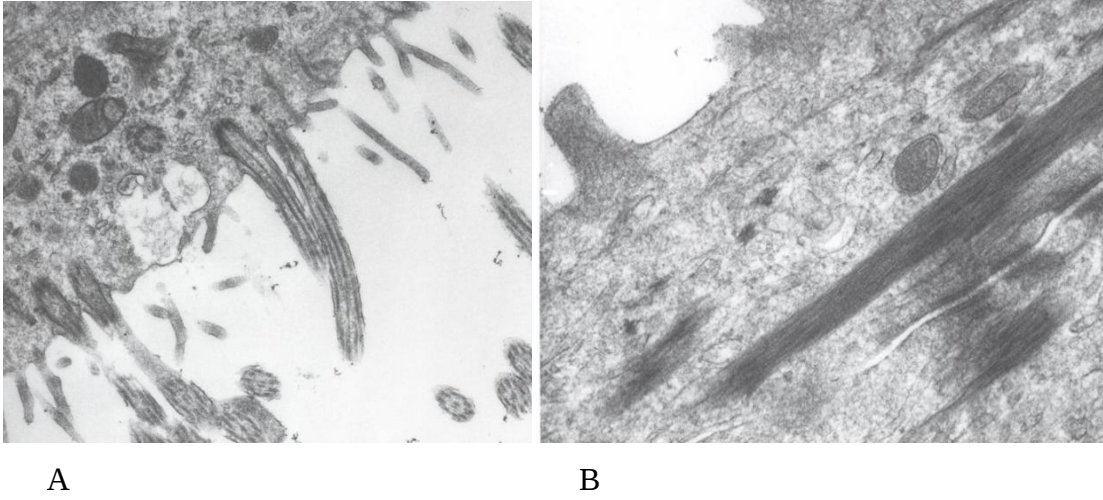


Şekil 1. Solunum epiteli. Goblet hücreleri silli hücrelerin üzerini örten örtüyü oluşturan mukusu salgılar. Sillerin düzenli ve işbirliği halindeki ritmik hareketleri, yapışan artıkları taşıyan mukusu hava yollarından dışarıya süpürür (17).

2.1.1.1. Silyalı hücreler

Hava yollarını kaplayan epitelyum hücrelerinin büyük bir kısmını silli silindirik yapıdaki epitelyum hücreleri oluşturur (17). Bu hücreler solunum yolları daraldıkça kübik şekil alırlar ve alveollerde görülmezler (17). Büyük solunum yollarında küçük solunum yollarına göre daha çok sayıda silli hücre vardır (17). Silyalı epitelyum hücreleri hava yollarının yaklaşık olarak %50'sini kaplayan önemli hücre grubudur. Bu hücreler ya bazal ya da salgı hücrelerinden köken alırlar (17). Bu hücrelerin apikal yüzeyinde yer alan sil denilen tüysü yapılar zararlı parçacıkları akciğerlerden uzaklaştıran mukosilyer transportta yer alırlar (17). Siller aynı yönde uyumlu bir biçimde hareket ederler (17). Tipik olarak bir hücre yaklaşık olarak 200-300 adet silya taşır (15). Siller senkronize olarak saniyede 12-16 defa titreşir ve bu titreşim Hertz (Hz) olarak ifade edilir (15). Bronş epitelyum dokusu ile yapılan çalışmalar, in vitro kültür ortamında silyalı bronş epitelyum hücre elde edilebileceği ve silya titreşim frekansının sağlıklı ve astımlı hücreler arasında farklılık göstermediğini ortaya koymuştur (15). Bu hücrelerin apikale bakan yüzeylerinde silya hareketinde kullanılan enerjiyi temin etmek için bol

miktarda mitokondri bulunur (14). Bu hücrelerin temel görevi mukusu ve içindekileri akciğerden uzaklaştırmaktır (14).



Şekil 2. İnsan bronş epitel hücrelerinin elektron mikroskopik görünümü A= x30.000, B=x56.000 büyütme (25) .

2.1.1.2. Mukus (goblet) hücreler

Mukus hücreleri salgıladıkları salgı maddeleri ile hava yollarına giren yabancı nesneleri yakalarlar (14). Mukus siyalik asit içerikli glikoprotein yapısında olduğundan viskoelastik bir yapıya sahiptir ve bu yapı silyaların hareketini kolaylaştırır (14). Hava yolu epitelyumu solunum havası ile alınan birçok parçacık ve mikroorganizmaya karşı savunma bölgesidir (18). Birçok parçacık ve mikroorganizma ile ilk temas epitelyum dokusunda gerçekleşir (18). Bu nedenle epitelyum dokusunun hem patojenlere karşı engel olması hem de hava yolu ile alınan parçacıkların solunum kanallarından uzaklaştırılması gerekmektedir (18). Hava yollarında bu görevi mukus sağlar. Mukus havayolu epitelyumunda bulunan goblet hücrelerinden salınır (18). Goblet hücrelerinden salınan mukus silya hareketleri yardımıyla mukusu akciğerlerden dışarı süpürür (18). Havayollarının goblet hücreleri tarafından salınan mukus ile etkili bir şekilde temizlenebilmesi için bu hücrelerden salınan mukusun viskozitesi ve miktarı çok önemlidir (19). Goblet hücreleri tarafından salgılanan mukus silyaları kaplayacak şekilde yaklaşık 5µm kalınlıkta viskoelastik bir katman oluşturur (19).

2.1.1.3. Bazal hücreler

Epitel dokusu içerisinde bulunan bazal hücrelerin trakeobranşiyal epitelyumun bazal laminaya tutunmasını sağlamak ve epitelyumda kök hücre olarak görev yapmak üzere iki temel görevi vardır (20). Epitel dokusunda bulunan bazal hücreler ağırlıklı olarak geniş solunum yollarında bulunan büyük çekirdekli hücrelerdir ve bu hücreler diğer epitelyum hücrelerine farklılaşırlar (20). Bazal hücreler solunum epitelyumunda kök hücre görevi görerek diğer hücrelere kaynak oluştururlar (20). Yapılan çalışmalarda solunum yollarında bulunan epitelyum kalınlığı ile epitelyumda bulunan bazal hücre sayısı arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (21). Bazal hücreler solunum yollarında kök hücre gibi davranarak silyalı ve klara hücrelerine dönüşürler (22). Bazal hücreler aynı zamanda havayolları epitelyum dokusunun bazal zara tutulmasından sorumludur (23). Bazal hücreler bazal lamina ile silindirik epitelyum hücreleri arasında desmozom, hemidesmozom ve hücre iskelet mekanizmasını kullanarak bağlantı sağlar (23).

2.1.2. Hava yolu epitelinin görevleri

Klasik olarak hava yollarında bulunan epitelyumun görevi dış çevre ile akciğer dokusu arasında bir engel oluşturmak ve solunum yollarının işlevlerini düzenlemektir (14). Epitel dokusunda bulunan çeşitli hücrelerin ürettiği araçlar ve kimyasal ajanlar bazal membran ve üzerinde taşıdığı epitelyumu uyararak hava yollarının işlevlerini etkilemektedirler (14). Epitelyum çok miktarda ve çeşitli aracı lipidler, büyüme faktörleri, kemokin ve sitokin üretir (15). Herhangi bir nedenle, inflamatuvar araçların (sitokin, kemokin) epitelyum tarafından anormal üretimi astım gibi alerjik hava yolu hastalıkları ve kronik obstruktif akciğer hastalığı (KOAH) gibi kronik hava yolu hastalıklarının gelişiminde oldukça önemli role sahiptir (41). Çalışmalar astımlı bireylerden elde edilen bronş epitelyum hücrelerinin, sağlıklı hücreler ile karşılaştırıldıklarında anlamlı olarak daha yüksek oranlarda inflamatuvar sitokin ve adezyon molekülü salgıladıklarını göstermektedir (41).

Çalışmalar hava yolu epitelyum hücrelerinin fosfolipaz aktivitesi ile üretilen yağ asit ara ürünlerini önemli oranda içerdiklerini göstermiştir (24). Epitel hücreleri aynı zamanda yüksek oranda siklooksijenaz ve lipooksijenaz aktivitesine sahip olup, araziidonik asitten pro-inflamatuvar aktiviteleri olan bir dizi ekosonoid sentezlemektedirler (24).

Tablo 1. Bronşial epitel hücreleri tarafından üretilen moleküller ve bunları uyaran moleküller (14)

Moleküller		Uyarıcı moleküller
Lipidler	PGE ₂	Leukotrienes, bradykinin, O ₃
	PGF _{2x} , TXB ₂	PAF
	LtC ₄ , LtD ₄ LtE ₄ 9-HODE, B-HODE	ET-1, histamin
	Cytochrome P450-derived acosanoids	O ₃ , PAF
	IL-1, TNF α IL-6, IL-11, LIF IL-10	Virüsler, IL-1b, TGF β
Sitokinler	IL-8, GRO- α , GRO-8	TNF α , IL-1 β , virüsler,
Kemokinler	Rantes	TNF α , allerjen, rhinovirüs
	Mip-1 α	
	MCP-1,4	TNF α , IL-1 β
	Eotaxin-1, -2	Rhinovirüs
	TGF β	EGF, IL-1 β , hipoksi
Büyüme Faktörleri	EGF (family)	
	PDGF	
	GM-CSF, CSF-1, G-CSF	IL-4, IL-13
	IGF, bFGF	TGF β , IL-1 β
	Collagen I, IV	
Hücre dışı matriks proteinleri	FN, LN, Hyaluronan	Damage, EGF
	CD44	PDGF
	mmp-1, -2, -3	TNF α , PMA
	mmp-9, matrilysin (mmp-7)	Bakteri
	TIMP-1, -2	TGF β
	Endotelin	Endotoxin, pro-inflammatory cytokines, IL-6, TGF β
Peptid Aracılar	ICAM-1	IL-1b, TNF α
Adezyon Molekülleri	Ep-CAM	
	E, N, C-cadherins	
İntegrinler	α 1,2,3,4,5,6,8,9	EGF
	β 1,4,6,8	
Gazlar	NO, CO	IL-1 β , Allergen, TNF α , LPS
Diğerleri	Oksijen radikalleri	

2.1.3. Bronş epitel hücrelerinin elde edilmesi ve kullanılan yöntemler

Bronş epitel hücreleri, başta solunum yoluyla alınan araçılar ve hava yollarına yönelik zararların etkilerini araştırmak ve hava yolu hastalıklarının patogenezi araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar (25). Bu amaç için insan bronş epitelyum hücreleri (BEH) çeşitli yöntemler kullanılarak izole edilebilir ve kullanılabilir (25).

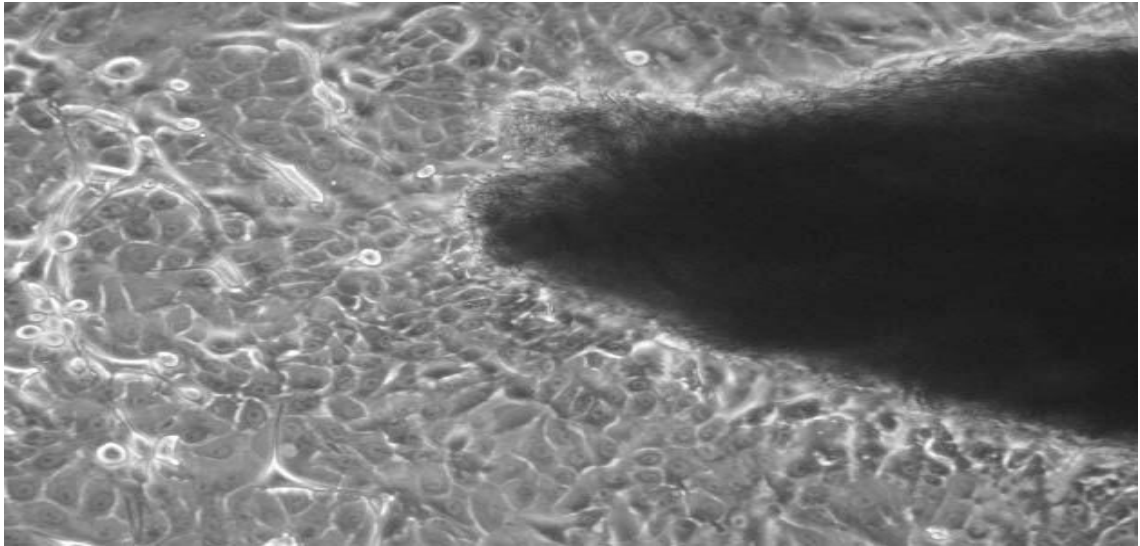
2.1.3.1. Fırçalama yöntemi ile BEH elde edilmesi

Bronş epitelyum hücrelerinin elde edilmesi için kullanılan yöntemlerden birisi fırçalama yöntemidir. Bu yöntemde bronkoskopi yardımı ile ana bronşlara fırçalama uygulanır, elde edilen hücreler daha sonra kollajen ile kaplı kültür kaplarına alınır (25). Kültür kaplarına alınan hücreler serumsuz, hormonla zenginleştirilmiş, penisilin ve

streptomisin içeren vasatta 37°C’de, % 5 CO₂ ‘li nemlendirilmiş ortamda inkübe edilir ve yeterli hacime ulaşan kültürler yapılacak çalışmalar için hazır hale gelirler (25).

2.1.3.2. Primer eksplant (çıkartılan parça) tekniği ile BEH elde edilmesi

Bronş epitelyum hücrelerinin elde edilmesi için kullanılan bir diğer yöntem ise primer eksplant tekniğidir (25). Lobektomi veya pnömonektomi uygulanan hastaların cerrahi eksplantında bulunan bronşlardan diseksiyon mikroskobu yardımıyla bronş epitelyum tabakası ayrılır (25). Ayrılan bu parçalar 1-2 mm³ veya 0.5-1 mm³ büyüklüğünde parçalara ayrılır (25). Elde edilen bu eksplantlar antibiyotik içeren hücre kültür vasatıyla en az üç kere yıkanır (25). Primer hücre kültür kaplarına her kapta 7-9 eksplant olacak şekilde konulur (25). Her üç günde bir kültür vasatı değiştirilerek hücrelerin çoğalması beklenir (25). Kültürler 2-3 haftanın sonunda yapılacak çalışmalar için kullanıma hazır hale gelirler (25).



Şekil 3. Yedinci günde, kültür ortamında doku eksplantı ve çevreye doğru çoğalan insan bronş epitel hücreleri (Hoffman Modulation Contrast Işık Mikroskobu)

2.1.4. Alveol epitelyum hücreleri

Akciğerin iç yüzey alanını kaplayan alveol epitelyum; alveolar tip 1 (AT1) ve alveolar tipII (ATII) hücrelerinden oluşur (26). AT1 ve ATII hücrelerinin morfoloji ve fonksiyonları birbirinden farklıdır (26). AT1 hücreleri CO₂ /O₂ değişiminin yapıldığı büyük ve yassı hücrelerdir (26). Bu hücreler alveolar yüzeyin yaklaşık %95’ini, alveolar epitelyumun yaklaşık %40’ını ve bütün akciğer hücrelerinin yaklaşık %8’ini

oluştururlar (26). Son yapılan çalışmalar ATI hücrelerinin alveolar sıvı dengesi ve su geçirgenliğinde önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Buna karşılık ATII hücreleri ATI hücrelerine göre daha küçük ve kübik yapıdadır (27). ATII hücreleri alveolar yüzeyin yaklaşık %5'ini, alveolar epitelyumun yaklaşık %60'ını ve akciğer hücrelerinin yaklaşık %15'ini oluşturur (27). ATII hücreleri sürfaktan sentez, salınım ve depolamasında görev alır (28). Bunun yanında dokuların içinde bulunan alveolar sıvıya iyon transferi yapar (28). ATII hücreleri akciğer hasarından sonra epitelyumdaki hasarı düzeltmek için ATI hücrelerine dönüşebilir (28). Ayrıca fetal akciğer gelişimi boyunca bu dönüşüm gerçekleşebilir (28). ATII hücrelerinden sentezlenen proteinlerdeki genetik mutasyon ya da eksiklik ciddi akciğer hastalıklarına neden olabilir (28).

2.1.5. Hava yolu epitel hücre hatları

Herhangi bir doku veya organdan alınacak numune hemen her zaman birden fazla hücre tipini bir arada bulundurmaktadır (33). Eğer hücreler kompakt bir dokunun içinde yer alıyorsa önce etrafındaki dokudan ayrıştırılması gerekir (33). Ayrıştırılan bu hücrelerin kültür ortamında çoğalmaları sonucu ortaya çıkan hücre kültürlerine, birincil hücre kültürü denilmektedir (33). Ancak omurgalı canlıların çoğunun hücreleri belli sayıdaki bölünmeden sonra çoğalamaz (33). Örneğin insan fibroblastları kültür ortamında 25-50 kez bölünürler (33). Bu özellikten dolayı birincil hücre kültürü ile elde edilen hücreler belli sayıda bölünme özelliğine sahiptir (33). Bununla beraber, laboratuvar ortamında bu hücreler telomerazlarının katalitik alt ünitelerini kodlayan gen ile bir araya getirilerek sınırsız üremeleri sağlanabilir (33). Böylece genetik değişiklik sonucu sonsuza dek bölünme özelliği kazanan hücrelere ölümsüzleştirilmiş (immortalize) hücreler denilmekte ve kültür ortamında hücre hatları (cell line) olarak adlandırılmaktadır (33). Bu hücreler laboratuvar ortamında istenilen miktarlarda çoğaltılıp kullanılabilirler (33). Hücre hatlarının en önemli özelliği kolay temin edilebilmeleridir (33). Bir kez elde edildiklerinde dondurulmak suretiyle ihtiyaç halinde çoğaltılarak kullanılabilirler (33). American Type Culture Collection (ATCC) gibi kurumlardan ücret karşılığında bu hücre hatları elde edilebilmektedir (33). En önemli istenmeyen özellikleri ise genetik yapıları değiştirilmiş hücreler oldukları için bünyede sahip oldukları genotipik ve fenotipik özelliklerinin tamamını taşımazlar (33).

2.1.5.1. A549 hücreleri

İnsan akciğer epitelyum karsinoma hücreleri olan A549 hücre dizileri tipII alveolar epitel hücrelerine (ATII) benzer özellikler göstermektedir (28). Bu hücreler, 1972 yılında Giard D.J. ve arkadaşları tarafından 58 yaşında, beyaz kafkas ırkından bir erkeğin kanserli doku eksplantından elde edilmiştir (28).

A459 hücreleri yapısında keratin bulundurur (28). Keratin varlığı immünoperoksidaz boyama ile gösterilebilir (28). Bu hücreler lesitin sentezleyebilir ve yüksek oranda doymamış yağ asiti içerirler (28). Bunlar sitidin-difosfokolin yolağı tarafından kullanılır ve hücrelerin fosfolipit zarının korunmasında önemlidir (28).

2.2. Hava Kirliliği

Hava kirliliği; soluduğumuz dış havada kükürt dioksit (SO_2), partiküler madde (PM), nitrojen oksitleri (NO_x) ve ozon (O_3) gibi kirleticilerin çevre ve sağlık üzerinde olumsuz etkileri yapacak düzeylerde olması şeklinde tanımlanabilir (34). Bu kirlilik atmosferde doğal süreçleri bozmakta ve toplum sağlığını olumsuz etkilemekte olup, dünyada son 30 yıldır hava kirliliği düzeyleri düzenli olarak izlenmesine ve mücadele edilmesine rağmen özellikle büyük metropollerde kirlilik düzeyleri halen güvenli kabul edilen sınırların üzerinde seyretmektedir (34). Hava kirliliği, dünya genelinde özellikle endüstriyel tesislerden, konutlarda ısınma amaçlı yakıt tüketiminden ve motorlu taşıt egzozlarından kaynaklanmaktadır (1). Günümüzde hava kirliliği ülkelerin sanayi gelişimlerine paralel olarak insan sağlığını tehdit eden en büyük problemlerden biri haline gelmiştir. 1980' li yıllara kadar dünyada 1,3 milyar kişinin hava kalite standartlarının üstünde kirlilik içeren şehirlerde yaşadığı saptanmıştır (1). Dünyada hava kirliliğinin 2030 yılına kadar beş katlık bir artış göstereceği beklenmektedir (1). Özellikle gelişmekte olan bölgelerde hızlı kentleşme ve enerji tüketiminin artışı ile birlikte hava kirliliği de artmaktadır (1).

2.2.1. Hava kirleticileri

19. yüzyılın sonlarında kömür, petrol gibi fosil yakıtların enerji üretimi için kullanımının önemli ölçüde artması sonucunda SO_2 , CO_2 , ve partiküler madde gibi kirleticilerin atmosferdeki konsantrasyonları da giderek artış göstermiş, bu artış bilhassa

20. yüzyılın ikinci yarısından sonra küresel ölçekte hava kirliliğinin önemli derecede artışına neden olmuştur (35).

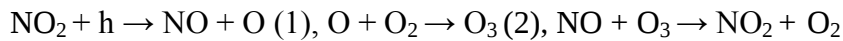
2.2.1.1. Kükürt dioksit (SO₂)

Kükürt dioksit (SO₂), renksiz, keskin kokulu reaktif bir gaz olup kömür, petrol gibi kükürt içeren yakıtların özellikle enerji santralleri ve endüstride yakılması sonucu açığa çıkmaktadır (36). Genel olarak, en yüksek SO₂ derişiklikleri, büyük endüstriyel kaynakların yakınında bulunur. Kükürt dioksit atmosferde taşınma sırasında sülfürik aside dönüşebilmektedir (36). Günümüzde sadece New York şehrinde yılda 1,5 milyon ton kükürdün atmosfere verildiği ABD’de yılda yaklaşık 26 milyon ton kükürt, İngiltere’de ise yılda yaklaşık 6 milyon ton SO₂ atmosfere salınmaktadır (36). Tüm dünyada ise yılda yaklaşık olarak 80 milyon ton SO_x atmosfere verilmektedir (36). Bu, dünya SO₂ derişikliklerini her yıl 0,006 ppm olarak arttırmaktadır (36). Asit ve sülfatlar yağış yolu ile ancak 43 günlük bir süre içerisinde atmosferden uzaklaştırılmaktadır (36).

SO₂ ile yapılan hayvan çalışmaları, yüksek derişikliklerinin havayolu epiteline zarar verdiği, siliyer taşınımını yavaşlattığı, bronkokonstriksiyon ve ödem meydana getirdiği görülmüştür (41). İnsan çalışmaları ise, astımlıların SO₂’ye daha hassas oldukları ve SO₂’nin artan derişiklikleri ile FEV1’deki düşmenin ilişkili olduğu görülmüştür (41).

2.2.1.2. Ozon (O₃)

Ozon, güçlü bir oksidatif ajan olup, troposfer tabakasında güneş ışınları ile NO₂ ve hidrokarbonların yer aldığı bir dizi karmaşık reaksiyon sonucu oluşmaktadır (15).



Ozonun kent merkezlerindeki düzeyi, trafiğin oluşturduğu NO_x’lerin O₃’ü tutması sonucu, kırsal kesimlerdeki düzeyine göre daha düşük olabilmektedir (38).

O₃, sistemik inflamatuvar yanıt ile akciğer fonksiyonlarında bozulma gibi etkilerle pulmoner sistem yanında, ateroskleroz gelişimine sebep olarak kardiyovasküler sistemde de zararlı etkilere neden olduğu görülmüştür (37).

O₃ ile yapılan laboratuvar kabin çalışmaları, bu gazın akut inhalasyonunun sağlıklı kimselerde ve daha belirgin olarak da astımlılarda çeşitli solunum sistemi semptomlarına neden olduğu ve solunum fonksiyon testleri (SFT)’nde obstrüksiyon ile uyumlu birtakım değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (38). Hava kirleticilerinin bronş

reaktivitesi üzerine etkilerini araştıran çalışmalarda, değişik dozlardaki O₃ ve NO₂'ye maruziyet, hafif astmatiklerin inhale ettikleri allerjene gösterdikleri cevabı artırmıştır (38). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada, tekrarlayan O₃ maruziyetinin astımlıların semptomlarında artışa ve solunum fonksiyonlarında bozulmaya yol açtığı saptanmıştır (34). O₃ ile yapılan insan çalışmalarında, astımlı gönüllülerin hava yolu sıvılarında eozinofil ve eozinofil ürünlerinin arttığı saptanmıştır (34). Ozonun, ayrıca insan ve hayvanlarda allerjenlere duyarlılığı arttıran Ig E sentezini arttırdığı görülmüştür (39). O₃'nun astımlı hastaların bronş mukozasında inflamatuvar sitokin salınımını arttırdığı bulunmuştur (40). Sağlıklı ve astımlı gönüllülerden elde edilen bronş epitel hücre kültürleri değişik derişikliklerde O₃'a maruz bırakıldığında, bu gazın sadece astmatik kültürlerin geçirgenliğini arttırdığını bulunmuştur (41). Diğer yandan bu gaz hem sağlıklı hem de astımlıların hücre kültürlerinden inflamatuvar aracı salınımını artırırken, astımlılardaki artışın daha belirgin olduğu bildirilmiştir (42). O₃ ile yapılan *in vitro* alışmalarda, bu gazın insan akciğer fibroblast hücre hatlarında hyaluronan gibi inflamatuvar aracıların sentezini arttırdığı bildirilmiştir (43). Diğer yandan, bu gaza maruziyet sonrasında makrofaj benzeri hücreler ve bir insan bronş epitel hücre hattı (BEAS-S6) ile birincil bronş epitel hücrelerinden (BEH) platelet aktive edici faktör (PAF) yapımı artmaktadır (43). Bir başka çalışmada, 0.4 ppm (parts per million [milyonda bir]) O₃'nun alveolar makrofajlardan interlökin (IL)-1 ̢, IL-6, IL-8 ve tümör nekrozis faktör (TNF)- ̡ salınımını anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur (43).

2.2.1.3. Nitrojen oksitler (NO_x)

NO_x'ler, büyük oranda fosil yakıtların santrallerde (ısı ve elektrik üretimi) ve motorlu araçlarda yakılması sonucu ortaya çıkmaktadır (38). NO ve NO₂ şeklindeki atmosferik derişikliklerinin birleşik değeri NO_x ile temsil edilmektedir (38). Dış atmosfer koşullarında NO_x, O₃ gibi oksidanların etkisiyle hızla NO₂'ye dönüşmektedir. NO₂, karakteristik keskin kokusu olan kırmızımsı kahverengi bir gazdır ve güçlü bir oksidandır (38). *İn vitro* alışmalar, NO₂'nin ozondan daha az olmak üzere oksidan yolakları aktive ettiğini doğrulamıştır (38).

Yapılan alışmalarda, NO₂'nin artmış düzeylerinin astımlı hastalarda ve daha belirgin olarak bütün solunum sistemi rahatsızlıklarına bağlı ölüm riskinde artışlara neden olduğu görülmüştür (38). NO₂ çalışmalarında, bu gazın soluklanmasının sağlıklı kimselerin mukosiliyer eşik değerini azalttığı ve akciğer sıvılarında lenfosit, mast

hücreleri, polimorfonükleer lökosit (PNL) ile çeşitli inflamatuvar araçların düzeylerinde artışa yol açtığı gösterilmiş, astımlıların bu etkilere karşı daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (38).

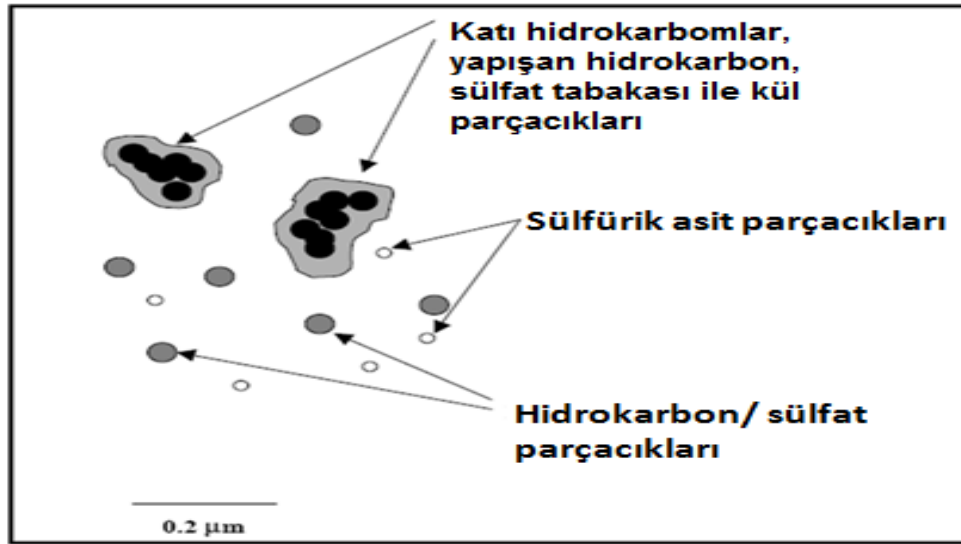
2.2.1.4. Partiküler madde (PM)

Havada bulunan parçacıklar, önemli çevresel etkileri dolayısıyla izlenmesi ve kontrol edilmesi gereken bir hava kirletici grubudur (65). Özellikle havada uzun süre askıda kalabilen 10 mikrondan küçük parçacıklar (PM₁₀) ve solunum yollarına ulaşabilecek büyüklükteki parçacıklar (PM_{2,5}) dünyada son yıllarda hızla artan sayıda çalışmaya konu olmuştur (65).

2.2.1.4.A. Dizel egzoz parçacıkları (DEP)

Özellikle dizel motorların kullanıldığı kentsel alanlarda, dizel egzoz parçacıkları (DEP) muhtemelen havadaki PM'nin ana bileşenini oluşturmaktadır (66). DEP kirliliği, verimliliği ve maliyetinin düşük olması nedeniyle dizel kullanan motorlu araç sayısındaki artış sonucunda ciddi bir sorun halini almıştır (67). Dizel araç egzozundan çıkan atıklar incelendiğinde, karmaşık bir gaz ve parçacık karışımından oluştuğu ve içinde yüzlerce değişik madde bulunduğu görülür (67). Gaz bileşenler, CO, NO_x, sülfür, düşük molekül ağırlıklı hidrokarbonlar (aldehidler, benzen, poliaromatik hidrokarbonlar)'dan oluşur (67). Dizel egzozundan çıkan parçacıklar, elemental karbondan oluşan bir çekirdek ve bu çekirdeğin üzerine yapışan organik bileşikler ile küçük miktarlardaki sülfat, nitrat, metaller ve diğer eser elementlerden oluşurlar (67). DEP, küçük çaplı (PM_{2,5}) ve çok sayıda 'ultra' küçük (çapı 0.1 µm'den küçük) parçacıklardan oluşur (67).

Bu tez çalışması için kullanılan DEP Dr. Takano tarafından hediye edilmiş olup, kendi laboratuvarlarında elde edilmiştir (Environmental Health Sciences Division, National Institute for Environmental Studies, Ibaraki, Japan). DEP, 10 ton yük altında 1500 devirde çalışan, standart dizel yakıt kullanan 4JB1-tipi, hafif yüklü, dört silindirli, 2.74-L Isuzu dizel motordan (Isuzu Automobile Co, Tokyo, Japonya) toplanmıştır.



Şekil 4. DEP'nin şematik diyagramı (67).

2.3. Hücre Döngüsü (Cell cycle) ve Programlı Hücre Ölümü (Apoptosis)

Hücre döngüsü, çoğalmak (prolifere olmak) üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal işlevlerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir (29). Bir döngüye giren hücre, morfolojik ve genetik olarak birbirine tıpa tıp benzeyen iki hücre oluşumuyla döngüyü tamamlar (29). Hücre çoğalması hücre döngüsü içinde yer alan bazı kontrol noktaları (check-points) tarafından düzenli olarak kontrol edilir (29). Hücre döngüsü, çoğalma, farklılaşma (diferansiyasyon) ve programlanmış hücre ölümleri gibi temel hücresel işlevleri düzenlediğinden büyüme ve doku çevrimi ile yakın ilişki içinde bulunur (29). Bu düzenleme özelliğinin olması organizmadaki hemen hemen her tür fizyolojik (örneğin doku homeostazisi) ve patolojik durumlarda (örneğin tümör oluşumu) hücre döngüsünün ne denli kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir (29). Nitekim kanserlerde hücre döngüsünün düzenleyici proteinleri olan siklinler veya siklin-bağımlı kinaz durdurucularının (CDI) düzeylerinde anormallikler saptanmıştır (29).

2.3.1. Hücre döngüsü (Cell Cycle)

Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra siklus G1-S-G2 (interfaz) ve M (mitoz) şeklinde tekrarlanır (69). Bu süreçte hücre uyarımı ve büyüme meydana gelmekte veya bölünme uyarısı almadıkları sürece istirahat fazı G0 da durmaktadırlar (69). G1, S, G2 fazları (İnterfaz) hücre siklusunun %90'nını kapsar ve 16-24 saat sürer (69). Mitoz bölünme ise 1-2 saat sürmektedir (69).

G1 fazı, hücre döngüsünün süresi açısından en değişkenlik gösteren fazıdır. Bu fazın süresi döngünün en önemli belirleyicisidir (29). G1 fazında hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, uyarıları alır ve büyümeyi tetikler (29). Bu fazda DNA sentezi (replikasyonu) için hazırlık yapılır (29). RNA ve protein sentezi olur (29). Bu fazda hücre ya bölünmek, ya farklılaşmak, ya da ölmek için karar verir ve bazı genlerde değişiklikler başlar (29). Örneğin, bölünecek hücrede DNA polimeraz veya nükleotid sentezinde gerekli olan dihidrofolat redüktaz gibi bazı enzimlerin genlerindeki ilerlemeleri takiben bu genlerin ürünleri G1/S sınırında artmaya başlar (29). Bu fazda gerçekleşen değişiklikler başlıca c-fos, c-myc ve c-jun gibi transkripsiyon faktörlerinin genlerinde görülür (29). Bu transkripsiyon faktörleri AP1 bölgeleri olarak da bilinen düzenleyici DNA dizilerine bağlanırlar. Böylece, AP1 bölgelerini taşıyan genlerin ilerlemesi sonucu siklin ve CDK'ların işlevsellikleri sağlanır (29).

S fazında, hücre DNA'sını hızla iki katına çıkarır (29). Hızlı olmasının nedeni, DNA iplikçiklerinin birbirinden ayrılması esnasında bazılar, çeşitli ilaçlar veya mutajenler gibi dış ajanların etkisine açık hale gelirler (29). Bu yüzden DNA sentezi bir kez başladı mı hızla bitirilmelidir (29).

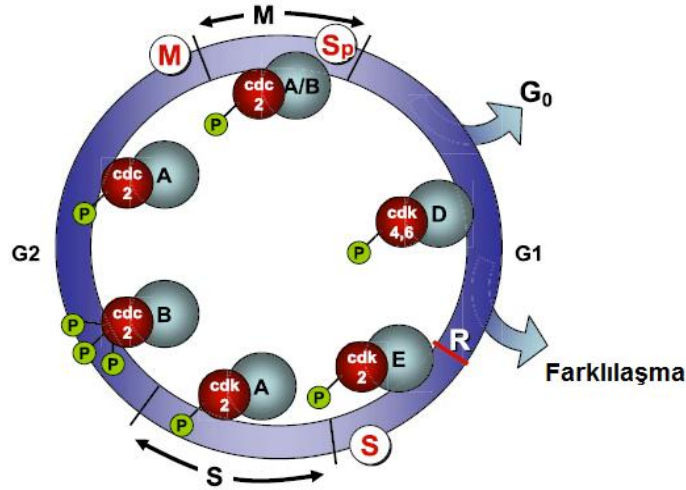
G2 fazında, bir önceki (S) fazda iki katına çıkan DNA ve kromatin proteinleri yoğunlaşırlar ve kardeş kromatidler halinde paketlenirler (29). Tamir mekanizmalarından kaçmış hasarlı DNA veya replike olmamış DNA bu fazda kontrol edilir (29).

M fazında, “sister” kromatidler düzgün bir şekilde bir hizaya gelirler ve ardından çeşitli aşamalardan geçilerek (profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez) hücre ikiye bölünür (29).

2.3.1.1. Siklinler

Memeli hücrelerinde hücre döngüsünün düzenlenmesinde siklin D, siklin E, siklin A ve siklin B rol oynamaktadır (31). Siklinler (A, B, D ve E) hücre döngüsünün çeşitli fazlarında periyodik olarak bir taraftan sentez edilirlerken diğer taraftan da yıkılırlar (31). Bu yüzden de siklinler olarak isimlendirilmişlerdir (31). Siklinlerin periyodik yapım ve yıkımları, dolayısıyla ilişkide bulundukları CDK (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7 ve CDK25)'ların işlevlerinin düzenlenmesini sağlar (31). Siklin D, E, G1 /S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiğinde hızla

yıkılır, Siklin A ve B, S/G2 /M faz geçişlerinde sentezlenir, siklin A1 mayoz ve embriogenesis de, siklin A2 çoğalan vücut hücrelerinde bulunur (31). Siklin B1'in siklin B2'nin fonksiyonlarını kontrol ettiği düşünülmektedir (31).



Şekil 5. Memeli hücrelerinde hücre döngüsünde farklı fazlar arasındaki geçişlerin siklin-CDK bileşenleri tarafından düzenlenmesi. Farklı siklinler hücre döngüsü boyunca sentezlenirler ve farklı CDK'lar ile birleşirler (51).

2.3.1.2. Siklin bağımlı kinazlar (CDK)

Siklin bağımlı kinazlar kendi başlarına bulunduklarında işlevsizdirler. Ancak, siklinlere bağlandıklarında işlevleşir ve böylece işlevsel siklin-CDK bileşenleri meydana gelir (29). Siklinler siklin-CDK bileşenlerinin düzenleyici alt birimleri, CDK'lar ise katalitik alt birimleridir (31). CDK, siklin (yapısal proteini) ve kinazdan (enzim) oluşmaktadır. Her bir CDK katalitik alt birimi farklı düzenleyici alt birimle bir araya gelebilir (31). Hücre döngüsü boyunca kinaz bileşenlerinin işlevsellik düzeyi değişir. Bu nedenle hücreler DNA'larını bir kez replike eder ve kromozomların yavru hücrelere uygun dağılımı sağlanır (31). CDK'ların aktiviteleri sadece siklinlerle düzenlenmez ayrıca özgün fosforilasyon/defosforilasyona yol açan başka yollarla da düzenlenir (31).



Şekil 6. Siklin bağımlı protein kinaz (CDK) sistemi (29)

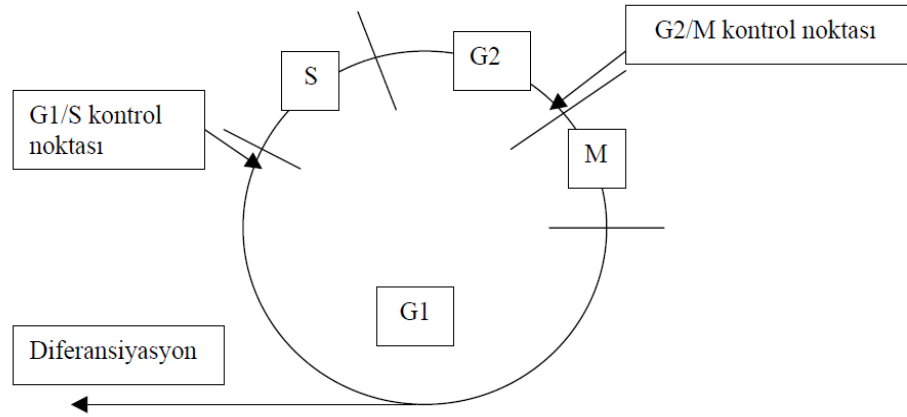
2.3.1.3. Siklin bağımlı kinaz durdurucuları (CDKI)

Hücre döngüsü durdurucu proteinleri (CDKI) CDK işlevini kontrol eder. Bu proteinler cyc-cdk bileşimini ve DNA replikasyonunu durdurur. CDKI'lar hücre döngüsünü frenlediklerinden tümör baskılayıcı genlere de adaydır (31). Etkiledikleri CDK ve durdurucu mekanizmalarına göre iki farklı CDKI ailesi vardır. Bunlardan ilk 4 ailesinde p15, p16, p18, p19 G1 fazındaki CDK4 ve CDK6'yı bağlayarak cyc-cdk bileşimini engeller. Cip/Kip ailesinde ise p21, p27 ve p57 bulunmaktadır. Cip/Kip ailesi cyc-cdk bileşimini durdurmaktadır (31).

2.3.2. Hücre döngüsünde kontrol noktaları (Checkpoint)

Hücre döngüsünün ilerlemesini veya durdurulmasını sağlayan noktalara kontrol noktası (checkpoint) denir (30). Bu kontrol noktalarında meydana gelen değişiklikler mutant hücre çoğalmasına neden olur (30). Hücre döngüsünde bir faz tamamlanmadan sonraki faza geçilirse genetik materyal tam ve doğru kopyalanmadığı için hücrede hasar meydana gelebilir (30). Hücre döngüsünde G1-S geçişinde, G2-M geçişinde ve metafaz-anafaz geçişinde kontrol noktaları vardır (30). Bu kontrol noktalarında hücrenin döngüye devam edip etmeyeceği kararı verilir (30). Normal hücrelerde DNA

hasarı, DNA replikasyonu olmadan önce G1 fazında tamir edilir (30). DNA hasarı olan hücrelerin S fazına geçişi p53 bağımlı bir dizi reaksiyonla durdurulur (30). Eğer hasar tamir edilemez ise hücre programlanmış hücre ölümüne uğrar (30). Hatalı p53 bulunan hücrelerde ise mutasyonlar ortaya çıkar ve tümör gelişir. Kontrol noktaları, S fazındaki DNA replikasyonunu ve mitoz sırasındaki kromozom ayrılmasını düzenler. Eğer bu işlemlerde hata olursa hücre döngüsü durdurulur (30).



Şekil 7. Hücre döngüsündeki kontrol noktaları (check point) (29)

2.3.3. Programlanmış hücre ölümü (Apoptozis)

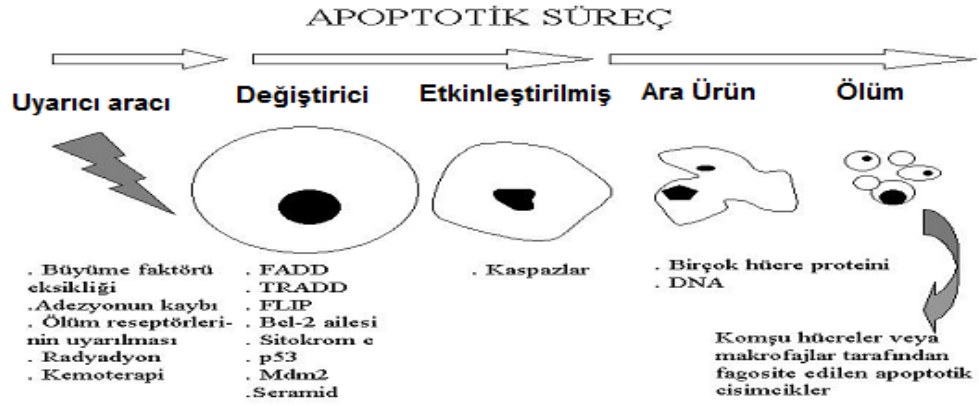
Apoptozis yada programlı hücre ölümü erişkin dokuların korunmasında ve embriyonik gelişimde anahtar rol oynayan normal fizyolojik bir biçimdir (30). Programlı hücre ölümü hücre çoğalmasının dengelenmesi ve dokularda var olan hücre sayısının sabit tutulmasından sorumludur (30). DNA hasarında programlı hücre ölümü kanser gelişimine yol açabilecek mutasyonları taşıyan hücreler gibi potansiyel zararlı mutasyonları taşıyan hücreleri ortadan kaldırabilir (30). Programlı hücre ölümü sırasında kromozomal DNA, genelde nükleozomlar arasından kesilmesi sonucunda parçalara ayrılır (30). Kromatin yoğunlaşır ve çekirdek o zaman küçük parçalara bölünür. Son olarak hücre büzülür ve apoptotik cisimcikler denilen zarla çevrilmiş parçalara ayrılır (30). Bu gibi apoptotik hücreler ve hücre parçaları hem makrofajlar hemde komşu hücreler tarafından kolayca tanınır ve yutulur, böylece apoptozis ile ölen hücreler dokular tarafından etkin bir şekilde yok edilir (30).

2.3.3.1. Programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesi

Programlı hücre ölümü çok sayıda ve çeşitte aracı tarafından düzenlenir. Bunlar arasında, bazı iyonlar (kalsiyum), moleküller (seramid), genler, proteinler ve hatta organeller (mitokondri) bulunmaktadır (29). Bazı araçlar hücre tipine özgüdür, bazıları da apoptotik uyarının çeşidine göre farklılık gösterebilirler (29).

p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı (tek veya çift sarmal kırıklarında, nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre döngüsünü G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır (29). Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 programlı hücre ölümünü uyarır (29). p53'ün programlı hücre ölümünü uyarması Bax'ın gen ifadesini artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir (29).

Kaspaz (caspase)'lar, zimojen (ham öncül) olarak sitoplazmada bulunan ve işlevsel merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimlerdir (29). Kaspazlar birbirlerini tetikleyerek bir silsile preteolitik bir reaksiyon dizisine neden olurlar (29). Bazıları (Caspase 2, 8, 9, 10) tetikleyici kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (3, 6, 7) etkinleştirilmiş kaspazlar olarak bilinir (29). Tetikleyici kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm uyarılarını etkinleştirilmiş kaspazlara naklederler. Etkinleştirilmiş kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin, nükleer zar proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (29).



Şekil 8. Programlı hücre ölümünün genel görünümü (29).

2.3.3.2. Programlı hücre ölümü ile nekrozis in karşılaştırılması

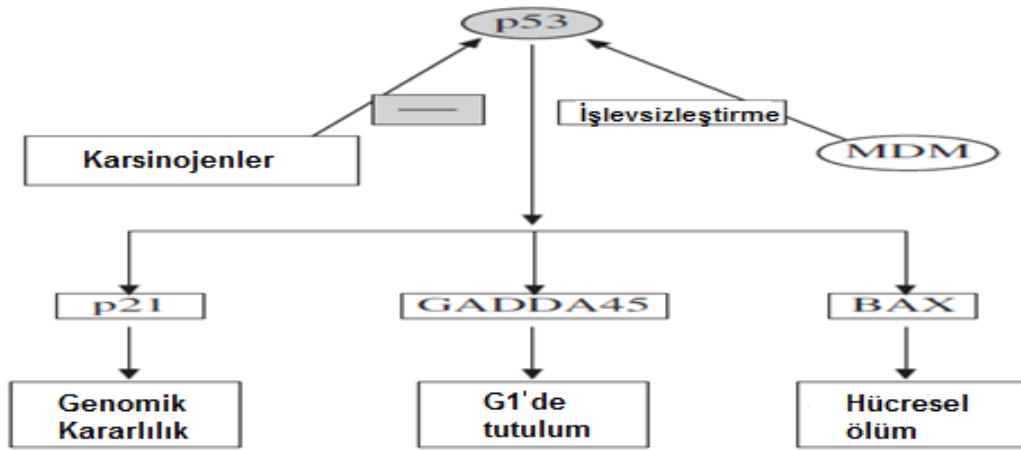
Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen programlı hücre ölümü hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir (30). Programlı hücre ölümünü ile ölen hücreler dokular tarafından etkin bir şekilde yok edilir (29). Buna karşın nekrozis te akut yaralanma sonucunda ölen hücreler şişer ve patlar, hücre içerikleri dış ortama salınır ve inflamasyona neden olur (29).

Tablo 2. Nekrozis ve programlı hücre ölümünün karşılaştırılması. TNFR-1 (tümör nekrozis faktör alması-1) (29)

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Yol açan nedenler	- İskemi - Hipertermi - Hipoksi - Viral enfeksiyon - Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları - Şiddetli oksidatif stres	- Büyüme faktörü eksikliği - Hücre yaşlanması - HIV, Kanseri ilaçları - Radyasyon - Yüksek doz glukokortikoid - Fas veya TNFR-1 almasılarının işlevselleşmesi - Sitotoksik T lenfositler - Çok şiddetli olmayan oksidatif stress
Morfolojik özellikler	- Hücre zarı bütünlüğünün kaybı - Kromatin değişimi Hücre şişmesi - Organellerin parçalanması - Endoplazmik retikulumun genişlemesi - Büyük vakuollerin oluşumu - Hücre parçalanması	- Bozulmamış hücre zarı - Kromatinin nükleer zar civarında toplanması ve yoğunlaşması - Hücre küçülmesi - Organellerde parçalanma yok - Hücrenin bozulmamış organelleri içeren zarla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	- Bozulmuş iyon dengesi - ATP gerekmez (pasif süreç) +4 °C'de gerçekleşebilir - DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde kirliliği görüntüsü) - Hücre parçalanması sonucu DNA'nında parçalanması	- İyi kontrollü, bazı işlevselliklerin ve enzimatik basamakların olması - ATP gereklidir (aktif süreç) +4 °C'de gerçekleşmez - DNA nükleozom içi alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır mono ve oligonükleozomlara ayrılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven düzeni = apoptozisin önemli belirtici)
Diğer özellikler	- Hücreler gruplar halinde ölür - Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir - Lizozomal enzimler salınır - İnflamasyona neden olur	- Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür - Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir. - Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler - İnflamasyon görülmez

2.3.3.3. Hücre döngüsü ile programlı hücre ölümünün bağlantısı

Bu bağlantıda anahtar faktör bir tümör baskılayıcı gen ürünü bir protein olan p53'dür (29). Normalde esas işlevi, DNA bir şekilde (radyasyon veya bazı ilaçlar etkisiyle) hasarlandığı zaman, hücre döngüsünü durdurup hücrenin hasarlanmış DNA'sını tamir etmesi için ona zaman kazandırmasıdır (29). Bu yüzden gen koruyucusu "guardian of the genome" olarak da tanımlanır (29). p53 bilindiği gibi kanser hastalarında mutasyonu en sık görülen proteindir ve kanserlerin %50-55'inde mutant'dır (29). p53 normal olarak bir CDKI'ü olan p21'in sentezini artırarak hücre döngüsünü durdurur (29). p21, siklin-CDK bileşenine bağlanarak bileşeni işlevselleştirir. Böylece, bu bileşen pRb'yi fosforile edemeyeceğinden E2F ailesi de pRb'den ayrılamayacağı için döngü ilerletici işlevini yerine getiremez ve sonuçta hücre döngüsü durur (29). Hücre döngüsünün durması hücreye zaman kazandırır ve hücre hasarlanmış DNA'sını tamir eder. Ama hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse bu kez p53 hücreyi apoptozise götürür (29).



Şekil 9. P53 tümör baskılayıcı gen yolu (32)

2.3.3.4. Onkogenler

Onkogenler, protoonkogen denen normal hücresel genlerden gelişir (32). Protoonkogenlerin kodlanmış protein ürünleri genel olarak hücre uyarımında ve hücre büyümesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar (32). Protoonkogenler değişik yollarla işlevsel hale gelerek onkogen haline gelirler (32). Genin yapısal bir bölgesinde değişiklik sonucu farklı işlev gören bir protein sentezlenir (32). Bu tip değişiklikler sıklıkla nokta mutasyonları sonucunda oluşur ve en sık ras onkogen ailesinde görülür (32). Bir başka mekanizma da, genin gen ifadesini düzenleyen bölgede oluşan bir

değişiklik sonucu, yapısal olarak normal olmasına karşın sürekli olarak uyarılma sonucu gen ürününün aşırı miktarda üretilmesidir (32). Kromozom translokasyonlarında ise kromozomun bir bölgesi koparak yer değiştirir. Genin yeni yerleştiği bölge, devamlı uyarı alan bir genin regülatuar bölgesinin kontrolü altında ise sürekli uyarılacaktır. Gen amplifikasyonu ile de hücre içindeki DNA miktarı artar (32).

2.3.3.4.1. Myc ailesi

Myc genleri, DNA' ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlar (32). Bu proteinler hücre çoğalması ve farklılaşmasında ve etkilidirler ve DNA sentezinin başlamasında rol alırlar (32). Klonlandıkları kültürlerle ve elde edilme şartlarına göre bu genler, c-myc, N-myc ve L-myc den oluşur (32).

2.3.4. Çalışılan gen bölgeleri

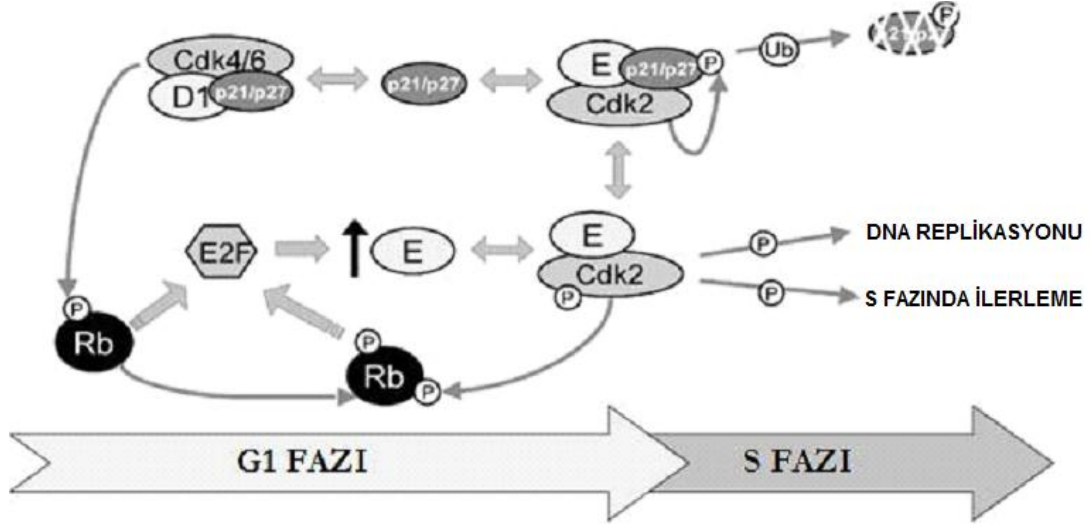
Bu tez çalışmasında Siklin bağlı kinaz 2 (CDK2), Siklin-E1 (CCNE1), (Mitojen aktif protein kinaz 2) (ERK2), Mitojen aktif protein kinaz 9 (JNK2), Nükleer faktör NF-kappa-B (NFKB1), proto-onkogen protein c-myc, Siklin bağlı kinaz inhibitörü p21 olmak üzere 7 tane gen bölgesi RT PCR yöntemiyle gen ifadesi miktarları belirlenmiştir.

Tablo 3. Çalışılan gen bölgelerinin standart adları, tam adları ve alternatif adları (71)

Standart Adı	Tam Adı	Diğer Adları
CDK2	Siklin bağlı kinaz 2 (p33 protein kinase)	Cell division kinase 2, p33, CDK2
CCNE1	G1/S Siklin-E1	CCNE, cyclin Es, cyclin Et
MAPK1	Mitojen-aktif protein kinaz 1 (Extracellular signal-regulated kinase 2), (ERK-2) (Mitogen-activated protein kinase 2)	ERK, p38, p40, p41
MAPK9	Mitojen-aktif protein kinaz 9 (Stress-activated protein kinase JNK2) (c-Jun N-terminal kinase 2)	JNK2, p54a, SAPK, JNK2A
NFKB1	Nükleer faktör NF-kappa-B p105 subunit (DNA-binding factor KBF1)	p50, KBF1, p105, EBP1
MYC	Proto-onkogen protein (c-Myc) (Transcription factor p64)	MRTL, c-Myc, bHLHe3, myc proto-oncogene protein
CDKN1A	Siklin bağlı kinaz engelleyici 1 1 , (p21) (CDK-interacting protein 1)	P21, CIP1, SDI1, WAF1

2.3.4.1. Siklin E1

İnsan siklin E ilk olarak cDNA' sı 1991 yılında cDNA kütüphaneleri taramalarında tanımlandı (44). Sonraki çalışmalar siklin E nin hücre döngüsü boyunca G1 evresinde en yüksek seviyeye ulaştığını kanıtladı (44). G1 evresindeki siklin E seviyesi, yüksek enzimatik işlevli CDK-siklin E bileşimi ile yakından ilişkilidir (44).



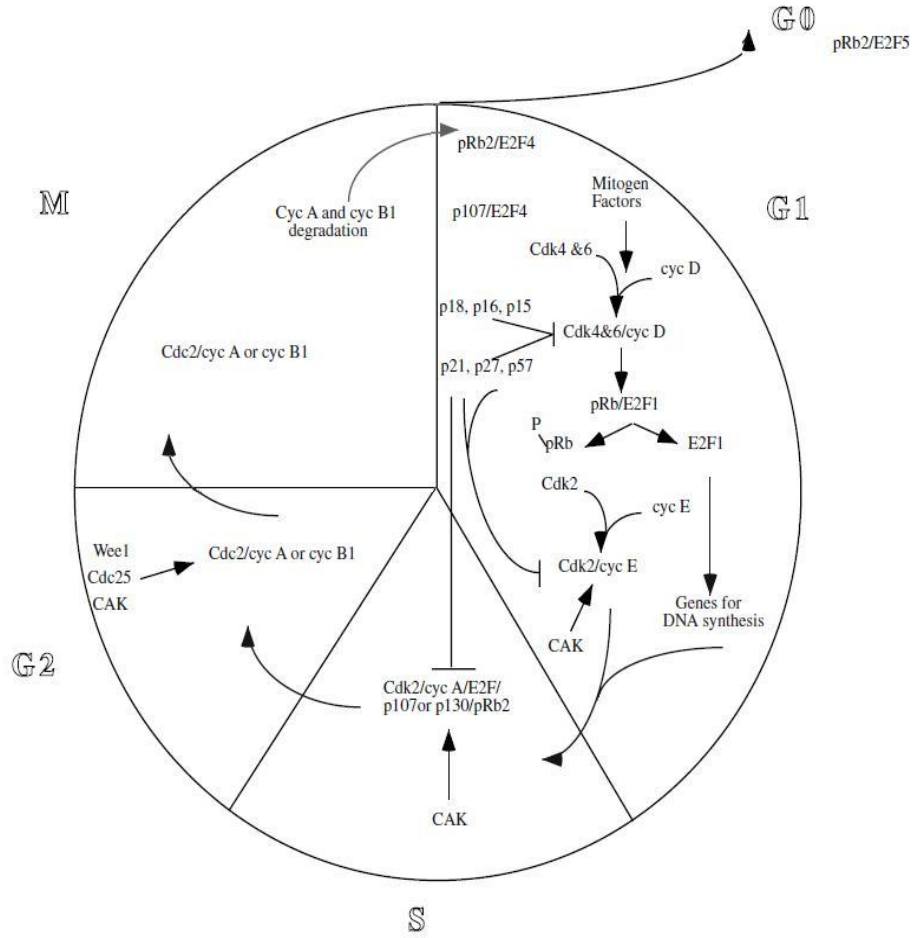
Şekil 10.Hücre döngüsünde G1fazından S fazına geçişin kontrolü (45). İlk basamakta siklin D-CDK4/6 bileşimi Rb yi fosforiller (45). Ardından siklin E-CDK2 bileşimi Rb yi fosforilleyerek E2F işlevsel hale getirilerek G1 den S fazına geçiş tamamlanır (45).

2.3.4.2. Siklin bağılı kinaz 2 (CDK2)

CDK2'ler prolin bağılı serin-treonin protein kinazlar olup ökaryotik hücre bölünmesinde çok önemli rol oynarlar (46). Siklin E formları CDK2 ile bileşim oluşturur. Bu bileşimin görevi düzenli bir şekilde G1 den S fazına geçişi sağlamaktır (47).

2.3.4.3. Siklin bağılı kinaz engelleyici 1 (P21)

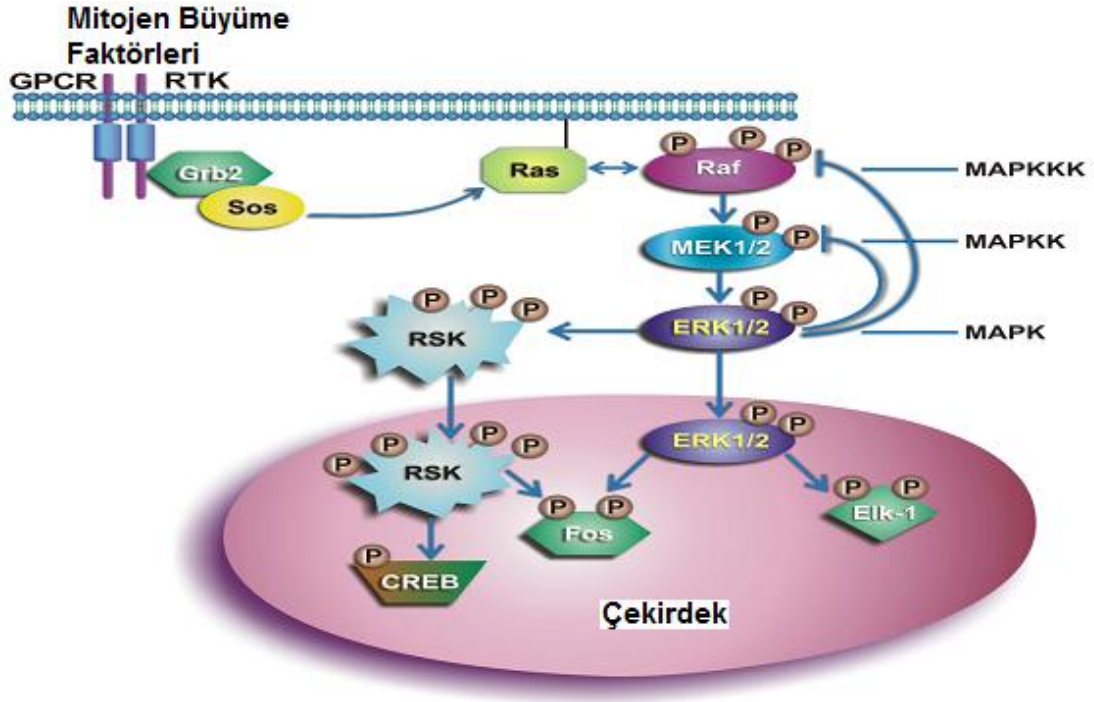
Son zamanlarda memelilerde yapısal ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılmış iki tip siklin bağımlı kinaz engelleyici ailesi tanımlanmıştır (49). Kip ailesini p21, p27 ve p53 oluştururken Ink4 ailesini ise p16, p15, p18 ve p19 üyeleri oluşturur (49). Siklin bağılı kinaz engelleyici p21, p53'ün ana hedefidir (50). DNA hasarı sonrası p53 bağımlı hücre döngüsünün durmasında anahtar rol oynar (50). p21 esas olarak siklinE/CDK2 bileşimine karşı olarak hücre çoğalmasını durdurur (50).



Şekil 11. Hücre döngüsü boyunca siklinler, CDK'lar ve CKI'leri arasındaki ilişkilerin gösterilmesi (52).

2.3.4.4. Mitojenin tetiklediği protein kinaz 1 (MAPK1)

MAPK1 hücre farklılaşması, hücre büyümesinin durdurulması ve programlı hücre ölümünde rol oynar (53). MAPK1 hücrelerdeki sıcaklık, ultraviyole, inflamatuvar sitokinler, büyüme faktörleri ve stresle birlikte işlevsel hale gelir (53). MAPK1'in işlevsel hale geçmesi sık sık hücre ölümüne neden olur (53). Ek olarak MAPK1'in hücre bölünmesi boyunca kontrol noktalarında rolü vardır (53).



Şekil 12. MAPK1'in işlevselleşme şeması ve hücre çoğalması (54).

Almaç tirozin kinaz (RTK) yada almaç bağlı G proteinin (GPCR) büyüme faktörleri tarafından işlevselleştirilmesi adaptör protein Grb2 ve guanin nükleotit değiştirici faktör SOS işlevsel hale geçer (54). SOS, Ras proteinini aktif hale getirir (54). Plazma zarında bulunan Raf çeşitli bölgelerinden fosforillenerek aktifleşir (54). ERK1/2'nin fosforillenmesi ile birlikte RSK ve ERK1/2 nükleusa girer (54). Burada çeşitli transkripsiyon faktörlerini aktif hale getirerek hücre yaşamı ve çoğalmasıyla ilgili değişiklikleri düzenler (54).

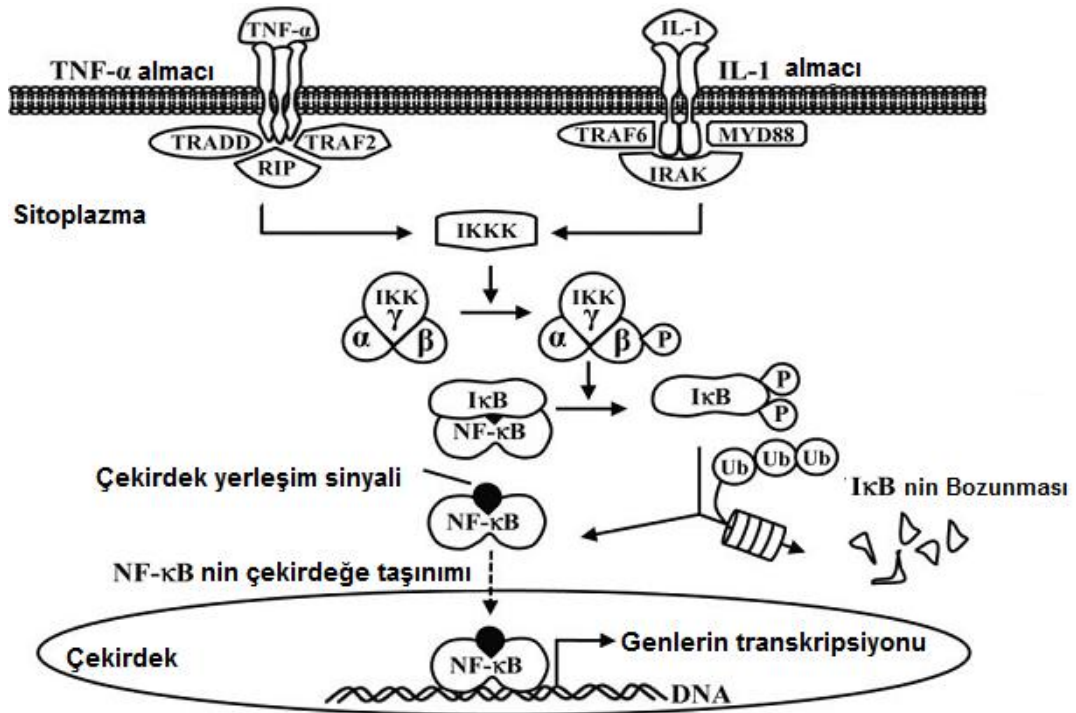
2.3.4.5. Mitojenin tetiklediği protein kinaz 9 (MAPK9)

MAPK9 stresin tetiklediği MAP kinaz olarak da bilinen memelilerdeki birkaç ana MAP kinaz grubundan biridir (55). MAPK9 hücre çoğalması, programlı hücre ölümü ve embriyonik gelişimi de kapsayan geniş fizyolojik işlemlerde görev alır (56).

2.3.4.6. Nükleer faktör -kappa-B1 (NF-κB)

Memelilerde NF-κB ailesi NF-κB1 (p50/p105), NF-κB2 (p52/p100), c-Rel, RelA (p65) ve RelB olmak üzere beş tane üyeden oluşur (57). NF-κB1, nükleer faktör engelleyici

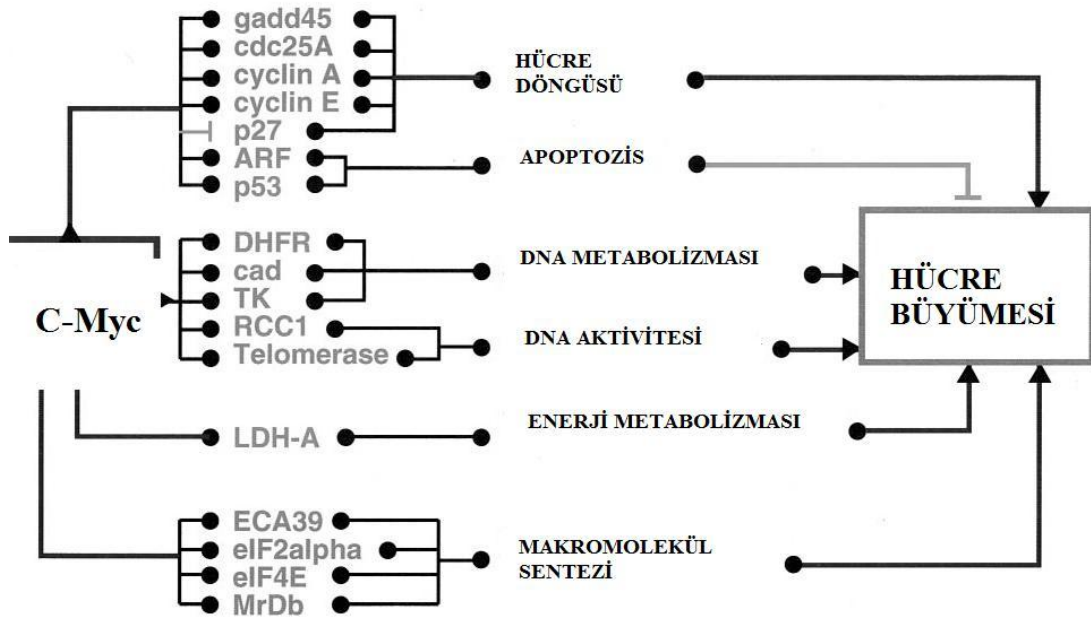
kappa B (IκB) proteinleri tarafından Go fazındaki hücrelerin sitoplazmasında sentezlenir ve işlevsiz olarak bulunur (60). NF-κB sitokinler, radyasyon ve bazı kemoterapötik araçlarla fosforilasyon, ubiquitinasyon ve IκB'nin proteozom-aracılığı ile bozulmasına yol açarak işlevsel hale gelir. (61). Transkripsiyon düzenleyici faktör olarak tanımlanan NF-κB1 kritik hastalıklarla ilgili genlerin düzenlenmesinde büyük bir öneme sahiptir (58). NF-κB1 çeşitli hastalıklara karşı gereken aracı, yapışma molekülleri ve sitokin transkripsiyonunun düzenlenmesinde merkezi rol oynar (58). NF-κB oksidatif stres cevabı ile alakalıdır (58). Oksidatif stres hücre içerisinde H₂O₂ hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin ve hidroksi radikallerin artması ile meydana gelir (58). Araştırmacılar birkaç hücre hattında hücre kültür vasatına eklenen H₂O₂ nin NF-κB nin işlevsel hale geçtiğini bulmuşlardır (58). Ek olarak hücrelerdeki reaktif oksijen türlerinde NF-κB'nin aktifleştiği gösterilmiştir (58). Bütün bu çalışmalar gösteriyor ki oksidatif stres hücrelerdeki NF-κB'yi etkinleştirir (58).



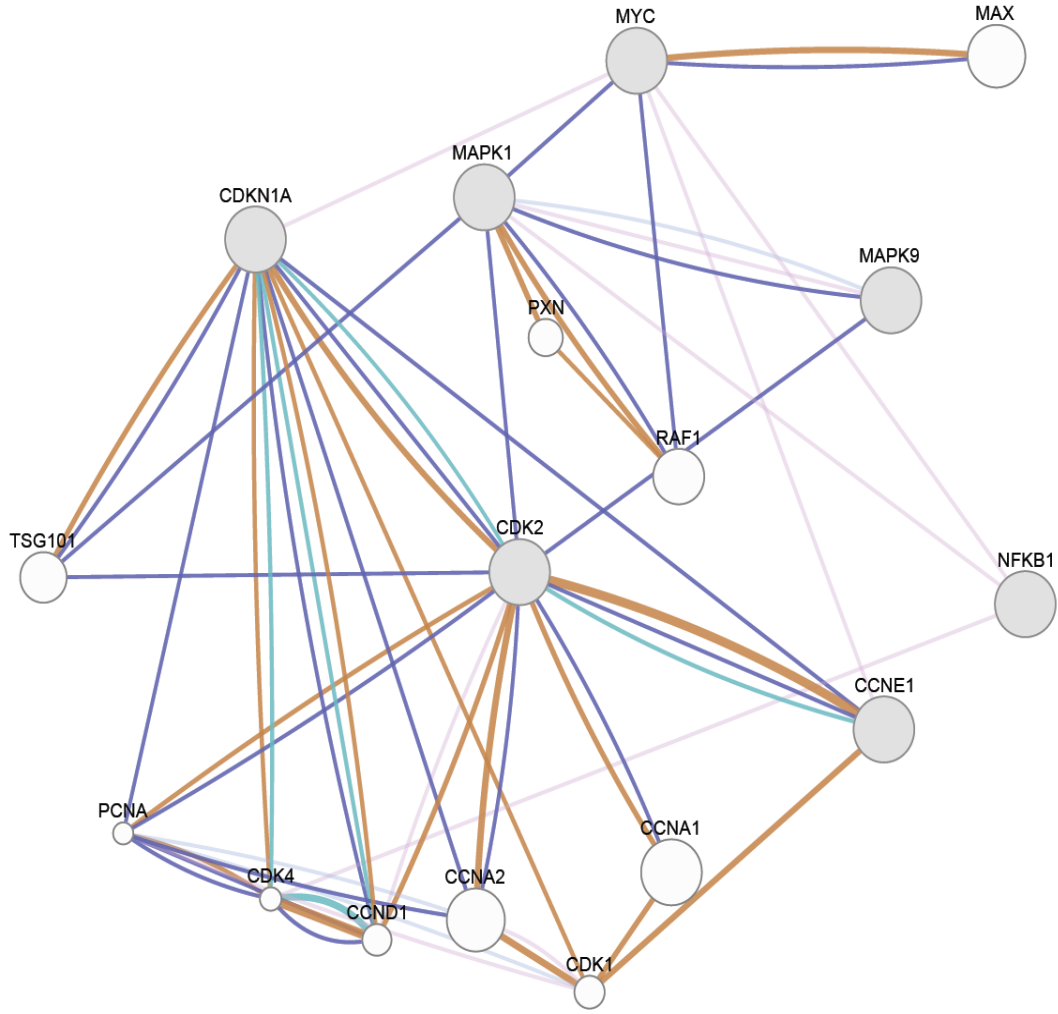
Şekil 13. NF-κB'nin TNF-α (tumor necrosis factor-α) ve IL-1 (interleukin-1) tarafından işlevli (59). NF-κB, IκB (κB inhibitörü) ile birlikte sitoplazmada işlevsiz halde tutulur. Bu etkileşim sayesinde NF-κB'nin nükleusa geçişi engellenmiş olur. TNF-α yada IL-1 almaçlarına bağlandığı zaman NF-κB aktif hale gelir. NFκB aktivasyonu, NFκB'nin bir engelleyicisi olan IκB'nin IκB kinaz bileşimi (IKK) ile fosforilasyonu ve bozulmasına bağlıdır (59).

2.3.4.7. Proto-onkogen protein C-Myc

Myc gen ailesi C-myc L-myc, and N-myc genlerinden oluşmaktadır (72). C-myc hücre farklılaşması, programlı hücre ölümü, hücre döngüsü ve metabolizması ve çeşitli hücresel işlevler üzerinde etkilidir (73). C-myc P53'ü aktive ederek programlı hücre ölümünü başlatabilir (74). C-myc aynı zamanda siklin bağlı kinaz engelleyicilerini baskılayarak hücre çoğalmasını da tetikleyebilir (74).



Şekil 14. C-myc ile tahmini hedef genler, hücre büyümesi hücresel fonksiyonlar arasındaki ilişki (72).



Şekil 15. CCNE1, CDK2, CDKN1A, MAPK1, MAPK9, NFKB1ve MYC arasındaki tahmini bağlantıların gösterilmesi (75).

- Direkt Etkileşim
- Fiziksel Etkileşim
- Ortak Gen İfadesi
- Ortak Yerleşim
- Yolak

2.3.5.Sitokinler

Sitokinler düşük moleköl ağırlıklı proteinlerdir. Özellikle inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Ayrıca hücresel aktivasyon, proliferasyon, farklılaşma, adezyon ve akut faz proteinlerinin sentezinde de önemli rolleri vardır (76). Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Belli bir sitokin çeşitli hücreler tarafından farklı dokularda salgılanır fakat aynı biyolojik etkiyi gösterir. Sitokinlerin etkileri sistemik veya lokaldir. Bazıları klasik hormon gibi davranırlar. Şöyle ki; belli hücreler tarafından kana veya çeşitli hücresel sıvılara salgılanıp vücudun diğer bölgelerindeki hücresel reseptörlerine bağlanırlar. Diğer sitokinler daha lokalize olmuş etkiler gösterirler. Bunlar otokrin (bir hücre tarafından salgılanan sitokinin aynı hücre üzerine etkisi) ve parakrin (belli bir hücre tarafından salgılanan sitokinin yakındaki komşu hücreye etkisi) etkilerdir (77). Sitokinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Bu sınıflandırma sitokinler arasındaki işlevsel benzerliklere etki mekanizmalarına dayanmaktadır. Sitokinler başlıca iki ana gruba ayrılmaktadır:

- 1) Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; Platelet orijinli büyüme faktörü, PDGF; insulin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; İnsülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Sinir büyüme faktörü, NGF; Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; Basik fibroblast büyüme faktörü, bFGF; Neurolökin; Amfiregulin; Hepatosit büyüme faktörü, HGF v.b.)
- 2) Lenfokinler (interlökin-1a, IL-1a; IL-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15) 3) Koloni stimüle eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni stimüle eden faktör, GM-CSF; Granülosit-CSF; Multi-CSF; Eritropoietin, EPO; Lösemi inhibitör faktör, LIF) 4) Transforme edici büyüme faktörleri (TGF-a; TGF-b) 5) Tümör nekroz faktörleri (TNF-a; TNF-b) 6) Interferonlar (IFN-a; IFN-b; IFN-g) (78).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Ekim 2009 ve Haziran 2010 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma hastanesinde Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı bünyesinde faaliyet gösteren Hücre Kültürü Laboratuvarında yürütüldü. Tez çalışmasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Cerrahisi Servisinde çeşitli nedenlerden dolayı lobektomi veya pnömonektomi uygulanmış hastaların cerrahi materyalinden elde edilen primer bronş epitel hücreleri kullanıldı. Bunun yanında A549 hücre hatları da kullanıldı. A549 hücre hatlarının ve birincil hücrelerin RNA izolasyonu ve RT-PCR çalışmaları Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma hastanesinde ki Moleküler Genetik Tanı Laboratuvarında bulunan cihazlar kullanılarak yapıldı.

3.1. A549 Hücreleri İle Yapılan Çalışmalar

Bu çalışma A549 hücre hattının 2.30 ile 2.40 arasındaki pasajları kullanılarak yapıldı.

3.1.1. A549 hücrelerinde kullanılan kültür vasatının hazırlanması

A549 hücreleri için DMEM (Dulbecco's Modified Medium, Gibco, Invitrogen) ile hazırlanan kültür vasatı kullanıldı.

Kültür vasatının hazırlanması

DMEM	500 ml	Gibco 31053
Fötal sığır serumu	50 ml (%10)	Sigma F2442-100ML
L-Glutamin 200mM	5,5 ml (2 mM)	Sigma G3126-100G
Sodyum privat 100 mM	5,5 ml (1 mM)	Sigma 8636

Serumsuz vasat (SF) hazırlanması

DMEM	500 ml	Gibco 31053
L-Glutamin 200mM	5,5 ml (2 mM)	Sigma G3126-100G
Sodyum privat 100 mM	5,5 ml (1 mM)	Sigma 8636

3.1.2. A549 hücrelerinin kaldırılması

Deneyler için kullanılacak hücreler 37 °C 'de, %5 CO₂ ve %95 nemli ortam içeren inkübatör bulunan 162 cm²'lik hücre kültür kaplarında (Falcon; BD Biosciences, ABD) kültür yapılarak çoğaltıldı. Burada çoğaltılan hücreler inkübatörden alındıktan sonra kültür kabı içinde bulunan DMEM vasatı vakum ile çekildi. Hücrelerin üzerine 5 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, Invitrogen) eklenerek hücreler yıkandı. Üzerine 1X'lik Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen, 25300) eklenip, 37 C°'de 3-4 dakika kadar beklendi. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopla kontrol edildi. Hücreler kalktıktan sonra Trypsini etkisizleştirmek için 5-10 ml %10 FCS içeren kültür vasatı eklendi. Kültür kabındaki hücreler 50 ml'lik steril tüpe (Falcon; BD , ABD) aktarıldı ve 1500 rpm'de 4 dk döndürüldü.

3.1.3. A549 hücrelerinin sayılması

Santrifüj işleminin ardından tüp içerisindeki üst faz atıldı ve tüpün alt kısmında toplanmış olan hücreler tüpün kenarlarına yavaşça vurularak homojenize hale getirilip üzerine 5 ml hücre kültür vasatı eklendi. Hücre sayımı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

20 µl hücre süspansiyonu,

20 µl %0,5'lik Trypan-Blue (Sigma-Aldrich, T6146)

160 µl hücre vasatı

Hazırlanan bu karışım thoma lamına (Marienfeld, Germany) konarak birim alandaki canlı hücreler sayıldı.

3.1.4. A549 hücre ekimi ve hücrelerin SF'e alınması

Sayılan hücreler 5000 hücre/ml olacak şekilde hücre vasatına eklendi. Çalışmalarda kullanılacak hücreler 75 cm²'lik kültür kaplarına (Falcon; BD Biosciences, ABD) ekildi. Yaklaşık 72 saat inkübatörde bekletildikten sonra ekilen hücreler kültür kabının %80'ini kapladıktan sonra (confluence) kültür kaplarındaki hücre vasatı çekilerek SF ile yıkandıktan sonra 10 ml SF konularak 24 saat inkübatörde bekletildi.

3.1.5. Dizel egzoz parçacıklarının (DEP) hazırlanması

Çalışmada kullanılacak DEP'ler hassas terazide dikkatli bir şekilde tartılarak 50 ml'lik steril tüp içerisine konuldu. Tüp içerisindeki DEP serumsuz kültür vasatı (SF) ile mg/ml olacak şekilde sulandırıldı ve ultrasonik karıştırıcıda 20-30 dakika kadar bekletilerek

parçacıkların SF içerisinde iyi bir şekilde homojenize olması sağlandı. Deneylerdeki DEP derişikliği µg/ml olacak şekilde ayrı ayrı tüpler içerisinde hazırlandı (15).

NAC (N-Asetil Sistein)

N-Asetil Sistein (NAC, Sigma), ile çalışılan derişiklikler SF içerisinde hazırlandı. NAC ile yapılan deneylerde çalışılan derişiklikler; FCS %10, SF, 50µg/ml DEP, 50µg/ml DEP-NAC33 mM.

JNK İnhibitörü

Jnk inhibitörü (c-jun N-terminal kinase, Calbiochem, Merck,) ile çalışılan derişiklikler SF içerisinde hazırlandı. JNK inhibitörü ile yapılan deneylerde çalışılan derişiklikler; SF-DMSO, 50µg/ml DEP -DMSO, JNK 10 µM, 50µg/ml DEP- JNK33 µM.

ERK İnhibitörü

ERK inhibitörü (extra regulated kinase, Calbiochem, Merck) ile çalışılan derişiklikler SF içerisinde hazırlandı. Erk inhibitörü ile yapılan deneylerde çalışılan derişiklikler; SF-DMSO, 50µg/ml DEP -DMSO, ERK 33 µM, 50µg/ml DEP- ERK33 µM.

3.1.6. A549 hücrelerinin DEP'e ve ajanlara maruz bırakılması

24 saat SF içerisinde inkübatörde bekletilen hücrelerden SF vakum ile çekilerek yerine yukarı da hazırlanan derişiklikler eklendi. Kültür vasatına eklenen bu maddeler 48 saat hücrelere inkübatör içerisinde maruz bırakıldı. Hücreler 48 saatin sonunda RNA izolasyonu için hazır hale geldiler.

3.2. Bronş Epitel Hücre Kültürü Elde Edilmesi

3.2.1. Bronş epitel hücre kültüründe kullanılan besiyerleri

Taşıyıcı Medium (TM)

50 ml Medium 199 (Sigma M2154) üzerine 40 µl Gentamisin (80 mg/ml) eklenerek hazırlandı (15).

FCS Medium (CM)

187 ml Medium 199 (Sigma M2154), 5 ml Fetal Calf Serum (Sigma F2442), 2 ml bovine pankreatik insulin (25 mg/100 ml) (Sigma I-6634-100MG), 2 ml Hidrokortizon (3,6 mg/100 ml) (Sigma H0396-100MG), 2 ml insan transferrin (25 mg/100 ml) (Sigma-T2036-100MG) 60 µl epidermal büyüme faktörü (0,1 mg/2 ml) (Beckton Dickinson BD 354001), 2 ml Antibiotik (Sigma A5955-20ML) (15).

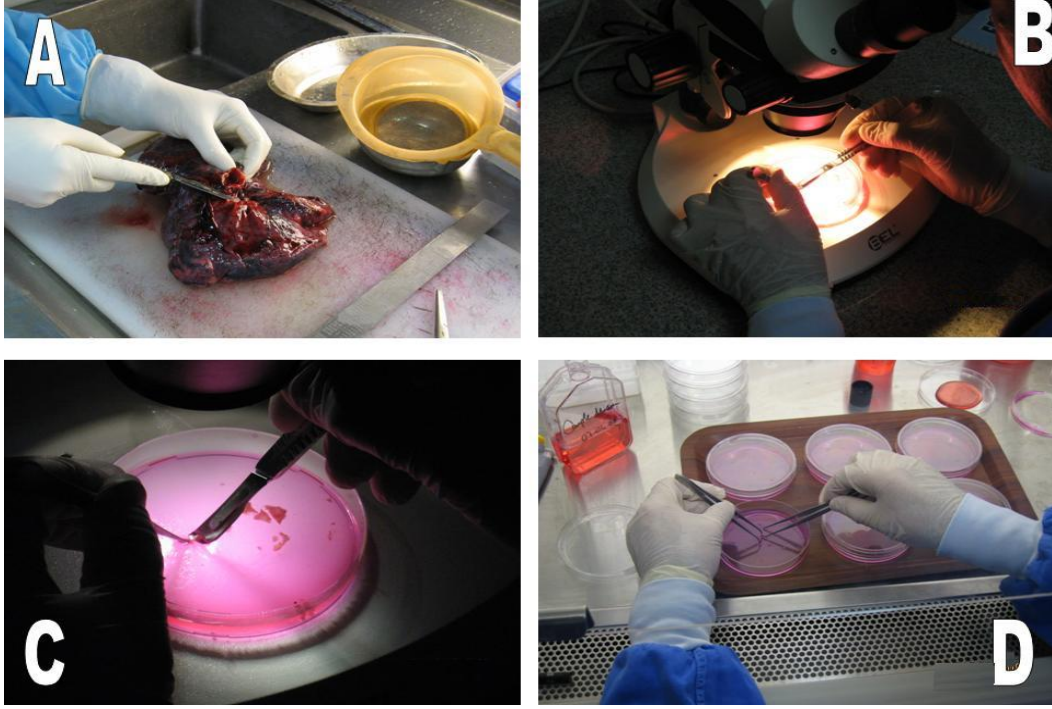
Tüm bileşenler eklendikten sonra 50 ml'lik enjektör ile 0,25 µm por çaplı filtreden geçirildi (15).

Nu Serum 4 Medium (NuS4)

NuS4 medium ile CM' un hazırlanması işlemi aynıdır. Sadece kültür vasatına FCS yerine 5 ml Nu Serum4 (Becton Dickinson Cat No: 355504) konuldu (15).

3.2.2. Örneğin alınması ve kesilip parçalanması

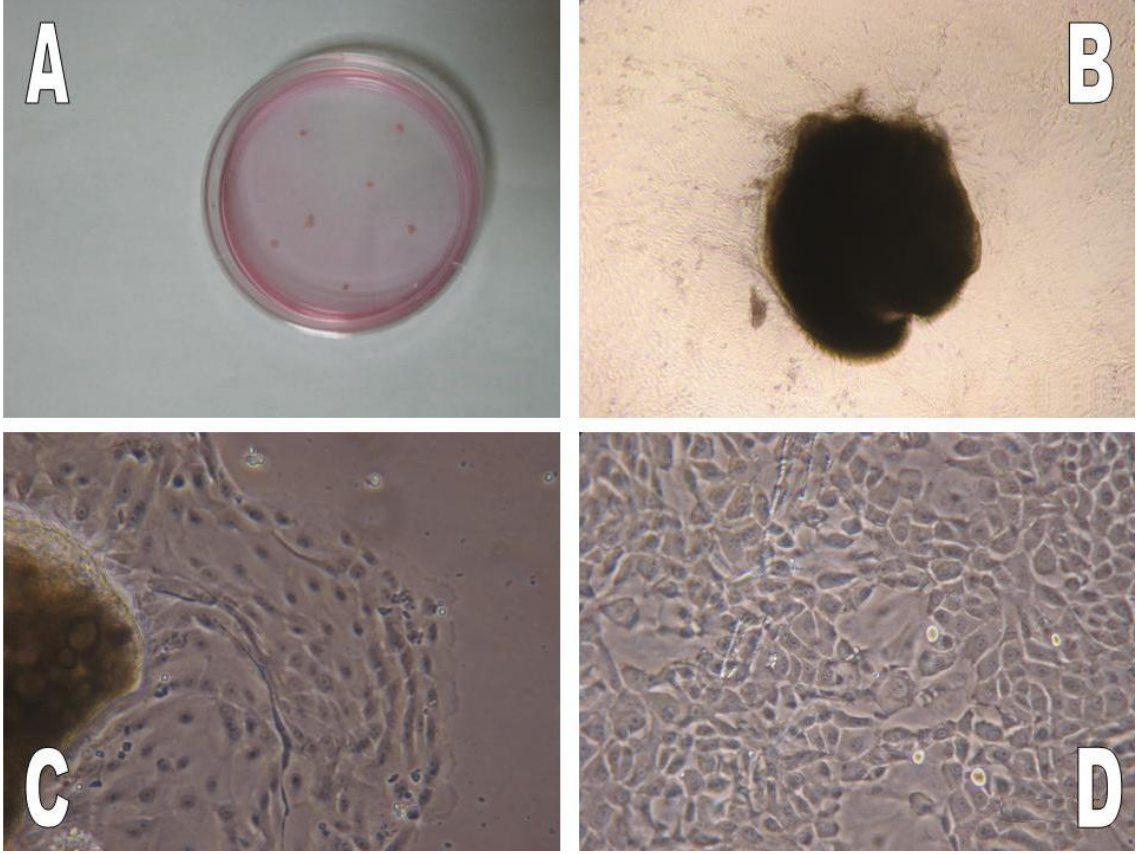
Bronş epitel hücreleri lobektomi veya pnömonektomi uygulanan hastaların cerrahi olarak dışarı çıkartılan bronşlardan elde edildi. Hastalardan elde edilen akciğer parçası hızlı bir şekilde patoloji bölümüne götürüldü. Akciğer parçasından klinik tanı amaçlı kullanılmayacak bronş dokusu TM içine alınarak laboratuvara getirildi. Laboratuvara getirilen örnek 1-2 defa TM ile yıkandıktan sonra dokunun üzerinde bulunan bronş dokusu dışındaki kısımlar kesilerek uzaklaştırıldı. Küçük parçalara ayrılan bronş parçacığı içinde TM olan petri kabı içinde kesilip parçalanarak epitel dokusu diğer bronş dokularından ayrıldı. Ayrılan epitel dokusu 2-3 defa TM ile nazıkça çalkalanarak yıkandıktan sonra içinde TM bulunan petri kabında yaklaşık 1-2 mm²'lik parçalara ayrıldı.



Şekil 16. Bronş epitelyumu elde edilmesi. Lobektomi yapılmış hastanın akciğer dokusundan bronş dokusunun alınması; (A). Bronş dokusundan epitel tabakasının ayırma mikroskobu eşliğinde ayrılması; (B). Ayrılan epitelyum dokusunun küçük parçalara ayrılması; (C). Epitelyum dokusunun hücre kültür ortamına ekimi; (D).

3.2.3. Bronş epitel hücrelerinden kültür elde edilmesi

Küçük parçalara ayrılan epitel dokusu 1-2 defa daha TM ile yıkadıktan sonra içinde 4 ml CM bulunan primer hücre kültür kaplarına her bir kaba 6-9 doku parçası gelecek şekilde eşit aralıklarla ekim yapıldı. 37 °C ve %5 CO₂'li inkübatörde 4 gün inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda primer hücre kaplarındaki kültür vasatı çekilerek yerine 5 ml NuS4 ile hazırlanan kültür vasatı eklendi. Bu aşamadan sonra 2-3 günlük periyotlarla hücre kültür kaplarının yüzeyindeki kültür vasatı çekilerek değiştirildi (15).



Şekil 17. Bronş epitelyumu hücre kültürünün aşamaları. Küçük parçalara ayrılan bronş epitelyum dokusunun hücre kültür kaplarına ekimi; (A). Ekimden sonraki birinci haftada doku parçasından çevreye doğru üremeye başlayan bronş epitel hücrelerinin faz-kontrast mikroskopundaki görüntüsü (X40); (B). ve (X100); (C). 30. günde hücrelerin kültür ortamındaki görünüşü (X100); (D).

Kültür edilen bronş epitel hücreleri genellikle 3-4 haftanın sonunda deney için hazır hale geldiler. Hücreler kültür kabının yüzeyini %80-90 oranında kapladıktan sonra doku parçaları penset yardımıyla dikkatli bir şekilde alındı. Kültürler deney için kullanılmadan 24 saat önce kültür vasatı FCS ve diğer hormon ve büyüme faktörleri içermeyen Medium 199 (SF) vasatına kondu (15).

3.2.4. Bronş epitel hücreleri ile yapılan deneyler

Deney için hazır hale gelen hücre kültür kaplarındaki hücreler 24 saat Medium 199 (SF) vasatında bekletildikten sonra kültür kaplarının üzerindeki SF çekildi. Bronş epitel hücreleri ile yapılan deneyler de çalışılan örnekler 3 gruba ayrıldı. İlk grupta Kontrol grubu olarak SF vasatı içeren kültürler çalışıldı. ikinci olarak 10 µg/ml DEP ve son olarak ve 100 µg/ml DEP olacak şekilde derişiklikler hazırlanarak hücre kültür

kaplarına eklendi ve 48 saat inkübatörde bekletildi. 48 saatin sonunda hücreler RNA izolasyonu için hazır hale geldiler.

3.3. RNA Elde Edilmesi

Hem A549 hücrelerinin hem de bronş epitel hücrelerinin RNA izolasyon aşamaları aynıdır. 48 saatin sonunda A549 hücreleri ve bronş epitel hücreleri mikroskop altında incelenerek kültür kabı yüzeyinde bulunan kültür vasatı vakum ile çekilerek yerine HBSS eklenerek yıkama işlemi yapıldı. Steril hücre kazıyıcı çubuk (cell scraper, Costar, Mexico) yardımıyla kültür kabı yüzeyinde yapışık durumda bulunan hücreler yavaş ve dikkatli bir şekilde kazındı. Çalışmadaki farklı gruplar ayrı ayrı 15 ml'lik tüplere alınarak üzerine HBSS eklendi ve 1500 rpm'da 4 dakika döndürüldü. Tüplerin üst fazı vakumla çekildi ve hücrelerin tüpün dip kısmında toplanması sağlandı. Tüpleri üzerine 600 µl 2-Merkaptoethanol (Fluka , BioChemika) eklenerek 1.5 ml'lik tüplere alındı. QIAGEN QIAcube (Almanya) model cihaz da RNA izolasyonu için gerekli ayarlamalar yapılarak hücrelerin bulunduğu tüpler bu cihaza yerleştirildi. RNA izolasyonu için gerekli program ayarlanarak RNA elde işlemi tamamlandı.

3.4. cDNA Elde Edilmesi

RNA 'dan cDNA elde edilmesi Precision Reverse Transcription Kit' kullanılarak yapıldı. (Eklenen maddelerin miktarları ve uygulanan protokoller üretici firmanın tavsiyesine göre uygulandı).

Tablo 4. cDNA elde edilmesi sırasında eklenen maddeler ve miktarları

Eklenen Madde	Miktar (µl)
ddH ₂ O	5
dNTP	1
Oligo dT primer	1
RNA	3

Yukarıdaki karışım hazırlandıktan sonra örnekler 0,2 'lik tüplere alınarak 65°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından aşağıdaki maddeler ayrı bir tüpe hazırlandı.

Tablo 5. cDNA elde edilmesi sırasında eklenen maddeler ve miktarları

Eklenen Madde	Miktar (µl)
ddH ₂ O	0,8
5X Tampon	5
Enzim	4

Bu karışımdan örneklerin bulunduğu 0.2 'lik tüplerin her birine 10 µl eklenerek 42°C' de 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Böylece RNA' dan cDNA elde işlemi tamamlanmış oldu. Elde edilen cDNA'lar -20 °C de saklanmak üzere buzdolabına kaldırıldı.

3.5. Real-Time Reverse Transcriptase RT PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Real-time PCR DNA' nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metottur (62). Bu metot gen ekspresyonu ile geleneksel PCR yöntemini birleştirmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getirebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğalma yöntemidir (63).

Bu çalışmada RT PCR çalışmaları Corbett Research (Model: RG-600, Avustralya) RT-PCR cihazı kullanılarak yapıldı. RT PCR çalışmalarında aşağıda gösterilen protokol uygulandı. Çalışmalar soğuk blok üzerinde yapıldı.

Tablo 6. RT-PCR protokolünde eklenen maddeler ve miktarları

Eklenen Madde	Miktar (µl)
ddH ₂ O	4
Primer Prob	1
2X Mastermix	10
cDNA	5

Yukarıdaki miktarlar 1.5 ml' lik tüpe hazırlandı ve 0.1 ml' lik tüplere 15 µl olacak şekilde dağıtıldı. Daha önceden hazırlanan 1:10 oranında seyreltilen cDNA' lar her bir tüpe 5 µl olacak şekilde dağıtıldı. Toplam hacim 20 µl olmak üzere tüpler kontrol edilerek RT-PCR cihazına yerleştirildi.

3.5.1. RT PCR tepkime protokolü

Tablo 7. RT PCR tepkime koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	95 °C	10 dakika	1
2.Denatürasyon	95 °C	15 saniye	50
Bağlanma	60 °C	60 saniye	

3.6. Çalışmada Kullanılan Primer ve Prop Dizileri

Tablo 8. Çalışmada kullanılan primer ve prop dizileri.

Gen adı	Primer dizisi (5'-3')	Prob dizisi (5'-3')
CDK2	5'-GGAACCAGTGAAAATGAAAGGAA-3' 5'-TATACCAACCCTCTTCAGCAATAA-3'	AGTTAGCCTCCACCACCCTTTCCCC
CCNE1	5'-CCTTGTATCATTTCTCGTCATCTG-3' 5'-CCCCGTCTCCCTTATAACCAT-3'	ATGTCGCACCACTGATACCCTGAAACCTTT
MAPK1	5'-TGGATGTGGTGTATGGAAAGA-3' 5'-AAGCAGAGACGCAGAATGAC-3'	CCACAGCCAGCCGCAGTTATAAGCAGG
MAPK9	5'-CTGCGTCACCCATACATCAC-3' 5'-TGTAATTAGCTCTTCCATTCTTCA-3'	CCGAAGCAGAAGCCCCACCACCTCAA
NFkB1	5'-GTAAGTGTGGACCCAAGGA-3' 5'-CCTCTGTCATTGCTGCTTCC-3'	CGGCTTCGCAAACCTGGGTATACTTCATGT
MYC	5'-CCGAAGCAGAAGCCCCACCACCTCAA-3' 5'-AAGAGTTCCGTAGCTGTTCAAG-3'	TGTGTTTCAACTGTTCTCGTCGTTTC
CDKN1A	5'-TCCAGCGACCTTCCTCATC-3' 5'-GCCTCTACTGCCACCATCT-3'	AATGTCTGACTCCTTGTTCCGCTGCTAATC

3.7 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) analizi

Bronş epitel hücreleri kültür kaplarının yüzeyini kapladıktan sonra hücrelerin üzerine 5 ml HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Gibco, Invitrogen) eklenerek hücreler yıkandı. Üzerine 1X'lik Tripsin-EDTA (Gibco, Invitrogen, 25300) eklenip, 37 C°'de 10 dakika kadar beklendi. Hücrelerin kalkıp kalkmadığı mikroskopla kontrol edildi. Hücreler kalktıktan sonra tripsini etkisizleştirmek için 5-10 ml %10 FCS içeren kültür vasatı eklendi. Kültür kabındaki hücreler 50 ml'lik steril tüpe (Falcon; BD, ABD) aktarıldı ve 1500 rpm'de 4 dk döndürüldü.

Santrifüj işleminin ardından tüp içerisindeki üst faz atıldı ve tüpün alt kısmında toplanmış olan hücreler tüpün kenarlarına yavaşça vurularak homojenize hale getirilip üzerine 5 ml hücre kültür vasatı eklenerek toplam hücre sayısı belirlendi.

Sayılan hücreler 10000 hücre/ml olacak şekilde hücre vasatına eklenerek 24 kuyucuk içeren kültür kaplarına (Falcon; BD Biosciences, ABD) ekim yapıldı. Yaklaşık 72 saat inkübatörde bekletildikten sonra ekilen hücreler kültür kabının %80'ini kapladıktan sonra kültür kaplarındaki hücre vasatı çekilerek SF ile yıkandıktan sonra tekrar SF konularak 24 saat inkübatörde bekletildi. Hücre kültürleri %70-80 yoğunluğa ulaştıktan sonra, 0, 10, 50, 100µg/ml DEP ile 24-48 saat süre ile inkübe edildi. 24 ve 48 saatin sonunda hücre kültür kaplarının üzerindeki kültür vasatı toplanarak -80 °C de analiz edilinceye kadar saklandı. Bu çalışmada sigara içmeyen 3 hasta, sigara içen 4 hasta ve KOAH'lı 5 hastanın bronş epitel dokusundan elde edilen bronş epitel hücreleri kullanıldı. İnterlökin (IL)-8 (human CXCL/IL-8, DY208, RnD System) ve granulosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) (human GMC-SF, DY215, RnD System) düzeyleri DuoSet ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü. Çalışmalar üretici firmanın tavsiyelerine göre yapılmıştır.

3.7.1.ELISA protokolü

Kullanılan Solüsyonlar ve malzemeler

PBS (phosphate buffered saline) pH: 7.2-7.4 (Sigma p4417, ABD). Tween 20 (Sigma p5924, ABD) 96 kuyulu elisa tabağı (Thermo, 439454, Denmark) , Reaktif sulandırıcı (reagent diluent, RnD System DY995, ABD), Ara ürün solüsyonu (substrate reagent, RnD System DY999, ABD), Durdurucu solüsyon (2N H₂SO₄ , RnD System DY994,

ABD). Yıkama tamponu (wash buffer, RnD System WA126), Engelleyici tampon (Block buffer, System DY995, ABD).

Yakalayıcı antikorun (capture antibody) derişikliği 4µg/ml olacak şekilde PBS ile sulandırılarak 96 kuyulu elisa tabağına 100µl eklenerek oda ısısında 1 gün inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün elisa tabağı boşaltılarak 400µl yıkama tamponu ile kuyular toplam 3 kez yıkandı. 300µl engelleyici tampon eklenerek 1 saat beklendi. Ardından 3 kez yıkama işlemleri yapıldı. Ardından standartlar ve örnekler 100µl olacak şekilde eklendi ve 2 saat oda ısısında beklendi. Standartlar en yüksek derişimi 2000pg/ml olacak şekilde reaktif sulandırıcı ile sulandırıldı (2000pg/ml, 1000pg/ml, 500pg/ml, 250pg/ml, 125pg/ml, 62.5pg/ml, 31.25, 15.625 pg/ml). Yıkama işlemleri 3 kez tekrar edildi. Bulucu antikorun (detection antibody) derişikliği 20ng/ml olacak şekilde reaktif sulandırıcı ile sulandırılarak 100µl kuyucuklara eklendi. Yıkama işlemleri 3 kez tekrar edildi. Ardından 100µl streptavidin eklenerek 20 dk beklendi. Yıkama işlemleri 3 kez tekrar edildi. 100µl ara ürün solüsyonu eklenerek 20 dk beklendi. Yıkama işlemleri yapılmadan kuyuların üzerine 50µl H₂SO₄ eklendi ve hızlı bir şekilde spektrofotometre (Biotek, ABD) ile 450-570 nm’de değerlendirildi.

4.BULGULAR VE SONUÇ

Bu çalışmada A549 Hücre hattı ve bronş epitel hücrelerinden elde edilen cDNA örnekleri ile siklin bağlı kinaz 2 (CDK2), siklin-E1 (CCNE1), (Mitojen aktif protein kinaz 2) (ERK2), Mitojen aktif protein kinaz 9 (JNK2), nükleer faktör NF-kappa-B (NFkB1), proto-onkogen protein (c-MYC), siklin bağlı kinaz engelleyici 1 olmak üzere 7 tane gen bölgesinin gen ifadesinin analizi RT-PCR yöntemi ile çalışılmıştır. Gen ifadesi sonuçlarının değerlendirilmesi için 'Prism 5' bilgisayar programı kullanılmıştır (GraphPad Software, ABD).

Çalışma sonucunda hedef gen bölgesinin bulunan kopya sayısı hamarat genin (GAPDH) kopya sayısına oranlanmasıyla gen ifadesi değerleri belirlenmiştir. Belirlenen değerlere ilk önce normalite testi (D'Agostino & Pearson omnibus normality test) uygulanmıştır. Daha sonra sonuçlar tek yönlü varyans analizi (One-way analysis of variance, ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar ise Bonferroni'nin çoklu karşılaştırmalar testi ("Bonferroni's Multiple Comparison Test") ile yapılmıştır.

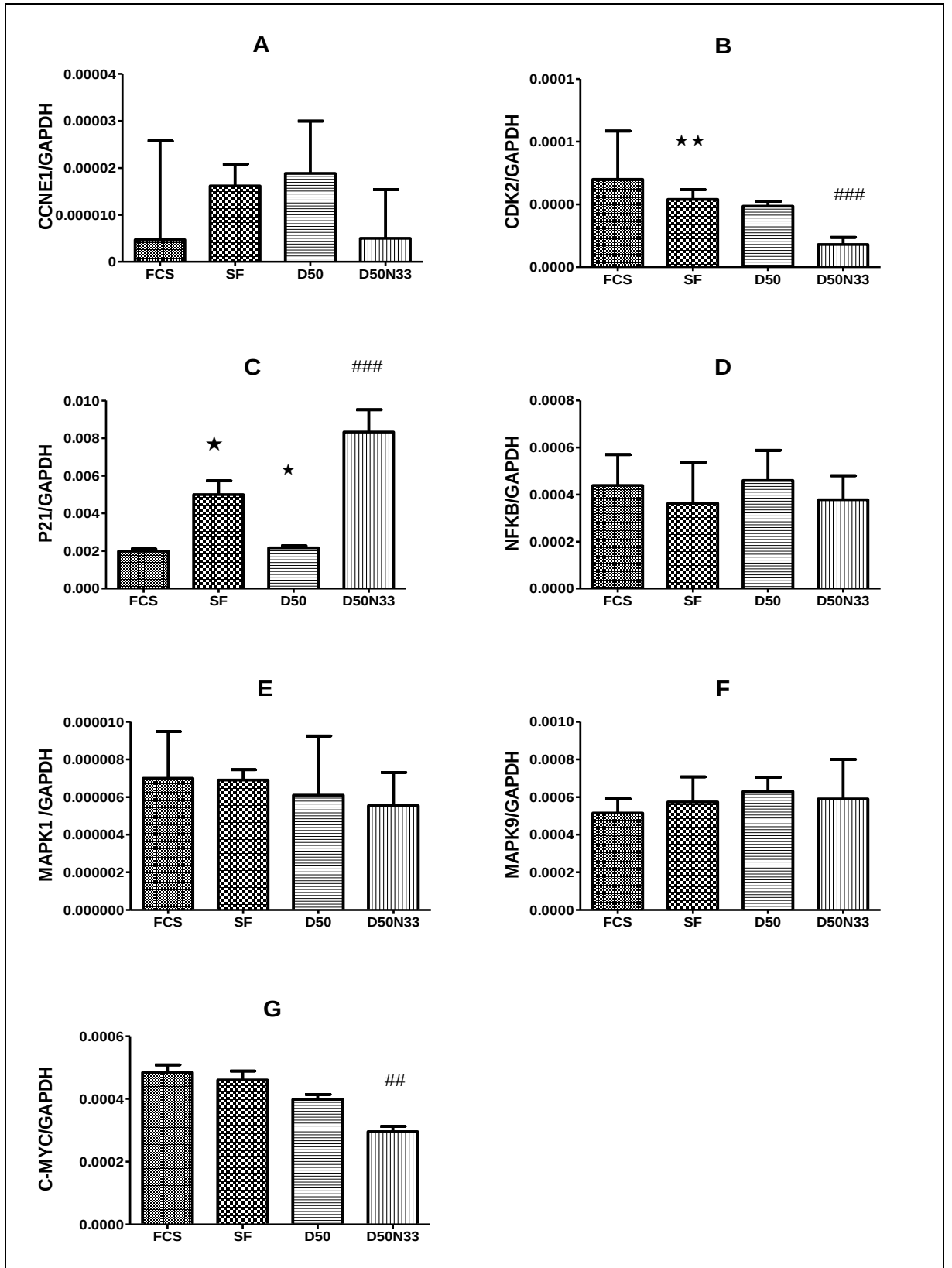
A549 hücre hatları ile çalışılan gruplarda kontrol grubu olarak SF ve 50 µg/ml DEP seçilerek diğer gruplarla karşılaştırma yapılmıştır. Bronş epitel hücreleri ile çalışılan gruplarda ise bütün gruplar (SF, 10 µg/ml DEP, 100 µg/ml DEP) birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

ELISA yöntemi ile çalışılan İnterlökin (IL)-8 ve granulosit makrofaj koloni stimule edici faktör (GM-CSF) deney sonuçlarının değerlendirilmesi ise Dunnett'in çoklu karşılaştırma testi (Dunnett compare all columns) ile yapılmıştır. Kontrol grubu olarak SF seçilmiştir.

Tablo 9. A549 hücrelerinde DEP ve NAC'a maruz bırakılan örneklerdeki mRNA değerlerinin gösterilmesi. (Bu değerler hedef gen bölgesinin mRNA seviyeleri GAPDH'e oranlanarak elde edilmiştir).

	CCNE1	CDK2	CDKN1A	MAPK1	MAPK9	NFkB1	C-MYC
FCS %10	0.0000047	0.00008	0.0019	0.0000075	0.00054	0.00038	0.00048
SF	0.000016	0.000055	0.0050	0.0000070	0.00061	0.00030	0.00046
50µg/ml DEP	0.000018	0.000045	0.0021	0.0000069	0.00062	0.00044	0.00039
50µg/ml DEP - NAC33 mM	0.000005	0.000018	0.0083	0.0000063	0.00066	0.00027	0.00029

SF ile FCS (%10) kıyaslandığında CDK2 gen ifadesi FCS (%10)'de anlamlı olarak artmıştır. 50µg/ml DEP ile 50µg/ml DEP-NAC33 mM kıyaslandığında CDK2 gen ifadesi 50µg/ml DEP'de anlamlı olarak artmıştır. (Tablo 9 ve Şekil 18B) ($P<0.0001$). SF ile FCS (%10) kıyaslandığında P21 gen ifadesi FCS (%10)'de anlamlı olarak baskılanmıştır. 50µg/ml DEP ile 50µg/ml DEP -NAC33 mM kıyaslandığında P21 gen ifadesi 50µg/ml DEP'de anlamlı olarak baskılanmıştır. (Tablo 9 ve Şekil 18C) ($P<0.0001$). 50µg/ml DEP ile 50µg/ml DEP -NAC33 mM kıyaslandığında c-MYC gen ifadesi 50µg/ml DEP'de anlamlı olarak artmıştır.(Tablo 9 ve Şekil 18G) ($P<0.0001$). Diğer çalışılan örneklerdeki gen ifadesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi.

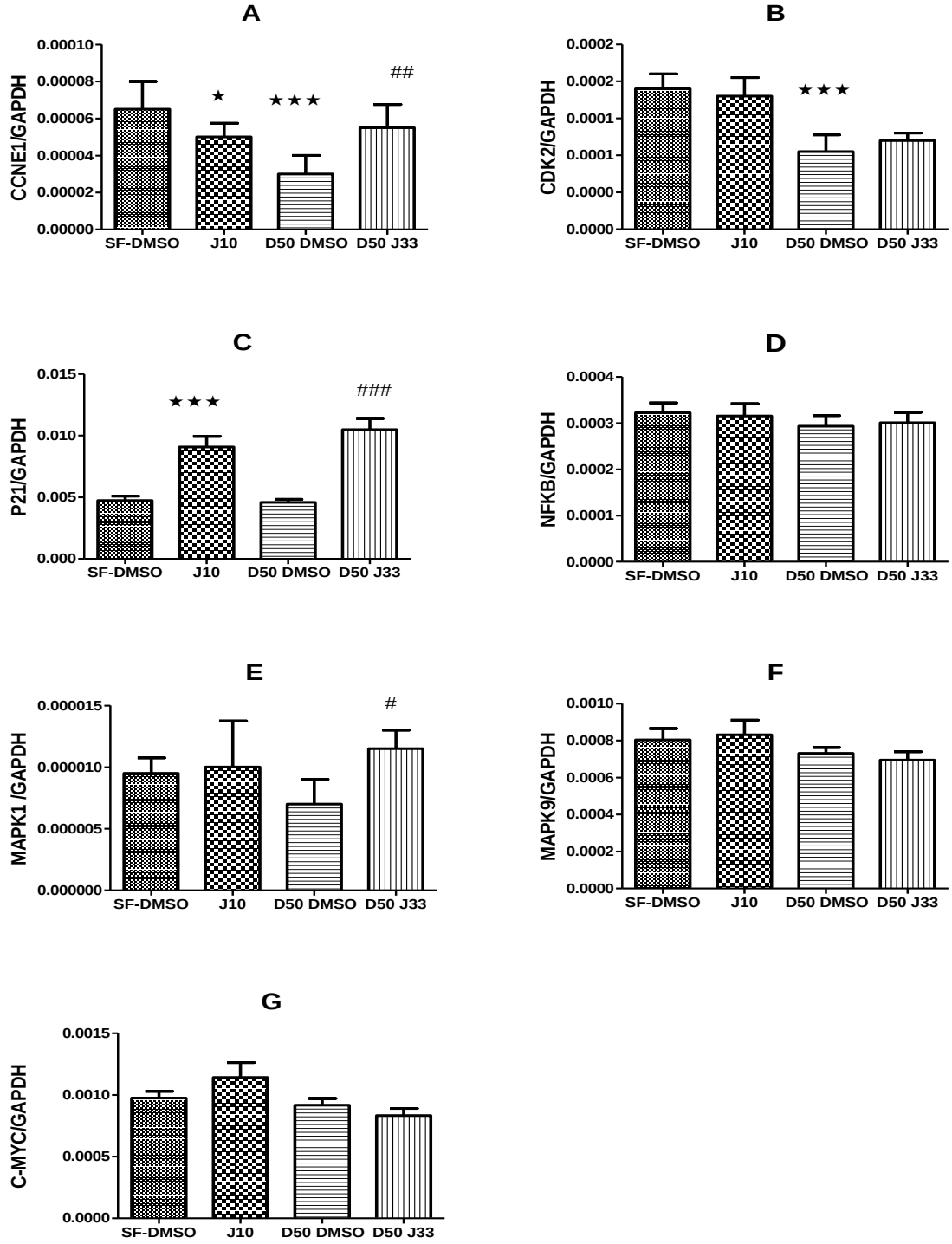


Şekil 18. A549 hücrelerinde DEP ve NAC'a maruz bırakılan örneklerdeki mRNA değerlerinin histogramları (SF: serum içermeyen kontrol, D₅₀: 50 µg/ml DEP içeren kontrol)

Tablo 10. A549 hücrelerinde DEP ve JNK inhibitörüne maruz bırakılan örneklerdeki mRNA değerlerinin gösterilmesi. (Bu değerler hedef gen bölgesinin mRNA seviyeleri GAPDH'e oranlanarak elde edilmiştir).

	CCNE1	CDK2	CDKN1A	MAPK1	MAPK9	NFkB1	C-MYC
SF-DMSO	0.000069	0.00018	0.00475	0.000009	0.00080	0.00032	0.00097
50µg/ml DEP- DMSO	0.000051	0.00018	0.00908	0.000010	0.00083	0.00031	0.00011
JNK 10 µM	0.000030	0.00010	0.00458	0.000007	0.00073	0.00029	0.00091
50µg/ml DEP- JNK33 µM	0.000052	0.00011	0.01050	0.000011	0.00069	0.00030	0.00083

SF-DMSO ile JNK 10 µM kıyaslandığında CCNE1 gen ifadesi JNK 10 µM' da anlamlı olarak baskılanmıştır (Tablo 10 ve Şekil 19A). SF-DMSO ile 50µg/ml DEP–DMSO kıyaslandığında ise CCNE1 gen ifadesi 50µg/ml DEP–DMSO' da baskılanmıştır (Tablo 10 ve Şekil 19A). 50µg/ml DEP–DMSO ile 50µg/ml DEP- JNK33 µM kıyaslandığında ise CCNE1 gen ifadesi 50µg/ml DEP- JNK33 µM' da anlamlı derecede artmıştır (Tablo 10 ve Şekil 19A) ($P<0.0001$). SF-DMSO ile 50µg/ml DEP–DMSO kıyaslandığında CDK2 gen ifadesinin 50µg/ml DEP–DMSO'da baskılandığı bulunmuştur (Tablo 10 ve Şekil 19B). ($P<0.0001$). SF-DMSO ile JNK 10 µM kıyaslandığında P21 gen ifadesi JNK 10 µM' da anlamlı olarak artmıştır (Tablo 10 ve Şekil 19C). 50µg/ml DEP–DMSO ile 50µg/ml DEP-JNK33 µM kıyaslandığında ise P21 gen ifadesi 50µg/ml DEP- JNK33 µM' da anlamlı derecede artmıştır (Tablo 10 ve Şekil 19C) ($P<0.0001$). 50µg/ml DEP-DMSO ile 50µg/ml DEP-JNK33 µM kıyaslandığında ise MAPK1 gen ifadesi 50µg/ml DEP- JNK33 µM' da anlamlı derecede artmıştır (Tablo 10 ve Şekil 19E) ($P=0,0299$). Diğer çalışılan örneklerdeki gen ifadesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi.

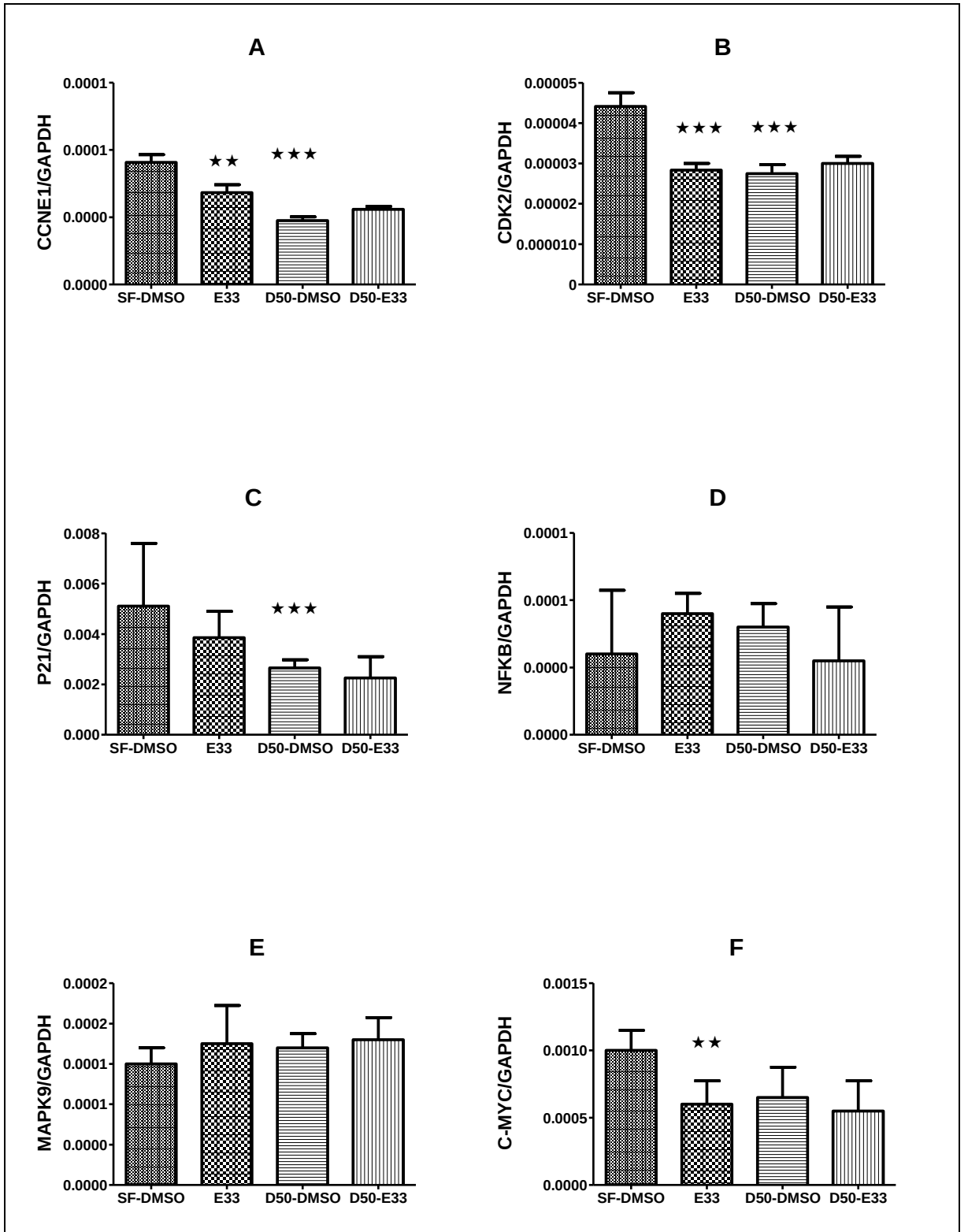


Şekil 19. A549 hücrelerinde DEP ve JNK inhibitörüne maruz bırakılan örneklerdeki mRNA değerlerinin histogramları (SF-DMSO: serum içermeyen kontrol, D₅₀-DMSO: 50 µg/ml DEP içeren kontrol)

Tablo 11. A549 hücrelerinde DEP ve ERK inhibitörüne maruz bırakılan örneklerdeki mRNA değerlerinin gösterilmesi. (Bu değerler hedef gen bölgesinin mRNA seviyeleri GAPDH'e oranlanarak elde edilmiştir).

	CCNE1	CDK2	CDKN1A	MAPK9	NFkB1	C-MYC
SF-DMSO	0.000090	0.000044	0.00587	0.000155	0.000075	0.0010
50µg/ml DEP-DMSO	0.000068	0.000028	0.00410	0.000178	0.000088	0.00060
ERK 33µM	0.000047	0.000027	0.00259	0.000178	0.000082	0.00065
50µg/mlDEP-ERK33 µM	0.000055	0.000030	0.00238	0.00178	0.000060	0.00055

SF-DMSO ile ERK 33 µM kıyaslandığında CCNE1 gen ifadesi ERK 33 µM' de anlamlı olarak baskılanmıştır (Tablo 11 ve Şekil 20A). SF-DMSO ile 50µg/ml DEP–DMSO kıyaslandığında ise CCNE1 gen ifadesi 50µg/ml DEP–DMSO' da baskılanmıştır (Tablo 11 ve Şekil 20A) ($P<0.0001$). SF-DMSO ile ERK 33 µM kıyaslandığında CDK2 gen ifadesi ERK 33 µM' de anlamlı olarak baskılanmıştır (Tablo 11 ve Şekil 20B). SF-DMSO ile 50µg/ml DEP–DMSO kıyaslandığında ise CDK2 gen ifadesi 50µg/ml DEP – DMSO' da baskılanmıştır (Tablo 11 ve Şekil 20B). ($P<0.0001$). SF-DMSO ile 50µg/ml DEP–DMSO kıyaslandığında P21 gen ifadesinin 50µg/ml DEP –DMSO'da baskılandığı bulunmuştur (Tablo 11 ve Şekil 20C) ($P<0.0001$). SF-DMSO ile ERK 33 µM kıyaslandığında c-MYC gen ifadesi ERK 33 µM' de anlamlı olarak baskılanmıştır (Tablo 11 ve Şekil 20F) ($P<0.0001$). Diğer çalışılan örneklerdeki gen ifadesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi. Ayrıca A549 hücrelerinde DEP ve ERK inhibitörüne maruz bırakılan örneklerdeki MAPK1 gen ifadesi analiz edilemedi.

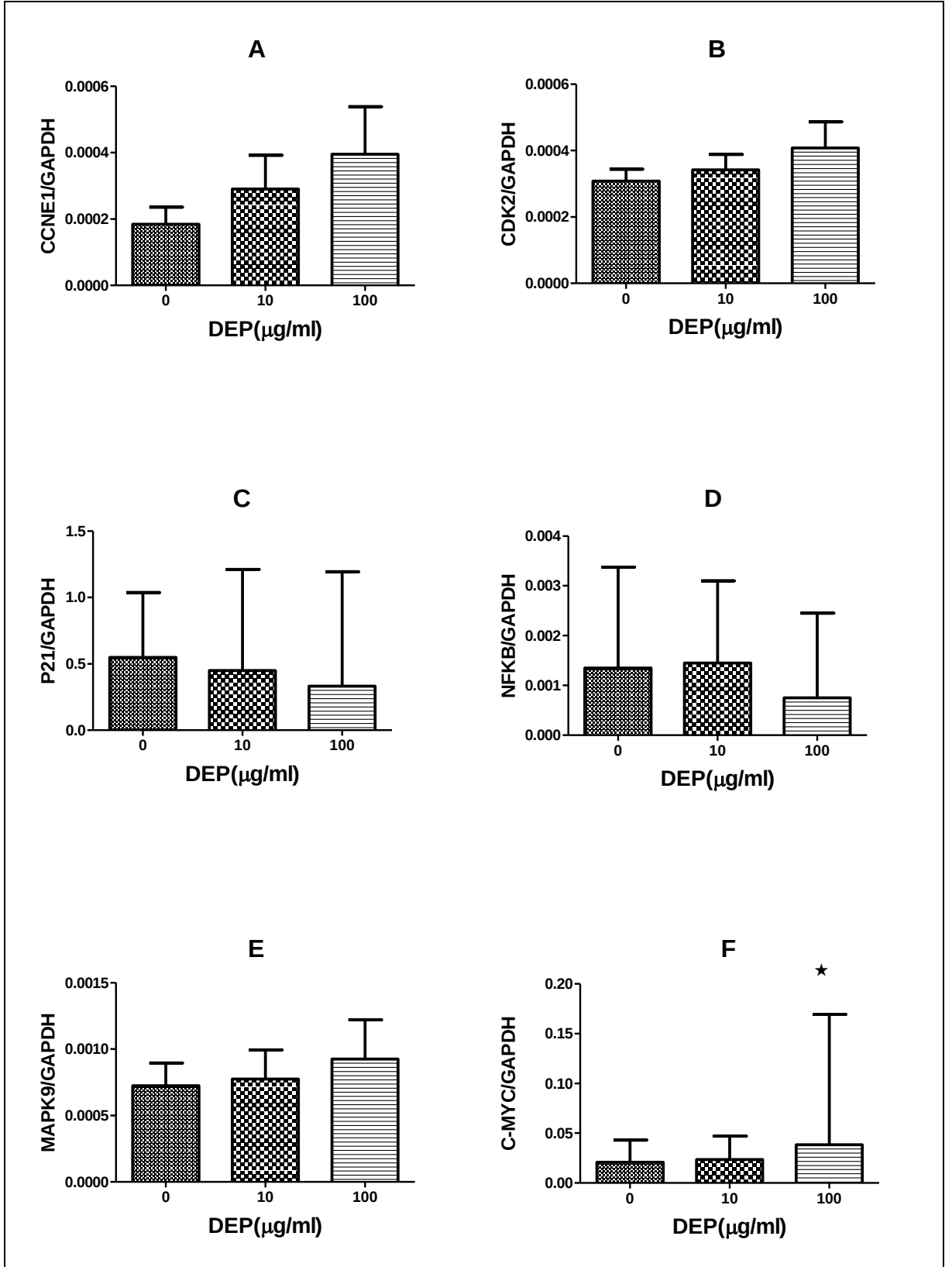


Şekil 20. A549 hücrelerinde DEP ve ERK inhibitörüne maruz bırakılan örneklerdeki mRNA değerlerinin histogramları (SF-DMSO: serum içermeyen kontrol D₅₀-DMSO: 50 µg/ml DEP içeren kontrol)

Tablo 12. KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin SF, 10µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP'e maruz bırakılan örneklerinin mRNA değerlerinin gösterilmesi. (Bu değerler hedef gen bölgesinin mRNA seviyeleri GAPDH'e oranlanarak elde edilmiştir).

	CCNE1	CDK2	CDKN1A	MAPK9	NFκB1	C-MYC
SF	0.000184	0.000308	0.6002	0.000725	0.001708	0.02234
10µg/ml DEP	0.00029	0.000341	0.6875	0.000775	0.002067	0.02911
100µg/ml DEP	0.00039	0.000408	0.7700	0.000925	0.001433	0.08555

KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitel hücreleri SF, 10µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP'e maruz bırakılmıştır. Tablo 12 ve Şekil 21'de de bu örneklerle ait gen ifadesi değerleri gösterilmiştir. SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında c-MYC gen ifadesinin 100µg/ml DEP' de anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Tablo 12 ve Şekil 21F) (P 0,0336). Diğer çalışılan örneklerdeki gen ifadesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

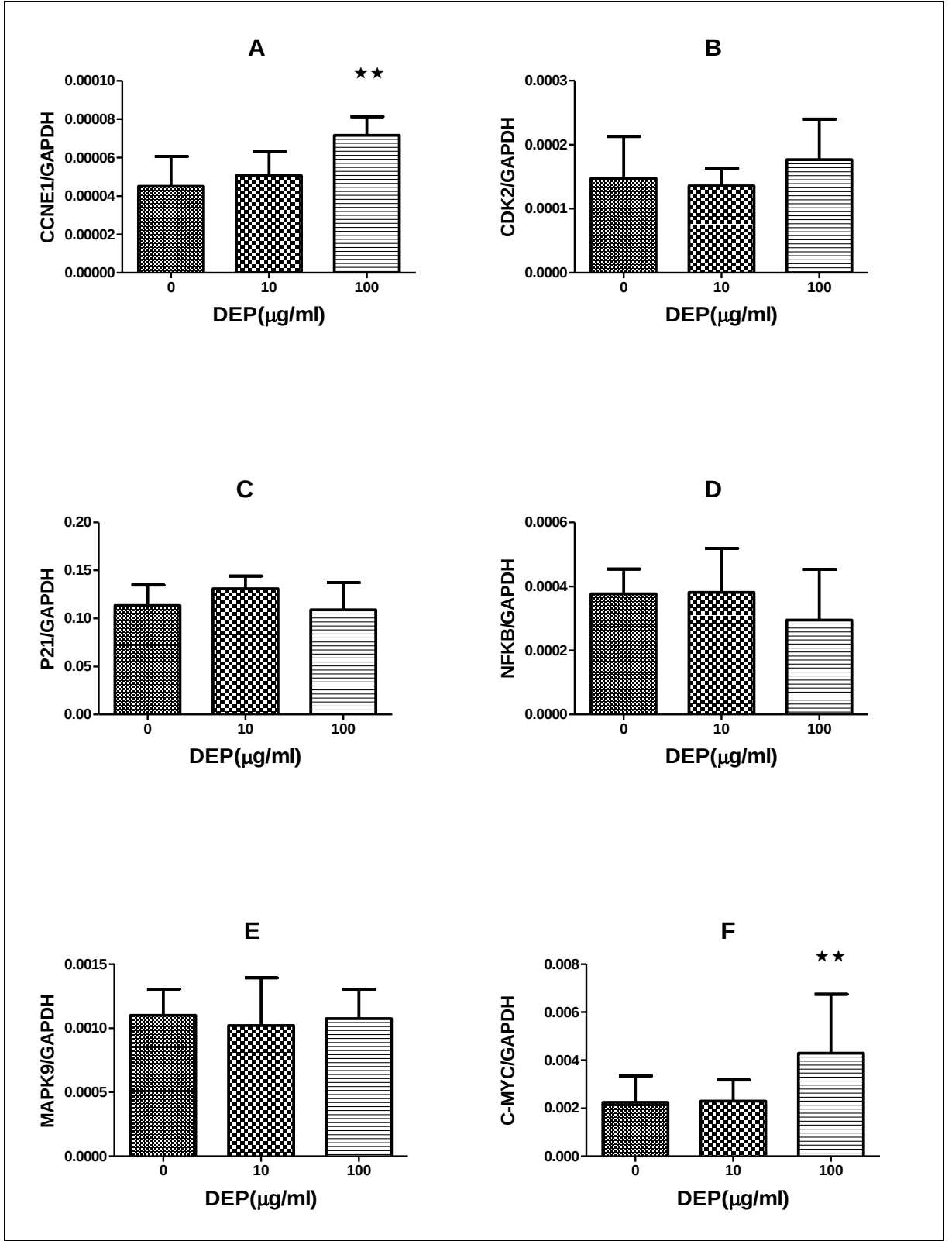


Şekil 21. KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin SF, 10µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP'e maruz bırakılan örneklerinin mRNA değerlerinin histogramları

Tablo 13. Sigara içen hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin SF, 10µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP’e maruz bırakılan örneklerinin mRNA değerlerinin gösterilmesi. (Bu değerler hedef gen bölgesinin mRNA seviyeleri GAPDH’e oranlanarak elde edilmiştir).

	CCNE1	CDK2	CDKN1A	MAPK9	NFkB1	C-MYC
SF	0.000049	0.000175	0.1186	0.00117	0.000422	0.0026
10µg/ml DEP	0.000062	0.000161	0.1171	0.00141	0.000417	0.00325
100µg/ml DEP	0.000072	0.000195	0.1261	0.00111	0.000327	0.00498

Sigara içen hastalardan elde edilen bronş epitel hücreleri SF, 10µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP’e maruz bırakılmıştır. Tablo 13 ve Şekil 22’de bu örneklerle ait gen ifadesi değerleri gösterilmiştir. SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında CCNE1 gen ifadesinin 100µg/ml DEP’ de anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Tablo 13 ve Şekil 22A) (P 0,2653). SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında c-MYC gen ifadesinin 100µg/ml DEP’ de anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Tablo 13 ve Şekil 22F) (P 0,0088). Diğer çalışılan örneklerdeki gen ifadesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

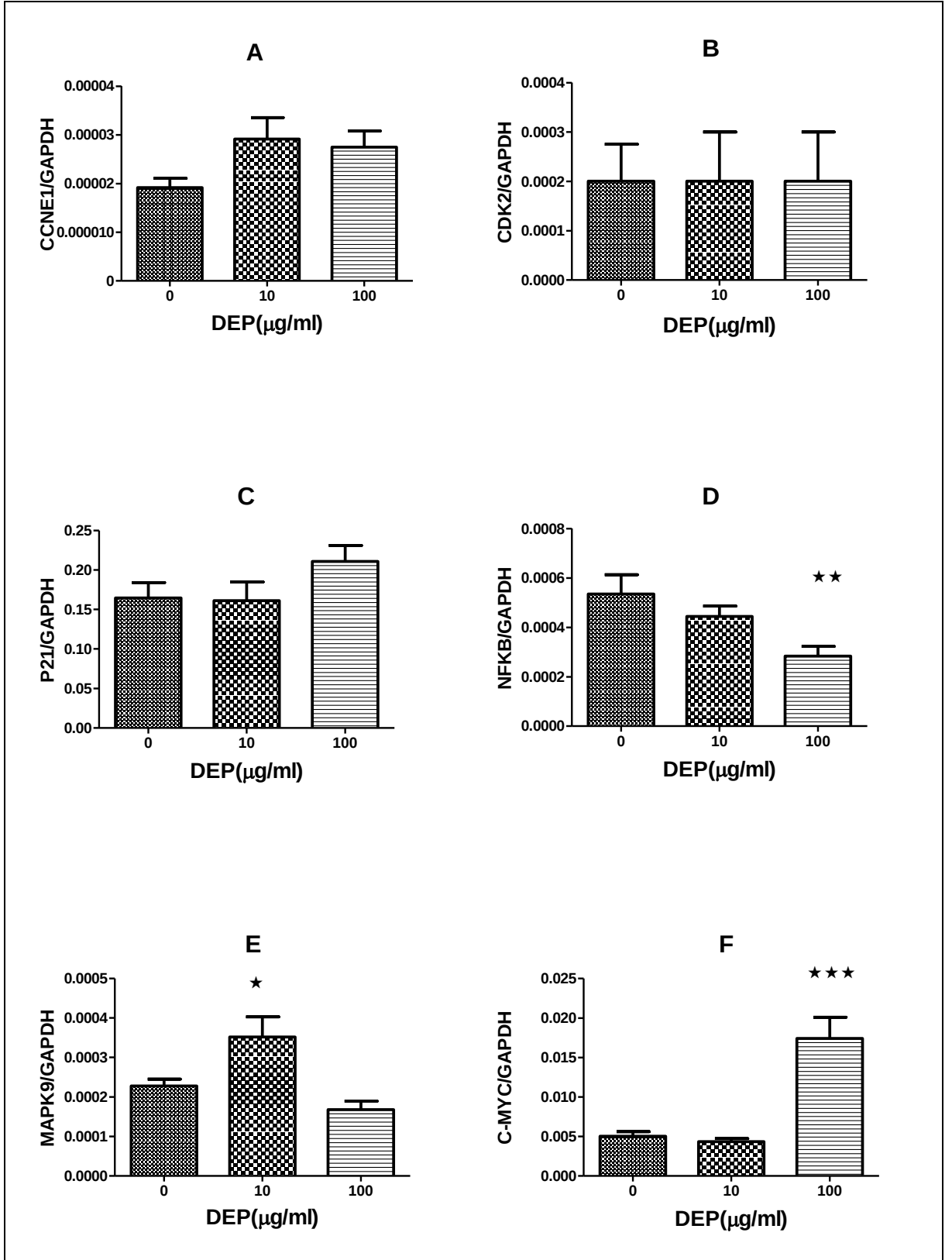


Şekil 22. Sigara içen hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin SF, 10µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP'e maruz bırakılan örneklerinin mRNA değerlerinin histogramları

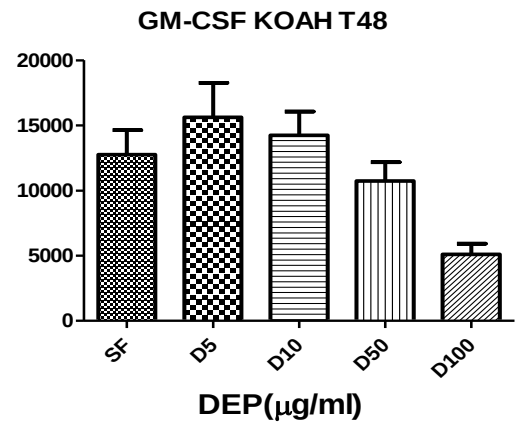
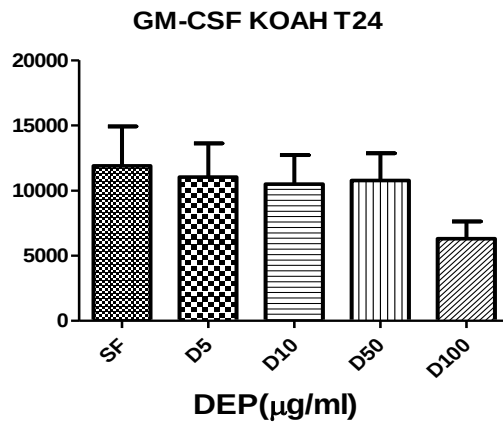
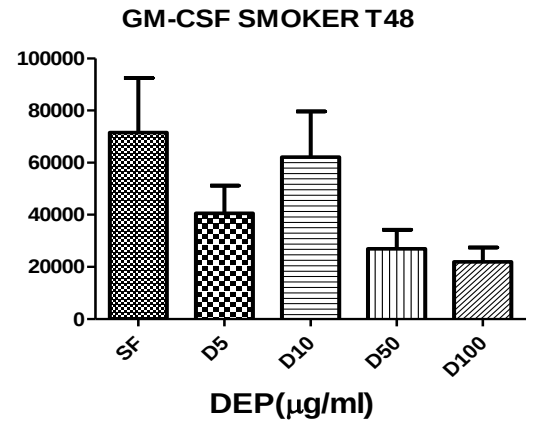
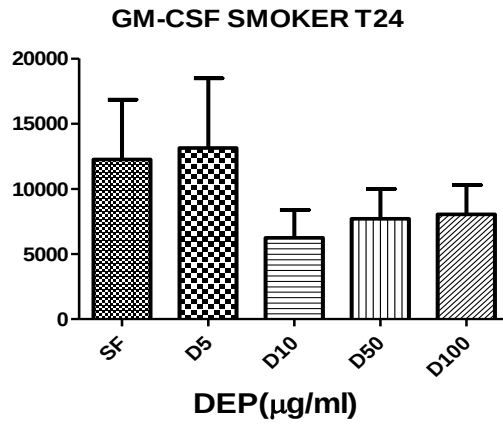
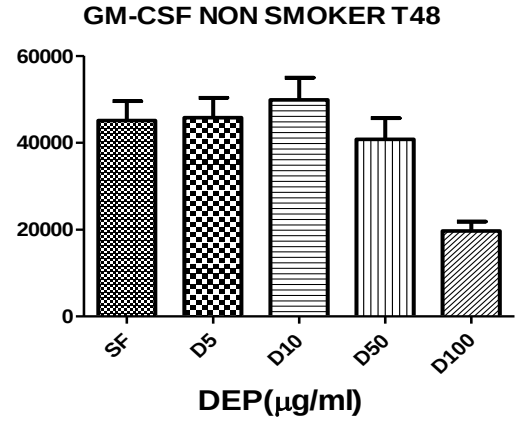
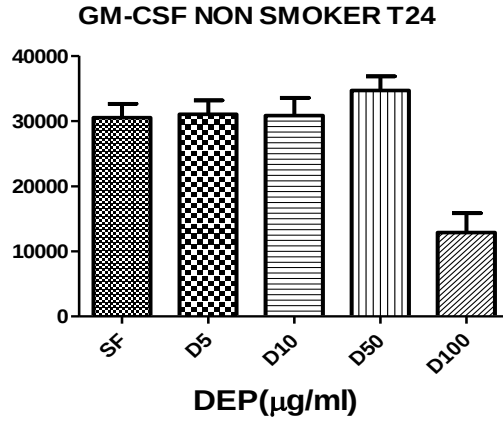
Tablo 14. Sigara içmeyen hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin SF, 10µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP’e maruz bırakılan örneklerinin mRNA değerlerinin gösterilmesi. (Bu değerler hedef gen bölgesinin mRNA seviyeleri GAPDH’e oranlanarak elde edilmiştir).

	CCNE1	CDK2	CDKN1A	MAPK9	NFkB1	C-MYC
SF	0.000019	0.000225	0.1646	0.000227	0.000535	0.00502
10µg/ml DEP	0.000029	0.000241	0.1612	0.000351	0.000444	0.00435
100µg/ml DEP	0.000027	0.000258	0.2108	0.000167	0.000283	0.0174

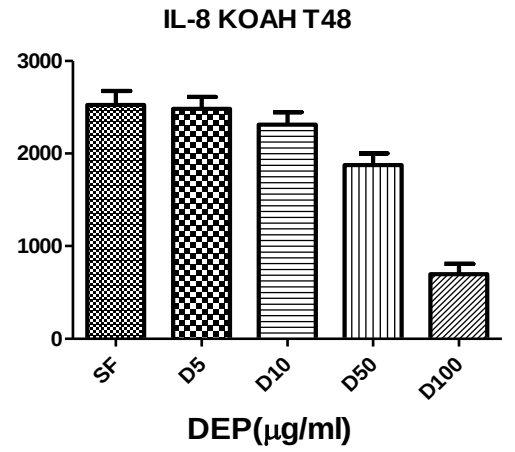
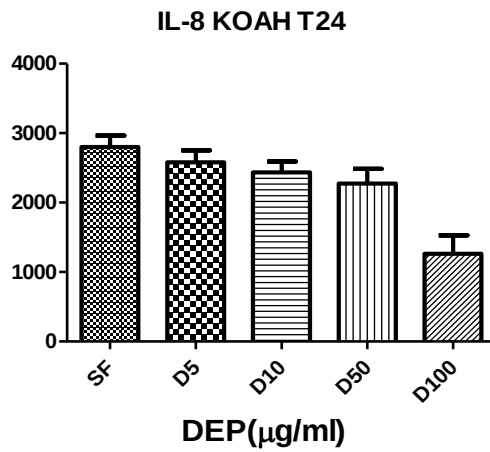
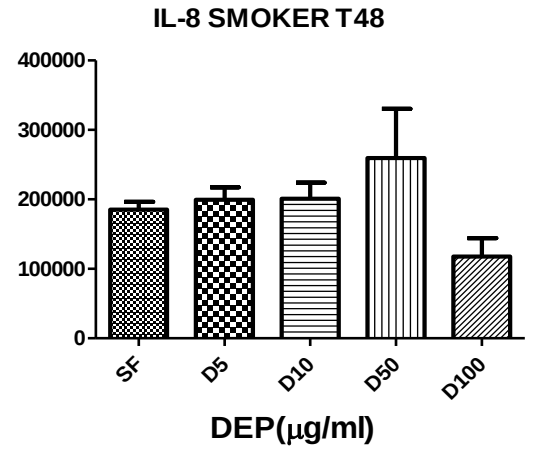
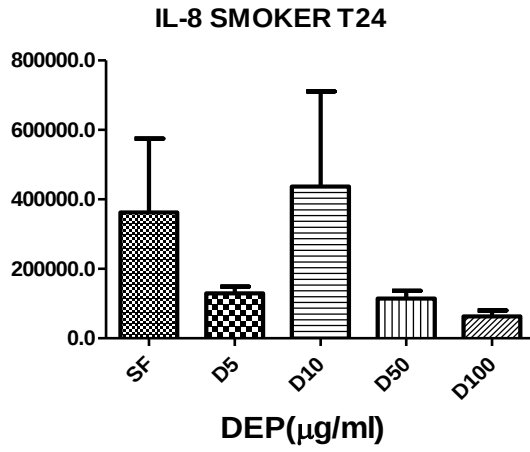
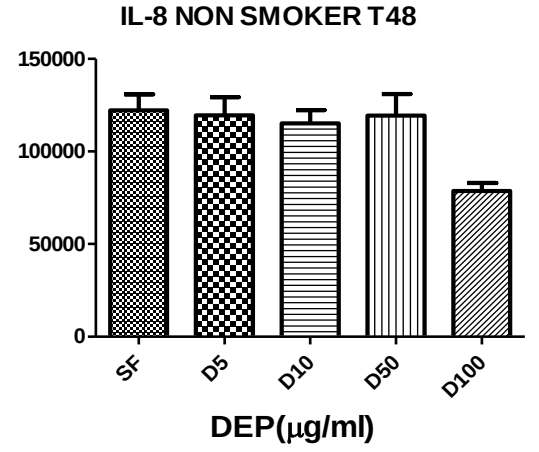
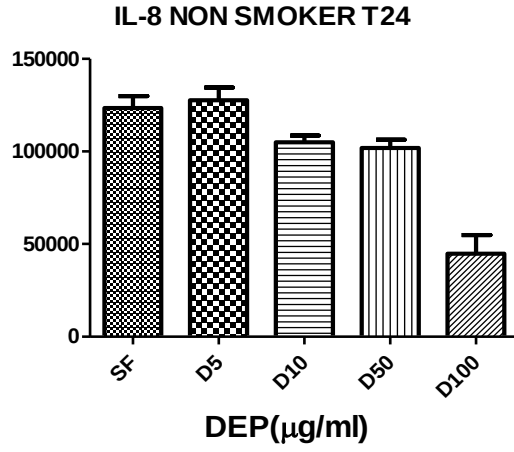
Sigara içmeyen hastalardan elde edilen bronş epitel hücreleri SF, 10µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP’e maruz bırakılmıştır. Tablo 14 ve Şekil 23’de bu örneklerle ait gen ifadesi değerleri gösterilmiştir. SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında NFkB1 gen ifadesinin 100µg/ml DEP’ de anlamlı olarak baskılandığı bulunmuştur (Tablo 14 ve Şekil 23D) (P 0,0113). SF ile 10µg/ml DEP kıyaslandığında MAPK9 gen ifadesinin 10µg/ml DEP’ de anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Tablo 14 ve Şekil 23E) (P 0,0017). SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında c-MYC gen ifadesinin 100µg/ml DEP’ de anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Tablo 14 ve Şekil 23F) (P<0.0001). Diğer çalışılan örneklerdeki gen ifadesi seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.



Şekil 23. Sigara içmeyen hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin SF, 10µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP'e maruz bırakılan örneklerinin mRNA değerlerinin histogramları



Şekil 24. Sigara içmeyen, sigara içen ve KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin SF, 5μg/ml DEP, 10μg/ml DEP, 50μg/ml DEP ve 100μg/ml DEP'e maruz bırakılan örneklerdeki GMC-SF düzeylerinin gösterilmesi



Şekil 25. Sigara içmeyen, sigara içen ve KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin SF, 5µg/ml DEP, 10µg/ml DEP, 50µg/ml DEP ve 100µg/ml DEP'e maruz bırakılan örneklerdeki IL-8 düzeylerinin gösterilmesi

Sigara içmeyen hastalardan elde edilen bronş epitelyum hücrelerinde 24 saat sonunda SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında GMC-SF salınımının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 24, GMC-SF NON SMOKER T24) ($P<0.0001$). Sigara içmeyen hastalardan elde edilen bronş epitelyum hücrelerinde 48 saat sonunda SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında GMC-SF salınımının burada da anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 24, GMC-SF NON SMOKER T48) ($P<0.0001$). Sigara içen hastalardan elde edilen bronş epitelyum hücrelerinde 48 saat sonunda SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında GMC-SF salınımının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 24, GMC-SF SMOKER T48) ($P<0.0001$). KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitelyum hücrelerinde 48 saat sonunda SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında GMC-SF salınımının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 24, GMC-SF KOAH T48) ($P<0.0001$).

Sigara içmeyen hastalardan elde edilen bronş epitelyum hücrelerinde 24 saat sonunda SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında IL-8 salınımının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 25, IL-8 NON SMOKER T24) ($P<0.0001$). Sigara içmeyen hastalardan elde edilen bronş epitelyum hücrelerinde 48 saat sonunda SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında IL-8 salınımının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 25, IL-8 NON SMOKER T48) ($P<0.0001$). KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitelyum hücrelerinde 24 saat sonunda SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında IL-8 salınımının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 25, IL-8 KOAH T24) ($P<0.0101$). KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitelyum hücrelerinde 48 saat sonunda SF ile 50µg/ml DEP kıyaslandığında IL-8 salınımının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 25, KOAH T48) ($P<0.0001$). Aynı şekilde KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitelyum hücrelerinde de 48 saat sonunda SF ile 100µg/ml DEP kıyaslandığında IL-8 salınımının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (Şekil 25, KOAH T48) ($P<0.0001$).

TARTIŞMA

Parçacıkların neden olduğu hava kirliliği inflamatuvar ve zararlı etkileriyle solunum hastalıklarıyla yakından ilişkilidir (12). Fakat bu parçacıkların akciğer üzerindeki zararlı etkilerinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (12). Çalışmalar, tütün dumanı ve dizel egzoz parçacıkları gibi oksidanların hücre döngüsü ve programlı hücre ölümü ile ilgili proteinlerin gen ifadesini ve aktivitesini etkileyebileceğini göstermektedir (91). Bu çalışmada hücre döngüsü ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesinde rol alan siklin bağlı kinaz 2 (CDK2), siklin-E1 (CCNE1), mitojen aktif protein kinaz 2 (ERK2), mitojen aktif protein kinaz 9 (JNK2), nükleer faktör NF-kappa-B (NFKB1), proto-onkogen protein (c-MYC), siklin bağlı kinaz engelleyici 1 (p21)'in gen ifadesi seviyeleri RT-PCR yöntemi ile çalışıldı. Çalışmada A549 hücre hattının yanı sıra direkt olarak bronş dokusundan elde edilen bronş epitel hücreleri de kullanıldı. DEP'e maruziyet sonrasında bronş epitel hücrelerinden salınan IL-8 ve GM-CSF miktarları da ELISA yöntemi ile tayin edildi.

A549 hücre hattı ile yaptığımız çalışmalarda %10'luk serumlu ortamda p21 gen ifadesinin serumsuz ortama göre baskılandığı bulunmuştur. Aynı zamanda 50 µg/ml DEP'e maruziyet sonrasında da p21 gen ifadesinin baskılandığı bulunmuştur. Bir antioksidan olan NAC ise (33 mM) 50 µg/ml DEP'li ortamda p21 gen ifadesini anlamlı derecede artırmıştır. Bunun nedeni serumlu ortamda hücre çoğalmasının artması ve düşük derişiklikteki DEP'in hücre çoğalmasını uyarmasıyla hücre artışına neden olması olabilir. Aynı zamanda NAC'nin 50 µg/ml DEP'in hücre çoğaltıcı etkisini ortadan kaldırması olabilir. DEP varlığının serumsuz ortamda hücre çoğalmasına etki edebilecek mitojenik sinyalleri oluşturabileceği ileri sürülmektedir (88). Çalışmalar DEP ve küçük çaplı PM'in insan bronş epitel hücrelerinde ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz ('extracellular signal-regulated kinase', ERK) sinyal iletilici yolağını aktive edebileceklerini göstermektedir (89). ERK aktivasyonunun hücre çoğalmasını uyarmak için yeterli ve gerekli olduğu bildirilmektedir (90). Bu nedenle, olasıdır ki DEP kimyasalları ERK aktivasyonu aracılığıyla bir mitojen gibi davranarak hücre çoğaltımının uyarılmasına neden olmaktadır (88). Bayram ve ark (2006) serumsuz ortamda yaptıkları çalışmalarda p21 gen ifadesinin DEP tarafından baskılandığı ve bunun hücre çoğalmasına eşlik ettiğini göstermesi de bu bulguları teyit etmektedir.

Ayrıca parçacıkların hücre yaşam döngüsü üzerindeki etkilerini araştıran diğer çalışmalarda da, DEP ve PM_{2.5} gibi parçacıkların fare makrofajlarında düşük dozlarda hücre çoğalmasına, daha yüksek dozlarda ise programlı hücre ölümüne yol açtıklarını göstermiştir (79). Dolayısıyla, hücre çoğalması ve programlı hücre ölüm sürecinin eş zamanlı olarak cereyan edebileceği düşünülmektedir (12). Ayrıca DEP'nin doza bağımlı olmadan A549 hücre hattı kültüründeki canlı hücre sayısını 48 saatin içinde artırdığı, 10µg/ml dozun ise en yüksek etkiyi gösterdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (12). DEP'nin aynı zamanda hücre döngüsünün G_{0/1} fazındaki hücre oranını azaltırken, S fazındaki hücre sayısını artırdığı da gösterilmiştir (12). Bundan başka, DEP'nin serumsuz ortamda artan A549 hücre ölümünü baskıladığı da gösterilmiştir (12).

P21 gen ifadesi değerlerinin CDK2 ve siklin-E gen ifadesi değerleriyle kıyasladığımızda ise p21 gen ifadesi sonuçlarını desteklediğini görmekteyiz. Bilindiği üzere p21 esas olarak siklinE/CDK2 bileşenine karışarak hücre çoğalmasını durdurur (50). Siklin E nin hücre döngüsü boyunca G1 evresinde en yüksek seviyeye ulaştığını bilinmektedir (44). Siklin E formlarının CDK2 ile bileşim oluşturup hücre döngüsünde G1 den S fazına geçişi sağladığı bilinmektedir (47). Bu bilgilere göre siklinE ve CDK2 gen ifadelerinin paralellik göstermesi beklenebilir. Teorik olarak da p21 gen ifadesi seviyesinin siklin E ve CDK2 gen ifadeleri ile ters orantılı olarak artmasını veya azalmasını bekleyebiliriz. Yaptığımız çalışmalarda büyük ölçüde bunu desteklemektedir. CDK2 gen ifadesi seviyesinin serumlu ortamda serumsuz ortama göre artış gösterdiği sonuçlarımızda yer almaktadır. Bununla beraber 50 µg/ml DEP ve NAC'li örneklerle bakıldığında ise NAC'li örneklerde 50 µg/ml DEP'li örneklerle göre CDK2 gen ifadesi azalmıştır. Bu da NAC'nin DEP'in hücre çoğalmasını artırıcı etkisini büyük ölçüde ortadan kaldırdığı düşündürmektedir. Siklin E gen ifade seviyelerine bakıldığında ise serumlu ortamda siklin E seviyesinin daha düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuç yukarıda elde edilen bulgularla çelişmektedir. Bunun sebebi gen ifadesi analizlerindeki teknik hatalardan kaynaklanıyor olabilir. Fakat 50 µg/ml DEP've NAC'li örneklerle bakıldığında CDK2 gen ifadesi sonuçları ile paralellik göstermektedir. DEP ve NAC ile yapılan çalışmalarda çalışılan diğer gen bölgelerinde gen seviyesi düzeylerinde anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

JNK inhibitörü ile yaptığımız çalışmalarda serumsuz ortamdaki p21 gen ifadesi ile JNK 10 µM ile karşılaştırıldığında JNK 10 µM olan örneklerdeki p21 gen ifadesinin anlamlı

olarak arttığı bulunmuştur. Bu sonuçtan JNK inhibitörünün hücre canlılığını baskıladığı sonucu çıkarılabilir. Nitekim KB-3 adındaki bir adenokarsinoma hücre hattı ile yapılan çalışmalarda JNK inhibitörünün hücre canlılığını baskıladığı bulunmuştur (80). Benzer şekilde 50µg/ml DEP ve 50µg/ml DEP-JNK33 µM 'lü örneklerde de p21 gen ifadesi seviyesinin JNK inhibitörü bulunan örneklerde DEP'li örneklere göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. Siklin E gen ifadesi seviyesine bakıldığında ise JNK 10 µM bulunan örneklerde anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir. Bu bulgu da JNK 10 µM olan örneklerdeki p21 gen ifadesi ile örtüşmektedir. 50µg/ml DEP ve 50µg/ml DEP- JNK33 µM 'lü örneklerde ki siklin E gen ifadesi seviyeleri karşılaştırıldığında ise JNK inhibitörü ve DEP bulunan örneklerde DEP'li örneklere göre siklin E gen ifadesi seviyesinin anlamlı bir artış göstermesi ise JNK inhibitörü ve DEP bulunan örneklerde hücre çoğalmasının uyarılmasını akla getirebilir. Yapılan çalışmalarda JNK aktivasyonunun, serumsuz ortamda bırakılan A549 hücrelerinde başlayan programlı hücre ölümüne eşlik ettiği, dolayısıyla bu yolağın aynı zamanda pro-apoptotik aktivite de gösterebileceği ileri sürülmektedir (81). Bazı oksidatif stres modellerinde de, JNK yolağının aktivasyonu aracılığıyla MAPK (mitojen aktive edici protein kinaz) yolağının uyarılmasının hücrede programlı hücre ölümüne yol açabileceği ileri sürülmektedir (82, 83). Böylece, JNK yolağı hem programlı hücre ölümü, hem de hücrenin yaşamı ile ilgili sinyallerin iletiminde rol oynayabilir (55). Bazı oksidatif stres modellerinde de, c-jun N-terminal kinaz (JNK) yolağının aktivasyonu aracılığıyla MAPK yolağının uyarılmasının programlı hücre ölümüne yol açabileceği ileri sürülmektedir (53,54). Yine bazı koşullarda, JNK yolağının aktivasyonunun hücre yaşam süresini artırabileceği ve hücre çoğalmasının uyarılmasını tetikleyebileceği belirtilmektedir (55).

ERK inhibitörü ile yaptığımız çalışmalarda serumsuz örneklere göre ERK 33 µM'lı örneklerde yine p21 gen ifadesinde azalma görülmüştür. Yine 50µg/ml DEP'li örneklerde p21 gen ifadesi seviyesi NAC ve JNK inhibitörü gruplarıyla yapılan deneylerdeki sonuçlarla örtüşmektedir. Siklin E gen ifadesi seviyelerine baktığımızda ise ERK 33 µM'lı örneklerde serumsuz örneklerdekine göre bir azalma söz konusudur. CDK2 gen ifadesi seviyesi ise serumsuz örneklere göre ERK 33 µM'lı örneklerde azalmıştır.

Bronş epitel hücreleri ile yapılan çalışmalarda ise hücreler farklı hastaların akciğer dokularından elde edildikleri için gen ifadesi seviyeleri oldukça değişkenlik göstermiştir. Sigara içen, sigara içmeyen ve KOAH'lı hastaların akciğer dokularından

elde edilen bronş epitel hücrelerinde c-MYC gen ifadesi seviyesi serumsuz örneklere göre 100 µg/ml DEP 'li örneklerde anlamlı olarak artmıştır. Parçacıkların hücre ölümü üzerine olan etkilerini araştıran çalışmalar, PM₁₀ gibi parçacıkların nekrozis ve programlı hücre ölümünü uyarak hücre ölümüne yol açabileceklerini göstermiştir (84, 85). Bu nedenle c-Myc'nin P53'ü aktive ederek programlı hücre ölümünü başlattığı düşünülebilir (74). Yapılan hücre canlılığı çalışmalarında; serumsuz ortamda düşük derişikliklerdeki DEP (1-50 µg/ml) hücre canlılığını artırırken, 100 µg/ml gibi yüksek derişikliklerin hücre canlılığını azalttığını göstermektedir.

ELISA yöntemi ile çalışılan örneklerde sigara içen, sigara içmeyen ve KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin 24 ve 48 saat DEP'e maruziyet sonrasında IL-8 ve GM-CSF salınımları ölçülmüştür. Bununla ilgili yapılan çalışmalarda partiküler hava kirleticilerinin hücrelerin çeşitli işlevleri ve inflamatuvar parametreler üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalar, DEP ve diğer parçacıkların *in vitro* ortamda hücrelerin fizyolojik işlevlerini bozabileceklerini ve inflamatuvar değişikliklere yol açabileceklerini göstermektedir (12). Bayram ve ark (2006) DEP'nin primer bronş epitel hücrelerin silya titreşim frekansını baskılayabileceklerini ve bu hücrelerden IL-8, GM-CSF ve çözülebilen hücreler arası yapışma molekülü (SICAM)-1 gibi inflamatuvar araçların salınımını artırabileceğini bildirmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada da, astımlı bireylerden elde edilen bronş epitel hücrelerinin DEP'e maruziyet sonrasında astımlı olmayan bireylerin hücreleri ile kıyaslandığında daha yüksek oranlarda IL-8, GM-CSF, RANTES ve SICAM-1 salgıladıkları bulunmuştur (12). Diğer yandan, DEP'nin non-toksik dozlarının üst ve alt havayolu epitelyum hücrelerinde doz ve zaman bağımlı olarak IL-8 ve GM-CSF üretimini arttırdığı gösterilmiştir (11). Bu etkinin bir protein sentez inhibitörü olan sikloheksimid (CHX) ile anlamlı olarak azaltıldığı izlenmiştir (86). Hücre hatları ile yapılan çalışmalarda ise; A549 hücrelerini 24 saat DEP maruziyeti sonrasında *IL-1α*, *IL-6*, *IL-8* ve *TNF-α*'nın mRNA gen ifadesinin doza bağımlı olarak arttığı ve DNA sonlarındaki kırıklarda artış olduğu görülmüştür (87).

Sigara içmeyen hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin 24 ve 48 saat DEP'e maruziyet sonrasında GM-CSF seviyelerinde 10 µg/ml ve 50 µg/ml DEP'te bir miktar artış gözlenmektedir. Bu sonuçlar DEP'in GM-CSF seviyesini artırabileceğini düşündürmektedir. 100 µg/ml ise anlamlı derecede azalma vardır. Burada ise bir çelişki

söz konusudur. 100 µg/ml deki azalma bu derişiklikte hücre sayısının önemli derecede azalmasından kaynaklanıyor olabilir. Sigara içen ve KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin 24 ve 48 saat DEP'e maruziyet sonrasında 100 µg/ml derişiklikte GM-CSF seviyesinde anlamlı derecede azalma söz konusudur. Burada da 100 µg/ml DEP derişiklikliğinin hücre ölümüne neden olması düşünülebilir.

Sigara içen, sigara içmeyen ve KOAH'lı hastalardan elde edilen bronş epitel hücrelerinin 24 ve 48 saat DEP'e maruziyet sonrasında IL-8 seviyelerinde 100 µg/ml DEP'te anlamlı olarak azalma söz konusudur.

Bronş epitel hücrelerinin 24 ve 48 saat DEP'e maruziyet sonrasında IL-8 ve GM-CSF salınımlarının değerlendirilmesinde hücrelerin farklı hastaların akciğer dokularından elde edildikleri göz önünde bulundurulmalıdır. Öneri olarak her hasta grubu ayrı ayrı değerlendirilebilir. Ayrıca bu örneklerin hücre canlılığı analizleri göz önünde bulundurulabilir.

KAYNAKLAR

1. WHO-United Nations Environment Programme. Urban Air Pollution in Megacities of the World. Blackwell, UK, 1992:7-13.
2. Lipfert F.W. Air Pollution and Community Health- A Critical Review and Data Sourcebook. USA: Van Nostrand Reinhold,1994:92-97.
3. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. JAMA 2002;287(9):1132-1141.
4. Draper WM. Quantitation of nitro and dinitro polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel exhaust matter. Chemosphere 1986;15:437-447.
5. Nel AE, Diaz-Sanchez D, Li N. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: Evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. Curr Opin Pulm Med 2001;7(1):20-26.
6. Cadet J, Bellon S, Berger M, Bourdat AG, Douki T, Duarte V, Frelon S, Gasparutto D, Muller E, Ravanat JL, et al. Recent aspects of oxidative DNA damage: Guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. BioChem 2002;383(6):933-943.
7. Mossman BT, Lounsbury KM, Reddy SP. Oxidants and signaling by mitogenactivated protein kinases in lung epithelium. Am J Respir Cell Mol Biol 2006;34(6):666-669.
- 8 . Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Jibiki I, Takizawa H, Kudoh S, Horie T. Diesel exhaust particles activate p38 map kinase to produce interleukin 8 and rantes by human bronchial epithelial cells and n-acetylcysteine attenuates p38 map kinase activation. Am J Respir Crit Care Med 2000;161(1):280-285.
- 9 . El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993;75(4):817-82.

- 10 . O'Reilly MA. Redox activation of p21cip1/waf1/sdi1: A multifunctional regulator of cell survival and death. *Antioxid Redox Signal* 2005;7(1-2):108-118.
11. Bayram H, Devalia JL, Khair OA, Abdelaziz MM, Sapsford RJ, Sagaj M, Davies RJ. Comparison of ciliary activity and inflammatory mediator release from bronchial epithelial cells of nonatopic nonasthmatic subjects and atopic asthmatic patients and the effect of diesel exhaust particles in vitro. *J Allergy Clin Immunol*, 1998; 102: 771-782.
12. Bayram H, Ito K, Issa R, Ito M, Sukkar M, Chung KF. Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles. *Eur Respir J*, 2006;27:705-713.
13. Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi. Çeviri editörü: Demir R. Palme yayınları, Ankara; 2006: 339-63.
14. Knight DA and Holgate ST, The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology* (2003) 8, 432–446.
15. Bayram H. The effect of air pollutants on functional and biochemical changes in bronchial epithelial cells from atopic patients with mild asthma and non-atopic non-asthmatic volunteers. Thesis for PhD, Academic Department of Respiratory Medicine, University of London 1998.
- 16-. Spina D. Epithelium smooth muscle regulation and interactions. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:S141-5.
17. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Hücrenin Moleküler Biyolojisi. Ankara TUBA 2008. 1272-1279.
18. Rogers DF. Airway goblet cells: responsive and adaptable frontline defenders. *Eur Respir J* 1994;7:1690-706.
19. Jeffery PK, Li D. Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes. *Eur Respir J* 1997;10:1655-62.
20. Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 2000-6.

21. Evans MJ, Plopper CG. The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane. *Am Rev Respir Dis* 1988;138: 481-3.
22. Evans MJ, Cox RA, Shami SG, Wilson B, Plopper CG. The role of basal cells in attachment of columnar cells to the basal lamina of the trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1989;1:463-9.
23. Snyder JC, Teisanu RM, Stripp BR. Endogenous lung stem cells and contribution to disease. *J Pathol* 2009;217:254-64.
24. Holtzman MJ. Arachidonic acid metabolism in airway epithelial cells. *Annu Rev Physiol.* 1992; 54:303-29.
25. Bayram H. Solunum Yolunun Primer Hücre Kültürleri. Türk Toraks Derneği Okulu Kitabı, 2006.
26. Matthay MA, Robriquet L, Fang X. Alveolar Epithelium Role in Lung Fluid Balance and Acute Lung Injury. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2(3):206-13.
27. Wang D, Haviland DL, Burns AR, Zsigmond E, Wetsel RA. A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 Mar 13;104(11):4449-54.
28. Fereol S, Fodil R, Pelle G, Louis B, Isabey D. Cell mechanics of alveolar epithelial cells (AECs) and macrophages (AMs). *Respir Physiol Neurobiol.* 2008;163:3-16.
29. Ulukaya E. Hücre Siklusu ve Apoptozis: Engin K, Özyardımcı N. Akciğer kanserleri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar. Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. Bursa, 2001 1-15.
30. Cooper G, Hausman R Hücre Moleküler yaklaşım. Üçüncü baskı İzmir tıp kitabevi 2006.
31. Cabadak H. Hücre siklusu ve kanser. ADÜ Tıp fakültesi dergisi 2008; 9(3) : 51 – 61
32. Köktürk N, Kırıçoğlu C, Öztürk C. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Solunum* 2003 Vol: 5 Sayı: 3 Sayfa: 127-138.

33. Alberts B, Bray D, Hopkin K. Manipulating genes and cells. In: Essential Cell Biology. 2nd ed. New York: GS Garland Science, Taylor& Francis Group; 2004: 323-327.
34. Bayram H, Dörtbudak Z, Fişekçi FE, Kargın M, Bülbül B. “Hava kirliliğinin insan sağlığına etkileri, dünyada, ülkemizde ve bölgemizde hava kirliliği sorunu” paneli ardından. Dicle Tıp Dergisi. 2006;33:105-112.
35. Ertürk F. Hava kirliliği vizyon ve misyon. Yıldız Teknik Üniversitesi İnş. Fak. Çevre Müh. Böl. Beşiktaş, İstanbul.
36. İncecik, S., Hava Kirliliği, Teknik Üniversite Matbaası, , s. 26-41, istanbul, 1994
37. Air Quality Guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global Update 2005; World Health Organization (WHO) 2006.
38. Bayram H, Dikensoy Ö. Hava kirliliği ve solunum sağlığına etkileri. Tüber ve Toraks Dergisi. 2006;54:80-89.
39. Brunekreef B, Holgate ST. Air pollution and health. Lancet. 2002;360:1233-1242.
40. Bosson J, Stenfors N, Bucht A, Helleday R, Pourazar J, Holgate ST, Kelly FJ, Sandström T, Wilson S, Frew AJ, Blomberg A. Ozone-induced bronchial epithelial cytokine expression differs between healthy and asthmatic subjects. Clin Exp Allergy. 2003;33:777-782.
41. Bayram H, Rusznak C, Khair OA, Sapsford RJ, Abdelaziz MM. Effect of ozone and nitrogen dioxide on the permeability of bronchial epithelial cell cultures of non-asthmatic and asthmatic subjects. Clin Exp Allergy. 2002;32:1285 -1292.
42. Bayram H, Sapsford RJ, Abdelaziz MM, Khair OA. Effect of ozone and nitrogen dioxide on the release of pro-inflammatory mediators from bronchial epithelial cells of non-atopic non-asthmatic subjects and atopic asthmatic patients, in vitro. J Allergy Clin Immunol. 2001;107:287-294.
43. Bayram H. Hava kirliliğinin solunum sistemi üzerine olan etkilerinin in vitro incelenmesi. Türkiye Klinikleri J Pulm Med-Special Topics. 2008;1:14-20.

44. Kelly K. Hunt , Khandan Keyomarsi. Cyclin E as a prognostic and predictive marker in breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2005 Aug;15(4):319-26.
45. Caldon CE, Daly RJ, Sutherland RL, Musgrove EA .Cell Cycle Control in Breast Cancer Cells *J Cell Biochem*. 2006 Feb 1;97(2):261-74.
46. Angel R Nebreda. CDK activation by non-cyclin proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Apr;18(2):192-8. Epub 2006 Feb 17.
47. Lee MH, Yang HY. Regulators of G1 cyclin-dependent kinases and cancers. *Cancer Metastasis Rev*. 2003 Dec;22(4):435-49.
48. Coqueret O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol*. 2003 Feb;13(2):65-70.
49. Nakayama K, Nakayama K. Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays*. 1998 Dec;20(12):1020-9.
50. Gartel AL. P21WAF1/CIP1 May Be a Tumor Suppressor After All. *Cancer Biol Ther*. 2007 Aug;6(8):1171-2. Epub 2007 Jul 9.
51. Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*. 2004 Aug 4;337:1-13.
52. Pucci B, Kasten M, Giordano A. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia*. 2000 Jul-Aug;2(4):291-9.
53. Whyte J, Bergin O, Bianchi A, McNally S, Martin F. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res*. 2009;11(5):209.
54. Mebratu Y, Tesfagzi Y. How ERK1/2 Activation Controls Cell Proliferation and Cell Death Is Subcellular Localization the Answer? *Cell Cycle*. 2009 Apr 15;8(8):1168-75. Epub 2009 Apr 11.
55. Davis RJ: Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103:239 – 252, 2000.

56. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol.* 1998 Apr;10(2):205-19.
57. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF- κ B as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors.* 2007;29(1):19-35.
58. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. NF- κ B Signaling Pathway and Its Therapeutic Implications in Human Diseases. *Int Rev Immunol.* 2008;27(5):293-319.
59. Muriel P. NF- κ B in liver diseases: a target for drug therapy. *J Appl Toxicol.* 2009 Mar;29(2):91-100.
60. Andela VB, Schwarz EM, Puzas JE, O'Keefe RJ, Rosier RN. Tumor metastasis and the reciprocal regulation of prometastatic and antimetastatic factors by nuclear factor kappaB. *Cancer Res* 2000;60(23):6557-62.
61. Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor- kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(1):3-9.
62. Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996;6:995-1001.
63. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:169-93.
64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
65. Yatkın S, Bayram A. İzmir havasında partikül madde kirliliği:ölçüm ve değerlendirme. *DEÜ Mühendislik fakültesi Fen ve Mühendislik dergisi* 2007;9:2-4.
66. Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, Ohtoshi T, Miyabara Y, Sagai M, et al. The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1998;18:441-448.
67. Health assessment document for diesel engine exhaust. EPA/600/8-90/057F, May 2002. National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

69. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):165-75.
70. Roth JA. Molecular events in lung cancer. *Lung Cancer* 1994; 10 (Suppl 1):3s-15s.
71. <http://www.wolframalpha.com/input/>
72. Dang CV. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol*. 1999 Jan;19(1):1-11.
73. Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene*. 2002 May 13;21(21):3414-21.
74. Vermeulen K, VanBockstaele DR, Berneman Z N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 2003; 36: 131-49.
75. <http://genemania.org/search.jsf?jsessionid=356F19DB7131F9D0C01472EFE94D7FD7>
76. Salvi SS, Nordenhall C, Blomberg A, Rudell B, Pourazar J, Kelly FJ, Wilson S, Sandström T, Holgate ST, Frew AJ. Acute exposure to diesel exhaust increases IL-8 and GRO-alpha production in healthy human airways. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Feb;161(2 Pt 1):550-7.
77. Kuby, J. *Immunology*, 1992 W.H. Freeman and Company, 245.
78. Clemens, M.J. *Cytokines*, Oxford, 1991 Bios Scientific Publishers Ltd. 57-75.
79. Sagai M, Furuyama A, Ichinose T. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP): III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice. *Free Rad Biol Med* 1996; 21: 199-209.
80. Koike E, Hirano S, Shimojo N, Kobayashi T. cDNA microarray analysis of gene expression in rat alveolar macrophages in response to organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicol Sci*. 2002;67:241-246.
81. Du L, Lyle CS, Obey TB, Gaarde WA, Muir JA, Bennett BL, et al. Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity:

evidence that mitotic Bcl-2 phosphorylation is JNK-independent. *J Biol Chem*. 2004;279:11957–11966

82. Abukhdeir AM, Park BH. P21 and p27: roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med*. 2008;10:1-19

83. Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 2000;288:870-874

84. Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE. Comparison of the Pro-Oxidative and Proinflammatory. Effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol*. 2002;169: 4531-4541.

85. Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Bonner JC, Murray JC, Rosas I, et al. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspect*. 2002;110:715–720.

86. Takizawa H, Ohtoshi T, Kawasaki S, Abe S, Sugawara I, Nakahara K, et al. Diesel exhaust particles activate human bronchial epithelial cells to express inflammatory mediators in the airways: a review. *Respirology*. 2000;5:197-203.

87. Dybdahl M, Risom L, Bornholdt J, Autrup H, Loft S, Wallin H. Inflammatory and genotoxic effects of diesel particles in vitro and in vivo. *Mutat Res*. 2004;562:119-131.

88. Li N, Nel AE. The cellular impacts of diesel exhaust particles: beyond inflammation and death. *Eur Respir J* 2006; 27: 667-668.

89. lee CC, Cheng YW, Kang JJ. Motorcycle exhaust particles induce IL-8 production through NF-kappaB activation in human airway epithelial cells. *J Toxicol Environ Health A* 2005; 68: 1537–1555.

90. Lents NH, Keenan SM, Bellone C, Baldassare JJ. Stimulation of the Raf/MEK/ERK cascade is necessary and sufficient for activation and Thr-160 phosphorylation of a nuclear-targeted CDK2. *J Biol Chem* 2002; 277: 47469–47475.

91. Bermudez E, Stone K, Carter CM, Pryor WA. Environmental tobacco smoke is just as damaging to DNA as mainstream smoke. *Environ Health Perspect* 1994;102:870-4.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Giresun'un Alucra ilçesinde doğdum. İlk ve Orta öğrenimimi burada tamamladıktan sonra Lise öğrenimimi Fatsa Lisesi'nde (Yabancı Dil Ağırlıklı) tamamladım. 2004 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitime başladım ve 2008 yılında buradan mezun oldum. Aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitime başladım. 2011 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandım. Halen Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.