

T. C.
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi
Patoloji Bilim Dalı

t
141

9 L DENEYSEL SIÇAN GLİOMASININ
DOKU KÜLTÜRÜNE UYGULANAN
1.3 - Bis (2-chloroethyl) -1 - nitrozourea
(BCNU) nın ANTİTÜMÖRAL ETKİSİNİN
İNCE YAPISAL DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI.

T. C.
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
KİMLİK KÜTÜPHANESİ

(Doçentlik Tezi)

Dr. Nilüfer TEL

Eskişehir – 1980

İÇİNDEKİLER

1- GİRİŞ	1
2- GENEL BİLGİLER	3
3- MATERYEL ve METOD	12
4- BULGULAR	15
5- TARTIŞMA	41
6- SONUÇLAR	46
7- ÖZET	48
8- KAYNAKLAR	49

GİRİŞ

Son yıllarda tanı metodlarındaki gelişme ile vücudun çeşitli yerlerindeki kanserler git-tikçe daha erken tanımlanmaya başlanmış olup, cerrahi ve ilaçlarla tedavi de daha fazla önem kazanmıştır. Cerrahi ve radyoterapi ile ulaşılamayan veya cerrahi tedaviden sonra da tekrarlama şansı büyük olan tümörlerde ise kemoterapi tek tedavi yolu olmaktadır. Başarılı bir kanser kemoterapisinde amaç, normal vücut hücrelerine zarar vermeden, primer tümör veya metastazları ile birlikte, normal tanı metodları ile saptanamayan son tümör hücresine kadar ulaşarak büyüme ve yayılmayı önlemektir. Vücudun diğer organlarındaki tümörlere kemoterapi ile erişmek, beyin tümörlerine erişmekten daha kolay olup, bu tümörlerde ke-moterapi ile başarı oranı da beyin tümörlerindekiinden daha yüksek olmaktadır. Beyin tü-mörlerinde birçok kanser ilacının etkisiz kalışının başlıca nedeni ise oral veya parenteral ve-rilen ilaçların fizyolojik kan beyin barajını yeterli seviyede geçememeleridir. Ayrıca bu ilaç-lardan pek çoğu da yan etkileri nedeniyle beyin omurilik sıvısına verilememektedir.

İnsanlarda beyin tümörü insidansının kabaca 100.000'de 4.5 gibi küçümsenemeyecek bir oranda oluşu (40) beyin tümörleri tedavisinde etkin ve kolay uygulanabilecek kemotera-pötik ajanların araştırılmasına daha da hız kazandırmıştır. Bu araştırmalar sırasında bulunan nitrozürea grubu kemoterapötiklerin kan-beyin barajını geçerek tümör hücrelerini harabetti-ği, tümörün büyümesini durdurduğu fakat normal beyin hücrelerine çok az zarar verdiği ka-nıtlanmıştır. Çalışmaların ilerlemesiyle sentez edilen 300 çeşit nitrozürea grubu ilaçtan be-yin tümörlerine en çok etkili olanının ise BCNU (1, 3-Bis (2-Chloroethyl)-1-nitrosourea) olduğu saptanmıştır (31).

BCNU'nun insanlardaki beyin tümörlerinde başarılı tedavi sonuçları, literatürde ve ül-kemizde geniş kapsamlı ultrastrüktürel bir çalışmanın yapılmamış olması bizi bu ilacın de-neysel hayvan tümörlerinde oluşturduğu ultrastrüktürel değişiklikleri incelemeye yöneltti. Çalışma için ultrastrüktürel yapısı iyi bilinen ve Benda tarafından geliştirilen 9 L sıçan glio-masına ait tek kat doku kültürü seçildi (6). Grasso ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada bir başka sıçan beyin tümöründe (C₆ glioma) düşük dozdaki (1-10 µg/ml) BCNU'nun hücrele-re etkisi incelenmiştir. Değişik ilaç dozlarının kullanılmadığı bu çalışmada sadece tümör hücre organellerinin volüm değişiklikleri incelenmiş ve Dexamethason'un etkisi ile karşılaştı-rılmıştır (14-15).

Bizim çalışmamızın amacı ise, BCNU'nun değişik dozlarına, 9 L sıçan gliomasına ait tümör hücrelerinin ultrastrüktürel seviyedeki cevaplarını ve organellerindeki değişiklikleri saptamaktır. Bu amaç ile her doz için tümör hücrelerinin:

1. Hücre zarı
2. Nukleusu
3. Mitokondrileri
4. Endoplazmik retikulumu
5. Golgi aygıtı
6. Mikrofilamentleri
7. Lizozomları
8. Myelin cisimcikleri
9. Ribozomları'ndaki değişiklikler tek tek incelenmiş ve ilaçla karşılaştırılmamış kontrol kültür hücreleri ile aralarındaki farklılıklar saptanmak istenmiştir.

Çalışmamızın diğer amacı da ilaç dozunu arttırarak tümör hücresinin üreme ve yaşam fonksiyonlarını durduran en etkin optimal dozu deneysel olarak saptamaktır. Bu suretle etkisiz kalabilecek düşük dozlardan veya gereğinden yüksek dozun kullanılmasından kaçınılabileceğini düşünmekteyiz.

Bu araştırma Amerika Birleşik Devletleri'nde California Üniversitesi, San Francisco Tıp Merkezinde yapılmıştır.

Çalışma, Public Health Service ve A.I.D. tarafından, para ve malzeme bakımından desteklenmiştir.

GENEL BİLGİLER

Primitif Nöroektodermden köken almış primer beyin tümörlerinin çoğunun nöroglial dokudan çıktığı kabul edildiğinden tümüne glioma demek alışkanlık olmuştur. Çeşitli serilerde gliomalar bütün intrakranial tümörlerin % 30–60'ını kapsamaktadırlar. Nekropsilerde bulunan tümörler glioblastoma multiforme gibi daha malign tipleri içerdiğinden nekropsiler ile yapılan çalışmaların sonuçlarında, malign tümörlerin görülme oranı, biopsi sonuçlarına dayanan çalışmalara göre daha yüksek bulunmaktadır (29). Intrakranial tümör insidensi, yaş arttıkça hafif bir artma gösterir, fakat gliomaların çocukluk çağında da fazla görülmesi, beyin tümörlerinin çocukluk çağı tümörleri arasında lösemi ve lenfomalardan sonraki sırayı alması ile açıklanabilir (21, 48). Gliomaların spinal kordda görülme oranı daha düşüktür. Erkeklerde kadınlara göre iki misli fazla görülür. Tümör, erişkinlerde supratentorial, çocuklarda ise subtentorial yerleşim gösterir.

Glial seri tümörleri:

I– Astrositik grup

1. Astrozitoma
2. Astroblastoma
3. Polar spongioblastoma

II– Oligodendroglioma.

Oligodendroglioma.

III– Ependima ve benzeri dokular

1. Ependimoma. Subependimoma.
2. Choroid–plexus papillomu
3. Colloid kist.

IV– Glioblastoma multiforme.

olarak gruplandırılırlar (29).

Bu araştırma bir sıçan glioblastomasının tek katlı doku kültüründe gerçekleştirilmiş olduğundan çalışma ile ilgisi olan çeşitli konular için, ayrı başlıklar altında kısa bilgiler verilmeğe çalışılacaktır.

GLİOBLASTOMALAR, IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOPİK YAPILARI:

Glioblastomalar karakteristik olarak beynin beyaz cevherini ilgilendirirler. Genellikle geniş yayılım yaparlar. Beynin ön kısmında arkaya göre daha sık yerleşim gösterirler ve sıklıkla frontal lobları tutarlar. Birçok vak'ada birden fazla lob tümör tarafından işgal edilmiş bulunur. Genellikle sferik bir kitle oluştururlar. Kesit yüzünde sağlam kenar dokular gri-pembe, nekrotik orta kısımlar ise opak gri-sarı renklidir. Değişik şiddette kanama sahaları vardır. Ufak çaplı bir iki kist içerebilir ve bunların içi sarı veya kahverengi mayii ile dolu bulunur. Tümörün en belirgin özelliği hücre şekillerinin çok çeşitli olmasıdır. Bu nedenle "multiforme" adı verilmiştir. Tümör, değişik mikroskop sahalarında ve tümörden tümöre çok farklı görünüm sergiler. Bazı alanlarda değişik şekil ve çapta poligonal hücre kitleleri görülür. Genellikle atipik olan mitozlar ve çok çekirdekli dev hücreler vardır. Başka bir sahada hücreler daha ziyade iğ biçiminde görülebilir. Birbirleri ile çaprazlaşan kısa demetler oluştururlar. En karakteristik görünüm ise hücrelerin yanyana sıralandıkları ve uzantılarını ortada mevcut bir nekroz alanına doğru yönelttikleri "palisading" oluşumudur. Nekroz ufaksa bu görünüm rozete benzer (30).

GLİOBLASTOMALARIN ELEKTRON MİKROSKOPİK YAPISI: Hücre şekli ve nükleer görünümü polimorfizm gösterir, Scanning elektron mikroskopunda hücre yüzeyi kırışık görülür. Nükleusun kromatin dağılımı gelişigüze'dir. Çok veya az sayıda, normal veya atipik mitokondri içerir. Golgi aygıtı nadir görülür. Çok sayıda ve çoğu endoplazmik retikulu-ma bağlı olan ribozomlar vardır. Bazı tümör hücreleri ve onların hücresel uzantıları çok sayıda intrasitoplazmik mikrofilament ihtiva ederler. Bu bulgu, hücrelerin astrositik orijinli olduğunu gösterir. Fakat, çok immatür hücrelerde filament görülmez. Monstersellüler sarkomanın özelliği olan intra ve ekstrasellüler kollagen fibriller, glioblastomada görülmez ve bu da ayırıcı tanıda yardımcı bir faktör olarak kabul edilmektedir (30, 51).

HÜCRE KİNETİĞİ: Kanser kemoterapisinde hücre kinetiği, tümörün büyümesi ve hücrelerin mitotik siklusunun belirli fazları esnasında ilaca duyarlılıkları olarak ifade edilmektedir (50). Mitotik siklusun 4 ayrı fazı vardır.

1. Sentez fazı (S)
2. Premitotik ara (G_2)
3. Mitoz fazı (M)
4. Post mitotik ara (G_1)

1. Sentez fazında DNA, RNA ve protein sentezi artmıştır. Tümörlerin çoğunda bu faz 7-10 saattir.

2. Sentez sonrası fazı (G_2), kısa süredir (30-90 dakika). Bu fazda DNA iki yavru hücreye eşit miktarlarda ayrılır.

3. Mitoz fazı (M) RNA ve protein sentezi tamamlanır ve hücre iki yavru hücreye bölünür.

4. Post mitotik ara (G_1). Çeşitli hücre tipleri arasında süre olarak en fazla farklılık gösteren fazdır. Normal hücrelerde 2 saat sürer. Bu fazın sonuna doğru DNA yapımı başlar. G_1 fazını tamamlayan hücrelerin hepsi S fazına katılmazlar, bir kısmı dinlenme fazına ayrılır (G_0). Bu hücreler uygun zamanda tekrar hücre siklusuna katılabilirler. Solit tümörlerin merkezinde bu hücreler bulunur. Bunların etrafında normal sıklusa devam eden hücreler yer alır. Cerrahi rezeksiyondan sonra, ortada kalabilen bu hücreler sıklusa girerek tümörü sür'atle büyütebilirler. Bazı kemoterapötiklerin hücre siklusunun belirli fazlarında daha etkili oluşu nedeniyle hücre kinetiğinin iyi bilinmesinde yarar vardır.

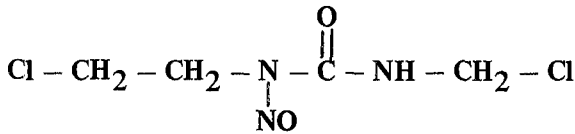
KEMOTERAPİ

Bugün Tıp Bilimi kanser araştırması ve tedavisi üzerine gittikçe artan bir ilgi ile eğilmektedir. Kemoterapötiklerle tümörlü bir hastayı bir süre için de olsa iyileştirmek, daha evvelce yapılan yüzlerce araştırmanın katkısı ile olabilmektedir. Nitrozürea türevlerinin bulunması ve kanser kemoterapisine girmesi ile malign beyin tümörlerinin tedavisi için de yeni bir umut belirmiştir. Bilindiği gibi birçok sitostatik ilaç kan-beyin barajı, nörotoksite, yaşam merkezleri ile tümörün aynı yeri işgal etmesi ve tümör çevresindeki sağlam beyin dokusunda meydana gelen sekonder değişiklikler nedeni ile beyin tümörlerine beklenen oranda etkin olamamıştır.

İlk defa 1959 yılında, "Cancer Chemotherapy National Service Center"da L 1210 fare lösemisine etkinliği az olan 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (MNNG) sentez edilmiştir. Kısa bir süre sonra elde edilen ve yapısı buna benzer olan 1-Methyl-1-nitrosoürea (MNU)'nın ise daha etkin olduğu gösterilmiştir. Aynı yıllarda "Southern Research Institute" de MNU'nun türevleri sentez edilmiş olup bunlardan biri olan BCNU (1, 3-Bis (2-chloroethyl)-1-nitrosoürea) bu laboratuvarında sentez edilen 22'nci nitrozüreadır. Daha sonra ise 300'ü aşan sayıda nitrozürea türevi geliştirilmiştir (31). Bunlardan BCNU gibi çeşitli tümör cinslerine etkili olan ve halen kullanılanlar; (CCNU 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosoürea) ve Methyl-CCNU (1-(2-chloroethyl)-3-(4.methyl cyclohexyl)-1-nitrosoürea)dur.

BCNU'NUN ÖZELLİKLERİ:

BCNU Santral sinir sistemi tümörlerine en etkili olan nitrozürea türevidir. Diğer kemoterapötiklere üstünlüğü kan-beyin barajını süratle geçmesidir. Yağda ve absölü alkolde erir. Kanda yarılanma süresi 5 dakikadır. Bu nedenle kendisinin mi yoksa yıkım ürünlerinin mi tesirli olduğu tartışmalıdır. Hücre siklusunda, proliferen olan hücrelere ve bütün fazlara etkindir. Küçük molekülüdür. Açık formülü şekil I'deki gibidir (23).



Şekil I.

BCNU alkilleyici olarak etki eder. Ekstraserebral tümörlerden lösemilere, Hodgkin hastalığına, Kaposi sarkomuna, melanomlara gastrointestinal kanserlere ve diğer bazı sarkom çeşitlerine etkili olduğu da gösterilmiştir. Hastalara 6-8 hafta ara ile 80-120 mg/m² intravenöz olarak 2 veya 3 gün üst üste, tek doz halinde verilmektedir. Toksik etkileri kemik iliği, lenfoid doku, böbrekler, akciğerler, karaciğer ve gastrointestinal sistem üzerinedir (23, 41).

DENEYSEL HAYVAN BEYİN TÜMÖRLERİ:

Hayvanlarda primer beyin tümörü görülme oranı insanlara göre çok azdır. Bu nedenle araştırmacılar deneysel olarak tümör oluşturma yoluna gitmişlerdir. Bu amaç ile kullanılan metodlar şöyle özetlenebilir (5).

1- Tümör transplantasyonu: (İnsandan hayvana, hayvandan hayvana) Transplantasyon yerleri göz ön kamerası; karın derisi altı; yanak yağ paketi ve beyindir.

2- Kimyasal kansinojenler ile tümör geliştirme: Bu amaç ile methylcholantrene, dibenzanthracene, benzpyrene (27, 28, 49). N-nitrosomethylurea (6), ve N-ethyl-N-nitrosoure (17) gibi karsinojenler başarı ile kullanılmış ve çeşitli hayvan beyin tümörleri geliştirilmiştir.

9 L SIÇAN GLIAL TÜMÖRÜ IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOPİK YAPISI

Benda ve arkadaşları tarafından sıçanlara N-nitrosomethylurea'nın defalarca İ.V olarak verilmesi ile oluşturulan primer beyin tümörünün kültür pasajları ile çoğaltılıp, tekrar hayvanlara verilmesi ve çok sayıda kültür-kültür, hayvan-kültür, pasajları sonucunda elde edilmiş tek katlı saf tümör kültürüdür (6). Dondurularak saklanan kültürler çözüldüğünde yine orijinal morfolojik özelliklerini göstermektedirler.

Tümör genellikle yıldızsı, bipolar veya polihedral hücrelerden oluşmuştur. Çok nüveli dev hücreler içermekte olup hepsinde nadir sitoplazmik glial fibril görülür.

Tümör hücre kültüründen elektron mikroskobu çalışmaları için hazırlanan dokuda ise ince yapı şöyle bulunmuştur: Hücreler tripsinizasyona bağlı olarak oval veya yuvarlak olup çok sayıda uzantıları vardır. Bu uzantılar içinde mikrotubuliler, serbest ribozomlar ve nadir mitokondriler bulunur. Organeller arasında gevşek ince ve yaygın filamentler görülür. Nukleus büyük ve irregüler olup nükleer membran derin katlanmalar gösterir ve bir kaç nukleolus içerir. Dev hücrelerin hücre zarı daha düzgün olup sitoplazmalarında nisbeten az sayıda lizozom ve granüllü endoplazmik retikulum saptanır. Serbest ribozom sayısı fazla olup sitoplazmik mikrofilament görülmemiştir. Nükleer membran ise küçük hücrelere göre daha düzgündür (4).

NORMAL HÜCRENİN ULTRASTRÜKTÜREL YAPISI, ORGANELLERİ VE GÖREVLERİ

Hücreler primitif olarak Küresel şekillidir. Çok hücreli canlılarda, üst üste yığılım nedeni ile çok yüzlü hal alırlar. Doku kültürlerinde üretilen ve tek hücre süspansiyonu yapılan hücreler de küresel şekilde bulunurlar.

Hücre Zarı: Bütün hücresel zarlar Lipid, protein ve karbonhidratlardan yapılmışlardır. Morfolojik yapı, unit zar (unit membrane) diye adlandırılan ortada şeffaf, iki yanda koyu renkli çizgi olarak görülen üç tabakadan ibarettir. Üç tabakanın total kalınlığı 75-100A⁰ dur. Bu zar üzerinde çapları 10A⁰ olan küçük delikler (pore) bulunur. Ortadaki açık renkli bölgenin fosfolipid moleküllerinden, iki yandaki koyu renkli tabakanın proteinden yapıldığı düşünülmektedir. Son zamanlarda bu membranların en dışında glikoprotein yapısında bir maddenin varlığı da kanıtlanmıştır. Hücreyi dıştan saran zar iç katlantılar yaparak sitoplazmayı bölmelere ayırır, bu şekilde endoplazmik retikulumu, tubulusları, mitokondrileri, Golgi apparatusunu ve lizozomlar gibi zarla çevrelenmiş, farklı görevleri olan sitoplazma içi organelleri meydana getirir. Ünit zarın hücrenin dışına doğru eldiven parmağı şeklinde yaptığı basit uzantılara mikrovillus denir. Çok ileri elektron mikroskop büyütmeleri ile bakıldığın-

da mikrovilluslar içinde ince flamanlar görülür. Bunların mikrovilluslara dirilik veren bir çatı ödevi gördükleri düşünülmektedir. Mikrovilluslar, safra kesesi, barsak epiteli, böbrek tubali epiteli gibi bazı organların epitel hücrelerinde iyi gelişmiştir. Hücre zarının mikrovilluslardan daha iri çıkıntılına kinosilyum denir. Bunlar larenks, trakea ve tuba uterina içini düşeyen epitel hücrelerinde bulunur. Epididimis ve ductus deferensin içini döşeyen epitel hücrelerinde ise unit zar çok uzun ve silindir biçiminde uzantılar yapar ki bunlara "stereosilyum" denir.

Aynı organı yapan hücreler birbirleri ile üç çeşit bağlantı kompleksi ile ilişkidirler. Bunlar sıra ile zonula okludens (occlusion zones veya terminal bars), zonula adherens (adherent zone veya intermediate junction) ve desmozom (adhesion discs) olarak adlandırılırlar. Elektron mikroskobunun en yüksek büyötmeleri ile iki hücre arasında 100–200A⁰luk bir mesafe olduğu görülür. Bu aralık karşılıklı elektostatik itme kuvvetleri ile devamlı korunur. Bu hücreler arası bağlantılar sayesinde dokuların düzgün yapısı meydana gelmiş olur.

Çekirdek (Nukleus): Kırmızı kan hücreleri dışında hemen bütün memeli hücreleri çekirdek içerirler. Kübik, poligonal ve yassı şekilli hücrelerde çekirdek orta kısımda (sentrık) yerleşmiş olarak görülür. Prizmatik ve piramit biçimli hücrelerde ise alt yüze daha yakın dururlar (eksentrık).

Büyüklük ve şekilleri hücreden hücreye değişiklik gösterir. Dinlenme durumunda (interfaz) bulunan bir çekirdekte çekirdek zarı, çekirdek sıvısı, çekirdekcik ve kromatin bulunur.

Çekirdek zarı (karyoteka): Elektron mikroskobu ile incelendiği zaman çekirdeğin çevresini çift katlı unit zarın çevrelediği görülür. İki unit zar arasında 400–700A⁰ arasında değişen bir aralık vardır. İçteki zar düz yüzlüdür, dıştakine ribozomlar tutunmuş bulunur. Dış zar yer yer endoplazmik retikulum duvarları ile devam eder. Böylelikle ilişkisi dış hücre zarına kadar sürer. Zar üzerinde çapları 250–600A⁰ arasında değişen delikler (porus) vardır. Deliklerin çevresinde iç ve dış zarlar birbiri ile birleşirler. Çok yüksek büyötmelerle deliklerin çok ince bir diyafram ile örtüldükleri görölmüştür. Bu yol ile çekirdek ve sitoplazma arasında seçici bir madde değişimi olur. Örneğin: ribonükleik asit molekülleri, polipeptidler, tuzlar ve şekerler çekirdekten sitoplazmaya akarlar. Hücre bölünmesi sırasında çekirdek zarı enzimlerin etkisi ile eriyip ortadan kalkar.

Çekirdek sıvısı (Karyoplazma): Homojen görünümlü, belirgin yapısı olmayan bir sıvıdır. Kromatin ağı ile çekirdek arasındaki boşlukları doldurur. Çekirdekcikler (nukleolus): Hücre çekirdeği içinde bir veya birkaç tane olarak bulunur. Ribonükleoproteinden yapılmışlardır. X-ışınları veya ultraviyole ışınları çekirdekcikte RNA yapımını durdurur. RNA yapımında rol oynayan messenger RNA ve transfer RNA kromozomlarda sentez edilir. Ribozomal RNA ise çekirdekcikte toplanır. Bu üç çeşit RNA'da çekirdekdeki poruslar aracılığı ile sitoplazmaya serbest olarak geçerler.

Kromatin: Çekirdek içinde ince uzun iplikciklerin ağ şeklinde oluşturdukları yapıdır. Dezoksiribonükleik asit, protamin ve histon tipi proteinlerle bir arada ince uzun nükleoprotein molekülü oluşturur. Bunlar kromatin iplikcikleridir. Nükleoprotein molekülü ise bir çift nükleotid zincirinin birbiri üzerine sarılarak yaptığı heliks biçiminde bir yapıdır. Dezoksiribonükleoprotein makromolekülünü yapan nükleotidlerin belirli bir sıra ve düzenle dizilmeleri ile molekül boyunca gen blokları oluşur.

Çekirdeğin en önemli görevi hücrenin bölünerek çoğalmasını sağlamaktır. Hücrenin tüm karakterlerini taşıyan kalıtsal madde de çekirdekdeki genlerde toplanmıştır.

Mitokondriler: Elektron mikroskopi ile incelemede uzunlukları 1-4 mikron, çapları ise 0,5 mikron olan içi tanecikli ince uzun yapılardır. Etraflarını çevreleyen unit zar çift katlı olup ikisi arasında 80\AA kadar bir aralık vardır. İç yandaki unit zar "krista" adı verilen çıkıntılar yapar. Kristalar birbirlerine paralel olarak uzanırlar. Kristaların arasını dolduran matriks lipid, protein ve enzimler içerir. İleri elektron mikroskop büyütmelerinde matriksde $300-500\text{\AA}$ büyüklüğünde tanecikler gözlenmiştir. Ayrıca iç ve dış zar da belirli sayıda ve belirli düzende sıralanmış tanecikler içerir. Bu taneciklerin solunum ve fosforilasyon yapan enzimlerden oluştuğu düşünülmektedir.

Mitokondriler'in kimyasal bileşiminde % 70 proteinler, % 30 fosfolipidler yer alır. % 1 den az olarak ribonükleik asit ve dezoksiribonükleik asitlerin varlığı da gösterilmiştir. Bu nedenle mitokondrilerin kendi başlarına bölünüp çoğaldıkları ve çekirdek dışı özel kalıtsal bilgiler taşıdıkları düşünülmektedir.

Hücre içindeki tüm hayatsal olayların başarılabilmesinde gerekli olan enerjinin % 95'i ni mitokondriler sağlar. Hücre içi enerji, mitokondrilerdeki adenozin trifosfatın üçlü fosfat bağlarında depolanır. Sitokromlar, koenzimler, dehidrogenazlar ve oksidatif fosforilasyon enzimleri mitokondrilerin iç zarına tutunmuş tanecikleri oluştururlar. Krebs siklusunun enzimlerinin tümü, protein ve lipid yapımı ile ilgili enzimler ise matriksde bulunurlar.

Anoksi, ortamın PH'sının ve ozmotik basıncının değişmesi gibi hücreye zararlı olan etkenlere karşı mitokondriler çok çabuk duyarlık gösterirler. Bu durumlarda ATP yapımı için gerekli olan oksidatif fosforilasyon azalır ve mitokondri zarının bütünlüğü bozulur. Geçirgenliği artar ve dışı iyon pompalama yeteneği düşer. Plazmadan mitokondri içine doğru bir akım olur. Organel şişer, kristaları azalır, dizelenmeleri bozulur veya tüm olarak ortadan kalkar. Mitokondri, zarının Mg, K ve PO_4 gibi maddelere karşı seçici bir özelliğe sahip olduğu da gösterilmiştir.

Endoplazmik retikulum: Granüllü ve granülsüz olmak üzere iki türdür. Granüllü(kaba) endoplazmik retikulum dallanarak birbirleri ile anastomozlaşan ve hücre içinde düzensiz bir ağ biçiminde yayılan ince tubuluslardan oluşur. Elektron mikroskobu altında incelenen kesitlerde çok sayıda enine (vezikül) ve boyuna kesitleri gözlenir. Bu tubulusların yüzeylerine, 150\AA çapındaki ribonükleoprotein tanecikleri (ribozom) düzenli bir şekilde dizilmişlerdir. Ribozomlar tubuluslara granüllü bir görünüm verirler. Granüllü endoplazmik retikulum protein sentezi ile görevlidir. Çok çeşitli enzimler taşır. Örneğin, glukuro lakton redüktaz, laktat dehidrogenaz, L-amino asit oksidaz, monamin oksidaz, glukoz-6-fosfat, glukuronidaz v.b. Protein sentezinin taşı taşıları ribozom tanecikleridir. Yapılması gereken polipeptid zincirinin şifresini taşıyan haberci ribonükleik asit (messenger RNA) ve sitoplamaya alınan aminoasitleri, sentez yerine taşıyan taşıyıcı ribonükleik asit (transfer RNA) kromozomlarda yapıldıktan sonra plazmaya verilir. Ribozomal ribonükleik asit ise çekirdekten gelir. Bu üç farklı ribonükleik asidin işbirliği ile protein sentezi yapılır.

Granülsüz (düz) endoplazmik retikulumu oluşturan tubulusların duvarlarında ribozom tanecikleri bulunmaz. Granülsüz endoplazmik retikulumun Golgi kompleksi ile yapı bakımından ilişkili olduğu düşünülür. Bu organelin de hücre içinde çeşitli görevleri vardır. Örneğin, steroid salgılayıcı hücrelerin steroid sentezine iştirak eder. Diğer bazı hücrelerin de toksikasyon işlemine katılır. Lipid ve glikojen sentezi gibi metabolik olaylara katılır. Lipid sentezinin de protein sentezine benzer bir şekilde yapıldığına inanılmaktadır. Granülsüz endoplazmik retikulumda birçok enzimlerin varlığıda gösterilmiştir. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, glukoz-6-fosfat, 5-nükleotidaz, aril hidroksilaz, kolesterol esteraz, glutation redüktaz ve glukronil transferaz bunların başlıcalarıdır.

Golgi kopleksi (golgi aygıtı): Hücre içinde çekirdeğe çok yakın bir yerde bulunur. Elektron mikroskobu ile tetkik edildiğinde, birbirlerine paralel yassı tubuluslardan oluştuğu görülür. Tubuluslar arasında kendileri ile ilişkili kesecik ya da genişlemiş sisternalar biçiminde yapılar izlenir. Yapılarında kimyasal olarak bol lipid, lipoprotein ve enzimleri içerirler. Bazılarına göre belki de endoplazmik retikulumun bir parçasıdır. Endoplazmik retikulumda sentez edilen salgı maddesi Golgi kompleksinde depo edilmektedir. Bu maddeleri son şekline hazırladığı lizozom ve glukoprotein yapımında rol oynadığı da sanılmaktadır.

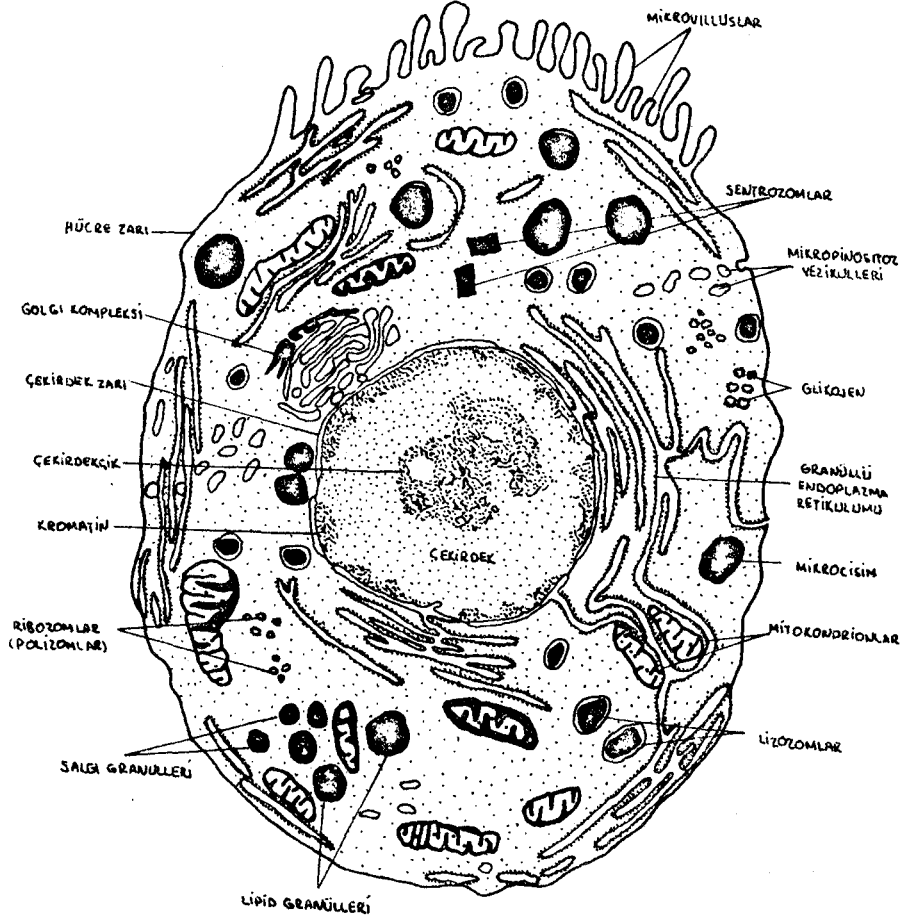
Mikrotubulus ve Mikrofilamentler: Mikrotubuluslar elektron mikroskobu seviyesindeki büyütme ile hücre içinde gözlenen ince, uzun borucuklardır. Çapları, 200–250Å kadarır. Gerçek bir unit zarla çevrelenmezler. Hücre bölünürken oluşan eksen mekiğinin yapısında ışınal bir düzenle yer alırlar. Sinir hücrelerinin aksonları içinde, spermatozoa flajellumunda bulunurlar. Mikrotubulusların temel görevinin hücre iskeleti yani hücrenin belirli kısımlarına yapısal bir sertlik vermek çatasal bir fonksiyonda bulunmak olduğu düşünülmektedir. Bununla beraber mikrotubulusların çevresinde sitoplazmik bir takım akımların gözlenmiş olması bu yapının sitoplazma hareketinde de rol oynadığı ve tubuler yapılarından dolayı madde iletimi yaptığı fikrini doğurmuştur.

Mikrofilamentler: Hücre içindeki ince ve uzun ipliksi protein moleküllerinden oluşan yapılardır. 40–50Å kadar kalınlıkta olurlar. Buldukları hücrelere göre türlü görevlerle yükümlüdürler. Epitel hücrelerindeki tonoflaman denir. Kas hücrelerinin özel flamanları miyoflamanlardır. Ve kasılma–gevşeme olayında rol oynarlar. Sinir hücrelerinin aksonları içinde mikrotubuluslar ile birlikte bulunur ve madde iletiminde yardımcı rol oynarlar (Nörofilaman).

Lizozomlar: Elektron mikroskop tekniği ile hücre incelemeleri sırasında tanımlanmıştır. Etrafı tek bir unit zar ile çevrelenmiş, içi homojen olmıyan yoğun materyelle dolu oluşumlardır. Yapılan araştırmalarda bu organeller içinde asit PH da etkili yaklaşık 36 adet hidrolitik enzim bulunmuştur. Asit fosfataz, asit ribonükleaz, asit dezoksiribonükleaz, beta glukuronidaz, hyaluronidaz, lizozim, asit lipaz, aril sülfataz, kollagenaz, fagositin, permeabilite arttırıcı proteinaz bunların başlıcalarıdır. Lizozomlar eritrositler dışında tüm memeli hücrelerinde görülürler. İçlerindeki hidrolazlar, granüllü endoplazmik retikulumda sentez edilirler. Golgi kopleksine çok yakın yerde granüller biçiminde belirir ve unit zarla çevrelenirler. Bu ilk lizozomlarda (primer lizozom) ön enzimler yer alır. Hücre dışındaki yabancı maddeler fagositoz yolu ile hücre içine alınca unit zarla çevrelenirler. Böylelikle fagozom denilen oluşumlar belirir. Primer lizozomlar fagozomlara yapışıp kaynaşırlar, böylece yabancı maddeleri sindirmekte olan lizozomlara heterolizozom denir. Gerektiğinde hücre kendi içinde bozulmuş ya da yaşlanmış organelleri ve artıkları da aynı şekilde lizozomlar aracılığı ile sindirerek ortadan kaldırır. Bunlar otofajik lizozomlardır. Heterofajik ve otofajik lizozomlara sekonder lizozom da denir. Bazı fiziksel veya kimyasal etkenler lizozomu çevreleyen unit zarın geçirgenliğini arttırabilirler. Bu durumlarda hidrolitik enzimler açığa çıkarlar (Örneğin yüksek doz A vitamini). Bazı kimyasal etkenler unit zarın stabilitesini arttırır. Buna örnek kortizon ve hidrokortizondur. Doğuştan olan betabolizma hastalıklarında bazı lizozomal enzimlerin yokluğu gösterilmiştir.

Lizozomun parçalanması bazı hücreleri mitotik inhibisyondan kurtararak hücre bölünmesini uyandır. Yine lizozomal enzimler radyasyon etkisi ile serbestleşerek kromozomal kırılmaya yol açabilir.

Bu elemanlardan başka hücre içinde sentrioller ve inklüzyonlar bulunur (3, 37) (Şekil II).



ŞEKİL II. NORMAL HÜCRENİN İNCE YAPISI

Hücre Fizyolojisi: Biyolojik organizmaların önemli bir özellikleri sabit bir iç bileşim sağlamak ve bunu devam ettirmektir. Homeostaz diye bilinen bu olayın devamı için enerji harcanmasına ihtiyaç vardır. Hücreye bu enerjiyi sağlayan besin maddeleri karbonhidratlar, yağlar ve proteinlerdir. İnsan vücudunda bunlar hücreye glukoz, yağ asitleri ve aminoasitler şeklinde ulaşır. Bu maddeler hücre içinde O_2 ile kimyasal reaksiyona girerler. Bu reaksiyonlarda çeşitli enzimler rol alır. Glukozun hücre içinde birçok enzimler aracılığı ile parçlanması sonucu piruvik asit meydana gelir. Bu sırada açığa çıkan enerji adenosin trifosfat (ATP) yapımında kullanılır. Bu madde ise çok büyük bir enerjiye sahiptir ve birçok reaksiyonlarda enerji kaynağı olarak rol oynar. Mitokondriler içine giren piruvik asit Krebs siklusundan geçerek CO_2 ve H_2O 'ya parçalanır. Bu sırada açığa çıkan büyük miktardaki enerji, gene

ATP yapımı için kullanılır. Böylece her bir glukoz molekülü başına 36 mal ATP meydana gelir. Mitokondrilerde meydana gelen bu reaksiyon için moleküler oksijene gerek vardır. Bu olay oksidatif fosforilasyon adı ile bilinir. Adanozin trifosfat (ATP) enerji vermek üzere bir fosfat molekülü kaybeder ve adenozin difosfat haline geçer. Bu sırada meydana gelen çok büyük enerji hücrenin görevlerini yapmasında kullanılır. Mesela, bu enerji sayesinde hücre zarı tarafından Na^+ hücre dışına, K^+ ise hücre içine pompalanır. Bu olay da Sodyum-Potasyum pompası adı ile bilinir. Bu mekanizma ATP yapımını önleyen metabolizma zehirleri tarafından duraklatılır. Ayrıca, hücre zarında bu mekanizma ile yakından ilgili bir enzimin varlığı da ortaya çıkarılmış bulunmaktadır. Yukarıda anlatıldığı gibi hücre zarından iletim, kimyasal bileşiklerin sentezi ve mekanik işlerin tümü için gerekli enerji ATP'dan sağlanır (2).

HÜCRE ZEDELLENMESİNİN ULTRASTRÜKTÜREL BULGULARI:

Bütün stresler ve zedeleyici ajanlar hücredeki etkilerini ilk önce moleküler ve biyokimyasal seviyede gösterirler. Bir hücrenin ağır zedelenmesi için şu üç elemanın hedef seçilmesi lazımdır.

- 1- Hücre zarı: Permeabilite bozulması, iyonların ve hücre zarı enzimlerinin değişmesi.
- 2- Mitokondrilerdeki oksidatif respirasyonun bozulması ile hücrenin ATP deposunun ve PH'sının değişmesi.
- 3- Protein sentezinin ve bununla ilgili mekanizmaların bozulması.

Bilhassa endoplazmik retikulum, ribozomlar ve messenger RNA. Çok iyi bilindiği gibi bu hedefler birbirlerine bağlıdır. Birinin aksaması diğerlerine de yansır.

Burada iki esas prensip tekrar vurgulanmalıdır.

- 1- Bütün zararlı ajanlar ilk etkilerini moleküler seviyede gösterirler.
- 2- Hücre, zedelenme görülür hale gelmeden çok önce biyokimyasal ajanla karşılaşmıştır. Bundan sonra zincirleme reaksiyonlar devam eder.

Hücrede görülen değişik tipteki zedelenmelerden sonra hücre organellerindeki dejeneratif bulgular şöyle sıralanabilir: Hücrenin normal şeklinin kaybolması; özel hücre uzantılarının (mikrovilli) kaybı; plazma membranında kırılma, pinositik aktivite artması, sitoplazmanın vezikülasyonu, endoplazmik retikulumda şişme ve kırılma; mitokondrial matriksde şişme, malformasyon, kristalarda intizamsızlık; ribozomların endoplazmik retikulumdan etrafa saçılması, miyelin cisimciklerinin oluşması; lizozom ve otofajik vakuollerin artmasıdır (26).

MATERYEL VE METOD

MATERYEL:

Çalışmamızda, tek katlı hücre kültürü halindeki 9 L sıçan glioması kullanılmıştır.

Sözü geçen 9 L sıçan glioması daha önce Boston, Massachusetts General Hospital'da, Benda ve arkadaşları tarafından tarif edildiği üzere, Wistar ve C.D.Fisher tipi sıçanlara, haftada bir kez olmak üzere 8 aydan uzun bir süre İ.V. olarak 5 mg/kg N-nitroso-methylurea verilerek elde olunmuş primer sıçan beyin tümörüdür (6). Bu tümörün özelliği, o zamana kadar elde olunan deneysel tümörlerin aksine sıçandan sıçana, sıçandan kültüre, kültürden kültüre ve kültürden sıçana kolayca nakledilebilmesi ve bu sırada glial özelliğini koruyabilmesidir. Bu nedenle deneysel çalışmalar için elverişli bulunmuştur.

9 L sıçan glioması Massachusetts General Hospital'dan donmuş olarak laboratuvarımıza getirilmiş olup Wilson ve Barker tarafından daha önce tarif edilmiş olan metoda göre tek kat hücre kültürü halinde devamlı pasajlar yapılarak saklanmaktadır (4, 47). Kültür vasatı olarak % 10 dana serumu, % 1 L-glutamine, % 1 nonessential aminoasitler, % 1 vitaminler, 80.5 mg/ml streptomycine ve 80.5 ü/ml penicilline ihtiva eden Eagle's bazal medium (BME) kullanılmaktadır.

Kültürler 37°'lik etüvde, nemli ve % 5 CO₂ içeren atmosferde saklanmaktadır. Bu şartlar altında tümör hücre sayısının iki katına çıkma zamanı (doubling time) 18-20 saat, verimlilik derecesi (plating efficiency) % 60-80'dir (44).

Deneylerde kullanılan ve beyin tümörleri için en etkin kemoterapötik olan BCNU (1, 3-Bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea) National Cancer Institute'den elde edilmiştir. Toz halinde -79 derecede saklanmaktadır (5, 43, 44).

MEDOT

Deneyden 24 saat önce steril şartlar altında, 9 L sıçan glioması depo (stok) doku kültür şişelerinden 4 tanesi tripsinize edildi (% 0.25 tripsin + 20 mg/100 ml EDTA). Elde edilen tek hücre süspansiyonu her biri 13.5 ml vasat (medium) içeren 75 cm²'lik yassı plastik doku kültürü şişelerine (T-60) ekildi. Yukarıda sözü edilen etüv şartlarında bir gün bekletildi. Ertesi gün steril şartlarda, 100 mg BCNU, 3 ml absölü alkolde eritildikten sonra buna 27 ml Hank's tamponlu tuz solusyonu ilave edilerek depo solusyon hazırlandı. Bu depo solus-

yondan alınan muayyen miktarlar Eagle's basal medium (EBM) ile Tablo I'de gösterildiği şekilde sulandırılarak mililitresinde 0.01 mg, 0.1 mg; 0.2 mg, 0.4 mg, 0.6 mg, ve 0.8 mg BCNU bulunan solusyonlar hazırlandı. Eritilmiş BCNU oda ısısında 15 dakikada dekompoze olduğundan bu işlem 10 dakikadan önce bitirilmek üzere ayarlanarak yapıldı. Etüvden bir gün önce taze pasaj yapılan kültürler alınarak her birine bu solusyonlardan 1.5 ml ilave edildi. Şişelerde mevcut olan 13.5 ml media ile beraber kültür mayii içindeki BCNU miktarlarının sıra ile 1 µg, 10 µg, 20 µg, 40 µg, 60 µg, 80 µg olacağı önceden hesaplanmıştı.

TABLO I

BCNU Konsantrasyonu	Depo solusyon miktarı	Media
0.01 mg/ml	0.5ml	9 ml
0.1 mg/ml	1 ml	16.0 ml
0.2 mg/ml	1 ml	15.5 ml
0.4 mg/ml	1 ml	7.25ml
0.6 mg/ml	2 ml	9 ml
0.8 mg/ml	2 ml	6.25ml

Tablo, istenilen BCNU dozlarını hazırlamak için depo solusyon ve medianın karıştırılacak olan miktarlarını göstermektedir.

BCNU ilave edilmiş kültür şişeleri tekrar etüve konarak bir saat, evvelce sözü edilen şartlarda bekletildi. Etüvden alınan kültürler içindeki media boşaltılıp üzerine steril şartlarda üçer ml tripsin konup çalkalanıp döküldü. Bu işlem iki defa tekrarlandıktan sonra 3 ml tripsin ile etüve konup hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılmaları için 3-5 dakika beklenildi. Tekrar etüvden alınan şişeler içine 10'ar ml media konup çalkalandı. Sonra dik tutulan şişeler içindeki hücreler dibe çöktüğü an pipet ile üflenip çekerek karıştırılıp santrifüj tüpüne aktarıldı. Soğuk ultrasantrifüjde 1000 devirde 10 dakika çevrildi. Tüp dibinde yuvarlak bir disk meydana getiren hücrelerin üzerindeki media dökülüp % 2 glutaraldehide konarak buzdolabında 1 saat tutuldu.

ELEKTRON MİKROSKOP İÇİN DOKU HAZIRLAMA METODU

0.1 Molar Cacodylate buffer ($\text{Na}(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2$ + Sucrose) içindeki % 2 Glutaraldehide de 1 saat + 4°C'de tesbit edilen dokular disseksiyon mikroskopunda yaklaşık 1 mm³'lük küçük parçalara ayrıldı. Bunu takiben üç defa, birer saat 0.1 M Cacodylate buffer + 0.2 M Sucrose ile yıkandı (+ 4°C'de) sonra acetate veronal buffer içindeki % 1 Osmium tetroxide ile 2 saat tekrar tesbite bırakıldı (+ 4°C). Son olarak acetate veronal buffer içindeki % 0.5 uranyl acetate ile 2 saat oda ısısında yıkandı ve değişik konsantrasyonlardaki (% 30-50-70-95) alkollerden ve propilene oxide den geçirilerek dehidrate edildi. Plastik gömme maddesi olarak Araldite 502 + DDSA + DMP-30 kullanıldı. Plastik bloklar içine gömülen dokular Porter Blum MT-2 ultra mikrotomda elmas bıçak yardımı ile 60-150 A⁰ kalınlığında kesildi ve bakır ızgaralar üzerine alındı. Reynold's lead citrate (36) boyası ile boyandıktan sonra Hitachi elektron mikroskopunda incelendi.

Kesitlerin elektron mikroskobu ile incelenmesi sırasında her doz için değişik sayıda toplam 900'ü aşkın hücrenin resmi çekilerek basıldı. Büyütülmüş olan bu fotoğraflar tek tek incelenerek mevcut değişikliği göstermek için puanlandırma yapılmasına karar verildi. Bu amaç ile, geri dönülerek elektron mikroskobunda her doz için 25 hücre sayıldı ve tablo II (A-G) de görüldüğü şekilde puanlandırıldı. Kontrol olarak ilaçla karşılaştırılmamış 9 L kültürü kullanıldı. Hücre organellerinde görülen değişiklikleri puanlandırmak ve verileri somut hale getirmek için şu esaslar kullanıldı:

1- Hücre zarı uzantılarının kontrol hücrelerindeki görünümü normal kabul edildi, Tedavi dozlarında bu uzantılarda kısalma ve kalınlaşma gösteren hücreler gruplandırıldı.

2- Nükleus kontrol hücrelerde ortada idi. İlaç ile muamele edilmiş kültürlerde eksantrik yerleşim gösterenler patolojik kabul edildi.

3- Mitokondrilerin görünümü: Kontrol'la aynı olanlar kristalarında şişme gösterenler ve tam şekil bozukluğu (dejenerasyon) içerenler olarak gruplandı.

4- Endoplazmik retikulum (granüllü ve düz): Normal, bir iki baloncuk veya sisterna yapıyorsa bir ve iki pozitif şişme, çok sayıda baloncuk yapıyor veya dantel gibi görünüyorsa + + + ve + + + + şişme olarak puanlandırıldı.

5- Golgi aygıtı: Normal ve sayıca artma ve şişme gösterenler olarak gruplandı.

6- Mikrofilamentler: Negatif, kontrol hücrelerde görüldüğü kadarı veya biraz fazlası (+, + +); çok artmış miktarı ise (+ + +, + + + +) olarak değerlendirildi.

7- Lizozomlar: Lizozom görünmeyen hücreler, 1-4 tane, 5-8 tane ve 9'un üzerinde lizozom içeren hücreler gruplara ayrıldı.

8- Myelin cisimcikleri: Görülmeyen, 1-2 tane 3 ve üzerinde myelin cisimciği içeren hücreler gruplara ayrıldı.

Bu çalışmaya, kesitleri nükleusun ortasından geçen hücreler alındı. Yukarıda belirtilen puanlandırmadan sonra her hücre organeli için ayrı tablo yapıldı. Aynı değişiklikleri gösteren hücreler sayılıp yüzdeleri alındı. Doza bağlı olarak meydana gelen bu değişikliklerin istatistiksel değerlendirilmesi için bu tablolara X^2 (ki kare) testi uygulandı.

BULGULAR

Daha önce Benda (6) tarafından ultramikroskopik yapısı tarif edilen 9 L sıçan gliomasının çok sayıdaki pasajlardan sonraki durumunu KONTROL grubunda inceledik (Tablo II-A).

Hücreler tripsinizasyon nedeni ile yuvarlak veya oval şekilli idi. Hücre zarı çok sayıda ince uzun uzantılar içeriyordu. Nükleus ortada ve oldukça büyüktü. Bazı hücreler çift nükleus ihtiva ediyordu. Dev hücre şekillerine nadiren rastlandı. Nükleus zarı çok girintili çıkıntılı olup yer yer derin katlanmalar gösteriyordu. Kromatin ağı gevşek olup daha çok periferde yerleşmişti. Nükleus bir veya iki nükleolus içeriyordu. Sitoplazmada bir kısmı endoplazmik retikuluma tutunmuş, bir kısmı serbest olarak bulunan çok sayıda ribozom vardı (Resim I).

Hücrelerin % 68'i (17/25) az sayıda da olsa mikrofilament içeriyordu (Tablo VIII). Mitokondri sayısı bol olup % 24'ü (6/25) kristallarında şişme ve intizamsızlık gösteriyordu (Tablo V). Her hücrede golgi aygıtı bulunduğu saptandı. Hücrelerin % 40'ında (10/25) endoplazmik retikulum yer yer şişme gösteriyor ve bir iki baloncuk yapıyordu (Tablo VII). Tümör hücrelerinin % 56'sı (14/25) 1-2 tane myelin cisimciği, (Tablo IX, % 12'si (3/25) 1-4 tane lizozom içermekte idi (Tablo X).

BCNU İLE TEDAVİDEN SONRAKİ BULGULAR

Hücre zarı: İlaçtan en erken etkilenen hücrenin zarı oldu. 1 mikrogram/ml BCNU dozu ile hücrelerin % 4'ünde uzantıların boyu kısaldı ve kalınlaştı. Doz artımı ile bu oran süratle yükseldi ve 10 mikrogram/ml BCNU ile % 76'ya çıktı. 40-60-80 mikrogram/ml'lik dozlarda ise hücrelerin hepsinde bu patoloji bulundu (% 100) (Tablo III) (Resim III ve V).

Nükleus: İlacın küçük dozlarında nükleusun yapısında belirli bir değişiklik gözlenmedi. Sadece yüksek dozlarda (60-80 μ g/ml BCNU) nükleusların büyük kısmının kenara itildiği görüldü (% 68, % 80)(Tablo IV)(Resim V).

Mitokondriler: Tümör hücresinde zaten % 24 oranında kristallarında şişme, % 4 oranında dejenerasyon gösteren mitokondriler ancak 80 μ g/ml BCNU dozunda farklı görünüm verdiler. Bu doz ile hücrelerin % 88'inde mitokondrial dejenerasyon olmuştu. Mitokondriler şiş, kristallar intizamsız ve şişti (Tablo V)(Resim VI).

Golgi aygıtı: İlaç dozu 40 µg/ml'ye çıkıncaya kadar değişiklik görülmedi. Bu dozdan sonra golgi aygıtı sayıca artmaya ve şişme göstermeye başladı (40-60-80 µg/ml BCNU ile hücrelerin % 24, % 72, % 96)sında golgi aygıtında şişme ve sayıca artma saptandı (Tablo VI).

Endoplazmik Retikulum (granülsüz): 40 µg/ml BCNU dozuna kadar endoplazmik retikulumda 1-2 baloncuk şeklinde yerel şişme görülüyordu. Bu dozdan sonra hücrelerin çoğunda bu bulgu şiddetlendi. 40-60-80 µg/ml'lik BCNU dozlarında sıra ile % 20, % 72, % 96 gibi bir yüzdeye ulaştı (Tablo VII)(Resim IV ve V).

Mikrofilamentler: Glioblastomalarda zaten bulunması gereken mikrofilamentler kontrol hücrelerin % 68'inde görülebiliyordu. İlaç verildikten sonra 40 mikrogram/ml'lik dozdan itibaren sayıca çok artmış bulundu. Hücrelerde yoğun bulunduğu zaman + + + ve + + + + olarak işaretlendi. Bu miktarda mikrofilament içeren hücre yüzdesi sıra ile 40, 60 ve 80 µg/ml BCNU dozlarında % 4, % 64, % 60 idi (Tablo VIII)(Resim VI).

Myelin cisimcikleri: 80 µg/ml BCNU dozuna çıkılincaya kadar hücrelerdeki sayıları yavaş yavaş artan myelin cisimcikleri bu dozda daha da artma gösterdi (hücrelerin % 56'sında 3'ün üstünde myelin cisimciği saptandı) (Tablo IX), (Resim VI).

Lizozomlar: Tablo XI'de kolaylıkla görüldüğü üzere 40 µg/ml'lik BCNU dozuna kadar hücrelerde en çok 1-4 tane lizozom görülüyordu. Bu dozdan sonra sayıca artmaya başladı. 60 µg/ml'de hücrelerin % 4'ünde, 80 µg/ml'de ise % 68'inde 9'un üzerinde lizozom sayıldı (Tablo X).

Sonuçta ilk belirgin cevap alınan minimal dozun 10 µg/ml BCNU olduğu görüldü. Bu dozda tümör hücrelerinin sadece zarı etkilenmişti (% 76)(Tablo III)(Grafik 1, 3'lerdeki mitokondri (% 24) ve myelin cisimciği (% 36) sutunları kontrol hücrelerdekinden farklı olmadığı için dikkate alınmamıştır).

Bütün hücre organellerinin hücrelerin % 56 ila % 100'ünde etkilendiği doz 80 mikrogram/ml BCNU'dur (Grafik 7). Bu dozda ilaç ile karşılaşan tümör hücreleri, hücre ölümünün bütün morfolojik bulgularını göstermişlerdir.

Not: Hücre organellerinin, değişen BCNU dozlarına cevabı, kontrol grubu ile beraber Grafik 1-7'de gösterilmiştir.

TABLO II-A

9 L Sıçan Gliyomasi						Kontrol Grubu			
Hücre No.	Hücre zarı	Nukleus	Myelin cisimcikleri	Lizozom	Endoplazmik Retikulum	Golgi Ağızı	Mitokondriler	Ribozom	Filament
1	N	N	2	(-)	+ şiş	N	N	N	+
2	N	N	(-)	(-)	+ şiş	N	N	N	+
3	N	N	1	(-)	+ şiş	N	N	N	(-)
4	N	N	1	(-)	N	N	kris.şiş	N	+
5	N	N	1	(-)	N	N	N	N	+
6	N	N	2	(-)	N	N	N	N	+
7	N	N	2	(-)	N	N	N	N	+
8	N	N	3	(-)	+ şiş	N	N	N	+
9	N	N	4	(-)	N	N	kris.şiş	N	(-)
10	N	N	1	(-)	N	N	N	N	(-)
11	N	N	4	(-)	N	N	N	N	(-)
12	N	N	1	(-)	N	N	N	N	(-)
13	N	N	6	(-)	+ şiş	N	kris.şiş	N	(-)
14	N	N	2	(-)	N	N	N	N	(-)
15	N	N	1	(-)	+ şiş	N	kris.şiş	N	+
16	N	N	2	(-)	+ şiş	N	N	N	+
17	N	N	1	(-)	N	N	N	N	+
18	N	N	(-)	(-)	+ şiş	N	kris.şiş	N	+
19	N	N	2	(-)	N	N	N	N	+
20	N	N	(-)	(-)	N	N	kris.şiş	N	(-)
21	N	N	2	(-)	N	N	kris.şiş	N	+
22	N	N	(-)	(-)	+ şiş	N	N	N	+
23	N	N	(-)	2	N	N	N	N	+
24	N	N	(-)	1	+ şiş	N	N	N	+
25	N	N	1	1	N	N	N	N	+

Kısaltmalar: N : Normal

(-) : yok

(+)-(++++)şiş: Bir ila dört pozitif şişme

Kris.şiş : Kristalarda şişme

dejan : Dejenerasyon

Uzantılar şiş : Hücre uzantılarında şişme

TABLO II-B

9 L sıçan gliyoması			1 µg/ml		BCNU uygulanan grup				
Hücre No.	Hücre zarı	Nükleus	Myelin cisimcikleri	Lizozom	Endoplazmik Retikulum	Golgi Avcığı	Mitokondriler	Ribozom	Filament
1	N	N	(-)	(-)	+ şiş	N	N	N	+
2	N	N	4	(-)	+ şiş	N	N	N	+
3	N	N	(-)	2	+ şiş	N	N	N	+
4	N	N	(-)	(-)	+ şiş	N	N	N	+
5	N	N	4	(-)	+ şiş	N	N	N	+
6	N	N	2	(-)	N	N	N	N	+
7	N	N	1	2	N	N	kris.şiş	N	(-)
8	N	N	6	1	N	N	Dejen.	N	(-)
9	N	N	5	1	N	N	Dejen.	N	+
10	N	N	5	1	+ şiş	N	kris.şiş	N	+
11	N	N	(-)	1	N	N	N	N	(-)
12	N	N	(-)	2	+ şiş	Şişme	kris.şiş	N	+
13	N	N	2	(-)	N	N	N	N	+
14	N	N	(-)	2	N	N	N	N	(-)
15	N	N	(-)	(-)	N	N	N	N	(-)
16	N	N	2	(-)	+ şiş	N	N	N	+
17	N	N	1	(-)	+ şiş	N	N	N	(-)
18	N	N	2	(-)	+ şiş	N	kris.şiş	N	+
19	N	N	2	(-)	N	N	N	N	(-)
20	N	N	(-)	1	N	Şişme	N	N	(-)
21	N	N	(-)	1	+ şiş	N	N	N	+
22	N	N	2	1	N	N	N	N	+
23	N	N	1	(-2)	N	N	N	N	+
24	şiş	N	1	2	N	N	kris.şiş	N	+
25	N	N	4	1	+ şiş	N	N	N	(-)

TABLO II-C

9 L. Sıçan Glioması		10 µg/ml BCNU uygulanan grup							
Hücre No.	Hücre zarı	Nükleus	Myelin Cisimcik.	Lizozom	Endoplazmik Retikulum	Golgi Ağı	Mitokondriler	Ribozom	Mikro filament
1	Uzantılar şiş	N	2	1	N	N	N	N	(+)
2	Uzantılar şiş	N	(-)	(-)	N	N	şişme	N	(+)
3	N	N	1	4	N	N	şişme	N	(+)
4	N	N	3	3	(+) şişme	N	şişme	N	(+)
5	Uzantılar şiş	N	3	(-)	N	N	dejenere	N	(+)
6	Uzantılar şiş	N	3	1	N	N	dejenere	N	(+)
7	Uzantılar şiş	N	1	1	N	N	şişme	N	(-)
8	Uzantılar şiş	N	1	1	N	N	N	N	(-)
9	N	N	(-)	(-)	(+) şişme	N	N	N	(-)
10	N	N	1	1	N	N	N	N	(-)
11	Uzantılar şiş	N	1	(-)	N	N	N	N	(-)
12	Uzantılar şiş	N	3	(-)	(++++)şiş	N	şişme	N	(+)
13	Uzantılar şiş	N	3	1	(-) şişme	N	N	N	(+)
14	Uzantılar şiş	N	2	1	(+) şişme	N	N	N	(+)
15	Uzantılar şiş	N	(-)	(-)	N	N	N	N	(+)
16	Uzantılar şiş	N	1	(-)	N	N	N	N	(+)
17	N	N	1	(-)	N	N	N	N	(+)
18	N	N	(-)	(-)	N	N	N	N	(+)
19	Uzantılar şiş	N	1	(-)	N	N	N	N	(+)
20	Uzantılar şiş	N	3	(-)	N	N	N	N	(+)
21	Uzantılar şiş	N	2	(-)	+ şişme	N	N	N	(+)
22	Uzantılar şiş	N	6	1	N	N	N	N	(+)
23	Uzantılar şiş	N	1	2	N	N	şişme	N	(+)
24	Uzantılar şiş	N	4	(-)	++ şişme	N	şişme	N	(++)
25	Uzantılar şiş	N	3	(-)	+ şişme	N	şişme	N	(+)

TABLO II-D

9 L Sıçan Glioması		20 µg/ml BCNU uygulanan grup							
Hücre No.	Hücre zarı	Nukleus	Myelin Cisimcik.	Lizozom	Endoplazmik Retikulum	Golgi Ayg.ti	Mitokondriler	Ribozom	Mikro filament
1	Uzantılar şiş	N	5	1	(+) şişme	N	N	N	(++)
2	Uzantılar şiş	N	4	2	(+) şişme	N	şişme	N	(+)
3	Uzantılar şiş	N	1	2	N	N	N	N	(++)
4	Uzantılar şiş	N	4	(-)	N	N	N	N	(-)
5	Uzantılar şiş	N	1	(-)	N	N	şişme	N	(+)
6	Uzantılar şiş	N	4	2	(+) şişme	N	N	N	(+)
7	Uzantılar şiş	N	5	1	N	N	dejenere	N	(++)
8	Uzantılar şiş	N	4	2	(+) şişme	N	dejenere	N	(+)
9	Uzantılar şiş	N	2	1	N	N	N	N	(+)
10	Uzantılar şiş	N	(-)	(-)	(+) şişme	N	N	N	(+)
11	Uzantılar şiş	N	1	1	(+) şişme	N	N	N	(++)
12	Uzantılar şiş	N	2	(-)	(+) şişme	N	N	N	(++)
13	Uzantılar şiş	N	2	(-)	N	N	N	N	(+)
14	Uzantılar şiş	N	3	2	N	N	N	N	(++)
15	Uzantılar şiş	N	2	(-)	N	N	N	N	(+)
16	Uzantılar şiş	N	4	(-)	N	N	dejenere	N	(+)
17	Uzantılar şiş	N	2	(-)	(+) şişme	N	N	N	(+)
18	Uzantılar şiş	N	2	(-)	N	N	N	N	(+)
19	Uzantılar şiş	N	1	(-)	(+) şişme	N	N	N	(+)
20	Uzantılar şiş	N	1	(-)	N	N	N	N	(+)
21	Uzantılar şiş	N	(-)	(-)	N	N	N	N	(+)
22	Uzantılar şiş	N	3	(-)	N	N	dejenere	N	(+)
23	Uzantılar şiş	N	4	(-)	(+) şişme	N	N	N	(+)
24	Uzantılar şiş	N	1	(-)	N	N	N	N	(++)
25	Uzantılar şiş	N	1	(-)	N	N	N	N	(++)

TABLO II - E

9 L Siçan Glioması		40 µg/mi BCNU Uygulanan Grup							
Hücre No	Hücre Zarı	Nukleus	Myofin Cisimcik	Lizozam	Endoplazmik Retikulum	Golgi Aygıtı	Mitokondriler	Ribozam	Mikrofilament
1	Uzantılar Şiş	N	2	(-)	N	N	N	N	(+)
2	Uzantılar Şiş	N	1	1	(++) şişme	N	N	N	(-)
3	Uzantılar Şiş	N	1	(-)	(++) şişme	Şiş	N	N	(++)
4	Uzantılar Şiş	N	1	(-)	N	Şiş	N	N	(++)
5	Uzantılar Şiş	N	1	3	(++++) Şişme	N	N	N	(+)
6	Uzantılar Şiş	N	10	(-)	N	N	N	N	(+)
7	Uzantılar Şiş	N	(-)	(-)	(+) şişme	Şiş	N	N	(+)
8	Uzantılar Şiş	N	2	(-)	(+++) Şişme	N	Şişme	N	(++)
9	Uzantılar Şiş	N	3	(-)	(++)	N	N	N	(++)
10	Uzantılar Şiş	N	2	2	(++++) Şişme	N	N	N	(+++)
11	Uzantılar Şiş	N	3	2	(+++)	N	Şişme	N	(++)
12	Uzantılar Şiş	N	3	3	N	N	Şişme	N	(++)
13	Uzantılar Şiş	N	3	(-)	N	N	Şişme	N	(++)
14	Uzantılar Şiş	N	5	3	(+) şişme	N	Dejenere	N	(+)
15	Uzantılar Şiş	N	(-)	3	(++) şişme	N	Şişme	N	(++)
16	Uzantılar Şiş	N	5	(-)	(++) şişme	Şiş	Dejenere	N	(+)
17	Uzantılar Şiş	N	1	(-)	N	N	N	N	(++)
18	Uzantılar Şiş	N	4	(-)	(+++) Şişme	N	Dejenere	N	(++)
19	Uzantılar Şiş	N	6	2	(++) şişme	Şiş	N	N	(++)
20	Uzantılar Şiş	N	3	(-)	(+) şişme	Şiş	Şişme	N	(++)
21	Uzantılar Şiş	N	2	1	N	N	N	N	(+)
22	Uzantılar Şiş	N	6	3	(++) şişme	N	şişme	N	(+)
23	Uzantılar Şiş	N	1	6	N	N	Şişme	N	(++)
24	Uzantılar Şiş	N	4	(-)	(+) şişme	N	Şişme	N	(++)
25	Uzantılar Şiş	N	1	3	(+) şişme	N	N	N	(+)

TABLO II-F

9 L. Sıçan Glioması		60 µg/mi BCNU uygulanan grup							
Hücre No.	Hücre zarı	Nukleus	Myelin Cisimcik.	Lizozom	Endoplazmik Retikulum	Golgi Aygıt.	Mitokondriler	Ribozom	Mikro filament
1	Uzantılar şiş	exantrik	1	4	(+++) <i>şiş</i>	N	N	N	(+++)
2	Uzantılar şiş	exantrik	(-)	5	(+++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	N	N	(+++)
3	Uzantılar şiş	exantrik	(-)	1	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(++++)
4	Uzantılar şiş	exantrik	1	6	(+++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	N	N	(++)
5	Uzantılar şiş	N	1	(-)	(+++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(++)
6	Uzantılar şiş	N	1	2	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(+++)
7	Uzantılar şiş	exantrik	1	2	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(+++)
8	Uzantılar şiş	exantrik	(-)	2	(+++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	N	N	(+++)
9	Uzantılar şiş	N	(-)	(-)	(++) <i>şiş</i>	N	N	N	(+++)
10	Uzantılar şiş	N	1	1	(++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(++)
11	Uzantılar şiş	exantrik	1	4	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(++++)
12	Uzantılar şiş	exantrik	(-)	2	(+++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(+++)
13	Uzantılar şiş	N	3	(-)	(+) <i>şiş</i>	N	N	N	(+)
14	Uzantılar şiş	exantrik	5	1	(+) <i>şiş</i>	N	dejenere	N	(++)
15	Uzantılar şiş	exantrik	3	4	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	N	N	(++++)
16	Uzantılar şiş	exantrik	(-)	7	N	N	N	N	(++)
17	Uzantılar şiş	exantrik	2	4	(+) <i>şiş</i>	N	N	N	(+++)
18	Uzantılar şiş	exantrik	1	4	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	N	N	(++++)
19	Uzantılar şiş	exantrik	1	6	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	N	N	(+++)
20	Uzantılar şiş	N	4	8	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(+++)
21	Uzantılar şiş	exantrik	2	2	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	N	N	(+++)
22	Uzantılar şiş	N	3	(-)	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	dejenere	N	(++)
23	Uzantılar şiş	N	1	9	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(++)
24	Uzantılar şiş	exantrik	4	5	(++++) <i>şiş</i>	<i>şiş</i>	<i>şişme</i>	N	(++++)
25	Uzantılar şiş	N	(-)	1	(+) <i>şiş</i>	N	N	N	(++)

TABLO II-G

9 L Sıçan Glioması		80 µg/mi BCNU uygulanan grup							
Hücre No.	Hücre zarı	Nükleus	Myelin Cisimcik.	Lizozom	Endoplazmik Retikulum	Golgi Aygıtı	Mitokondriler	Ribozom	Mikro filament
1	Uzantılar şiş	exantrik	1	9	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(+++)
2	Uzantılar şiş	N	2	8	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(++)
3	Uzantılar şiş	exantrik	1	20	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(++)
4	Uzantılar şiş	exantrik	1	20	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(+++)
5	Uzantılar şiş	exantrik	3	15	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(++)
6	Uzantılar şiş	N	3	(-)	N	N	dejenere	N	(+)
7	Uzantılar şiş	exantrik	3	5	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(+++)
8	Uzantılar şiş	N	3	15	(++++)şiş	şiş ve artmış	şişme	N	(+++)
9	Uzantılar şiş	N	3	9	(++++)şiş	şiş ve artmış	şiş ve büyük	N	(+++)
10	Uzantılar şiş	exantrik	3	20	(++++)şiş	şiş ve artmış	şiş ve büyük	N	(+++)
11	Uzantılar şiş	exantrik	4	15	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(++)
12	Uzantılar şiş	exantrik	4	4	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(++)
13	Uzantılar şiş	exantrik	2	16	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(++)
14	Uzantılar şiş	exantrik	2	11	(++++)şiş	şiş ve artmış	şişme	N	(++)
15	Uzantılar şiş	exantrik	2	15	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(+++)
16	Uzantılar şiş	N	3	25	(++++)şiş	şiş ve artmış	şişme	N	(++)
17	Uzantılar şiş	exantrik	3	15	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(++)
18	Uzantılar şiş	exantrik	7	11	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(+++)
19	Uzantılar şiş	exantrik	2	22	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(+++)
20	Uzantılar şiş	exantrik	2	14	(++++)şiş	şiş ve artmış	şişme	N	(++++)
21	Uzantılar şiş	exantrik	6	30	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(+++)
22	Uzantılar şiş	exantrik	2	6	(++++)şiş	şiş ve artmış	şişme	N	(+++)
23	Uzantılar şiş	exantrik	2	6	(++++)şiş	şiş ve artmış	dejenere	N	(+++)
24	Uzantılar şiş	exantrik	4	6	(++++)şiş	şiş ve artmış	şişme	N	(+++)
25	Uzantılar şiş	exantrik	3	7	(++++)şiş	şiş ve artmış	şişme	N	(++)

TABLO III
HÜCRE ZARININ GÖRÜNÜŞÜNDEKİ DEĞİŞİKLİK

Gruplar	Normal	Hücre uzantılarının yerel veya tam şişmesi	Toplam
KONTROL	25 % 100	0 -	25 % 100
1 µg/ml BCNU	24 % 96	1 % 4	25 % 100
10 µg/ml BCNU	6 % 24	19 % 76	25 % 100
20 µg/ml BCNU	0 -	25 % 100	25 % 100
40 µg/ml BCNU	0 -	25 % 100	25 % 100
60 µg/ml BCNU	0 -	25 % 100	25 % 100
80 µg/ml BCNU	0 -	25 % 100	25 % 100
TOPLAM	55 % 31.4	120 % 68.6	175 % 100

$X^2 : 148.951$ Sd: 6 P < 0.0005

TABLO IV
NUKLEUSUN YERLEŞİMİ

Gruplar	Normal (Ortada)	Eksantrik	Toplam
KONTROL	25 % 100	0 -	25 % 100
1 µg/ml BCNU	25 % 100	0 -	25 % 100
10 µg/ml BCNU	25 % 100	0 -	25 % 100
20 µg/ml BCNU	25 % 100	0 -	25 % 100
40 µg/ml BCNU	25 % 100	0 -	25 % 100
60 µg/ml BCNU	8 % 32	17 % 68	25 % 100
80 µg/ml BCNU	5 % 20	20 % 80	25 % 100
TOPLAM	138 % 78.9	37 % 21.2	175 % 100

$X^2 : 118.148$ Sd: 6 P < 0.0005

TABLO V
MITOKONDRİLERDE GÖRÜLEN DEĞİŞİKLER

Gruplar	Normal	Kristalarda şişme	Dejenerasyon	Toplam
KONTROL	18 % 72	6 % 24	1 % 4	25 100
1 µg/ml BCNU	18 % 72	3 % 12	4 % 16	25 % 100
10 µg/ml BCNU	15 % 60	6 % 24	4 % 16	25 % 100
20 µg/ml BCNU	19 % 76	2 % 8	4 % 16	25 % 100
40 µg/ml BCNU	13 % 52	9 % 36	3 % 12	25 % 100
60 µg/ml BCNU	13 % 52	10 % 40	2 % 8	25 % 100
80 µg/ml BCNU	0 —	3 % 12	22 % 88	25 % 100
TOPLAM	96 % 54.8	39 % 22.4	40 % 22.8	175 % 100

X^2 : 83.63

SD: 12

P < 0.0005

TABLO VI
GOLGI AYGITINDA GÖRÜLEN DEĞİŞİKLİK

Gruplar	Normal	Şişme ve sayıca artma	Toplam
KONTROL	25 % 100	0 —	25 % 100
1 µg/ml BCNU	23 % 92	2 % 8	25 % 100
10 µg/ml BCNU	25 % 100	0 —	25 % 100
20 µg/ml BCNU	25 % 100	0 —	25 % 100
40 µg/ml BCNU	19 % 76	6 % 24	25 % 100
60 µg/ml BCNU	7 % 28	18 % 72	25 % 100
80 µg/ml BCNU	1 % 4	24 % 96	25 % 100
TOPLAM	125 % 71.5	50 % 28.5	175 % 100

X^2 : 114.657

Sd: 6

P < 0.0005

TABLO VII
ENDOPLAZMİK RETİKULUMUN GÖRÜNÜŞÜ

Gruplar	Normal	Şişme + ++	Şişme +++ +++++	Toplam
Kontrol	15 % 60	10 % 40	0 -	25 % 100
1 µ gm/ml BCNU	13 % 52	12 % 48	0 -	25 % 100
10 µ gm/ml BCNU	17 % 68	7 % 28	1 % 4	25 % 100
20 µ gm/ml BCNU	15 % 60	10 % 40	0 -	25 % 100
40 µ gm/ml BCNU	8 % 32	12 % 48	5 % 20	25 % 100
60 µ gm/ml BCNU	1 % 4	6 % 24	18 % 72	25 % 100
80 µ gm/ml BCNU	1 % 4	0 -	24 % 96	25 % 100
TOPLAM	70 % 40	57 % 32.5	48 % 27.5	175 % 100

$X^2 : 127.362$ Sd: 12 P < 0.0005

TABLO VIII
HÜCRELERDEKİ MİKROFİLAMENT MİKTARI

Gruplar	Negatif	+ ++	+++ +++++	Toplam
Kontrol	8 % 32	17 % 68	0 -	25 % 100
1 µ g/ml BCNU	9 % 36	16 % 64	0 -	25 % 100
10 µ g/ml BCNU	5 % 20	20 % 80	0 -	25 % 100
20 µ g/ml BCNU	1 % 4	24 % 96	0 -	25 % 100
40 µ g/ml BCNU	1 % 4	23 % 92	1 % 4	25 % 100
60 µ g/ml BCNU	0 -	9 % 36	16 % 64	25 % 100
80 µ g/ml BCNU	0 -	10 % 40	15 % 60	25 % 100
TOPLAM	24 % 13.7	119 % 68	32 % 18.3	175 % 100

$X^2 : 111.606$ Sd: 12 P < 0.0005

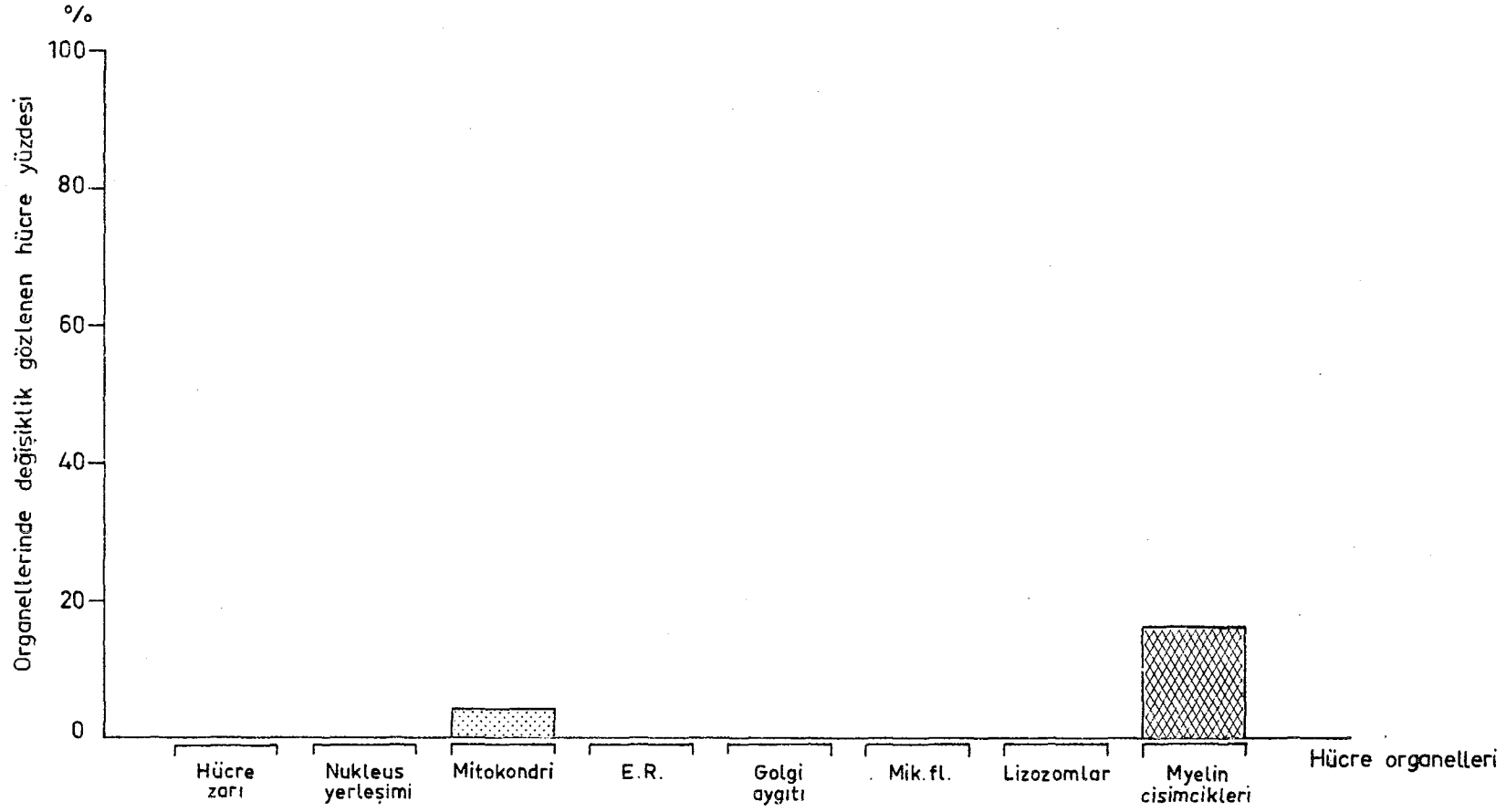
TABLO IX
HÜCRELERDEKİ MYELİN CİSİMCİKLERİN SAYISI

Gruplar	Yok	1-2 tane	3 ve üzeri	Toplam
Kontrol	7 %28	14 % 56	4 % 16	25 % 100
1 µ g/ml BCNU	9 % 36	10 % 40	6 % 24	25 % 100
10 µ g/ml BCNU	4 % 16	12 % 48	9 % 36	25 % 100
20 µ g/ml BCNU	2 % 8	13 % 52	10 % 40	25 % 100
40 µ g/ml BCNU	2 % 8	11 % 44	12 % 48	25 % 100
60 µ g/ml BCNU	7 %28	12 % 48	6 % 24	25 % 100
80 µ g/ml BCNU	0 -	11 % 44	14 % 56	25 % 100
TOPLAM	31 % 17.7	83 % 47.4	61 % 349	175 % 100
X ² : 24.749		Sd : 12	0.025 < P < 0.01	

TABLO X
HÜCRELERDEKİ LİZOZOM SAYISI

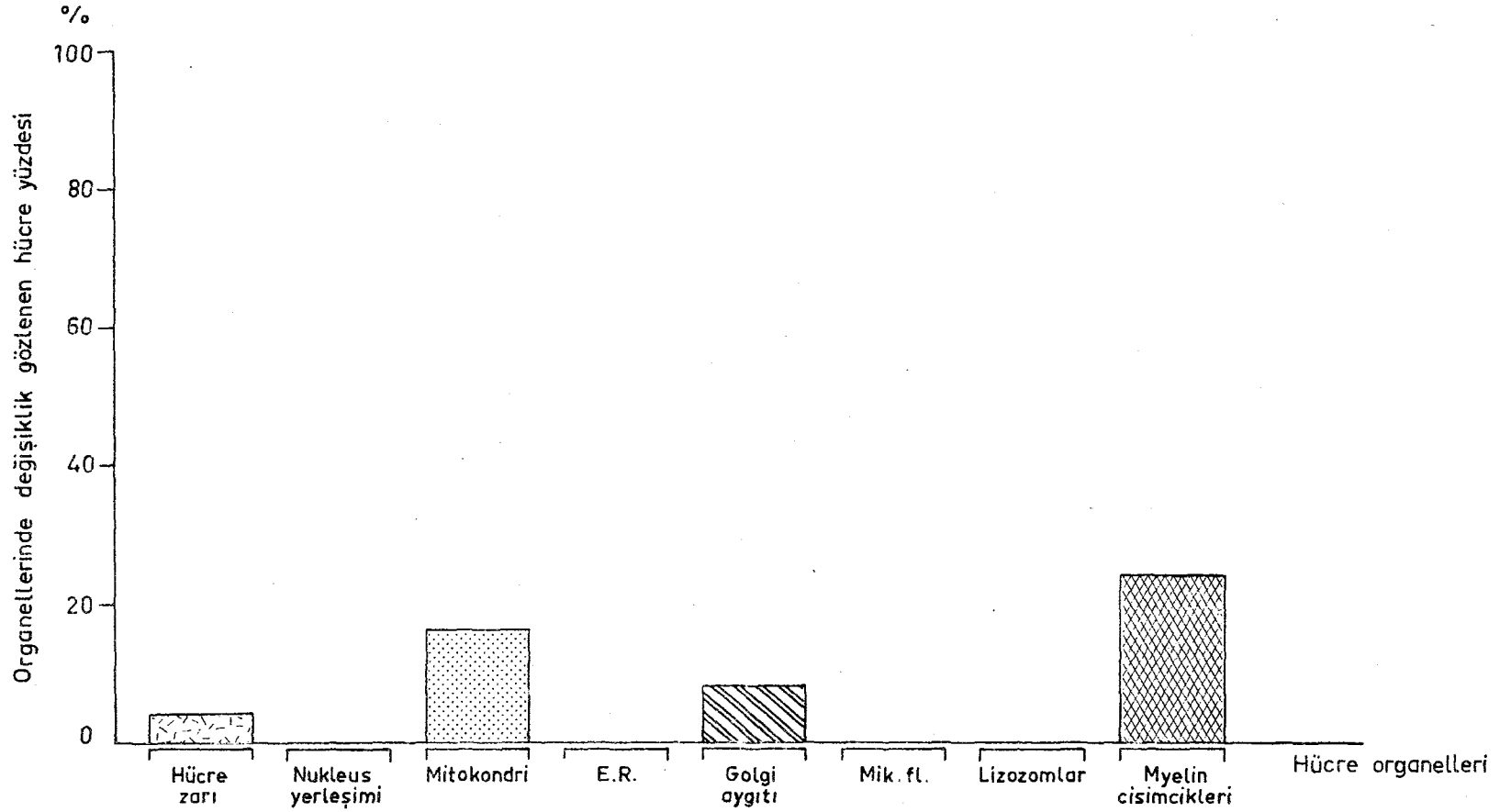
Gruplar	Yok	1-4 Tane	5-8 Tane	9 ve Üzeri	Toplam
Kontrol	22 % 88	3 % 12	0 -	0 -	25 % 100
1 µ g/ml BCNU	12 %48	13 % 52	0 -	0 -	25 % 100
10 µ g/ml BCNU	14 % 56	11 % 44	0 -	0 -	25 % 100
20 µ g/ml BCNU	16 % 64	9 % 36	0 -	0 -	25 % 100
40 µ g/ml BCNU	13 % 52	11 % 44	1 % 4	0 -	25 % 100
60 µ g/ml BCNU	4 % 16	14 % 56	6 % 24	1 % 4	25 % 100
80 µ g/ml BCNU	1 % 4	1 % 4	6 % 24	17 % 68	25 % 100
TOPLAM	82 % 46.8	62 % 35.4	12 % 6.8	18 % 11	175 % 100
X ² : 154.907			Sd : 18	P < 0.0005	

GRAFİK 1: 9 L GLİOMA DOKU KÜLTÜRÜ KONTROL GRUBU ORGANELLERİNDE DEĞİŞİKLİK GÖZLENEN HÜCRELER (% olarak)



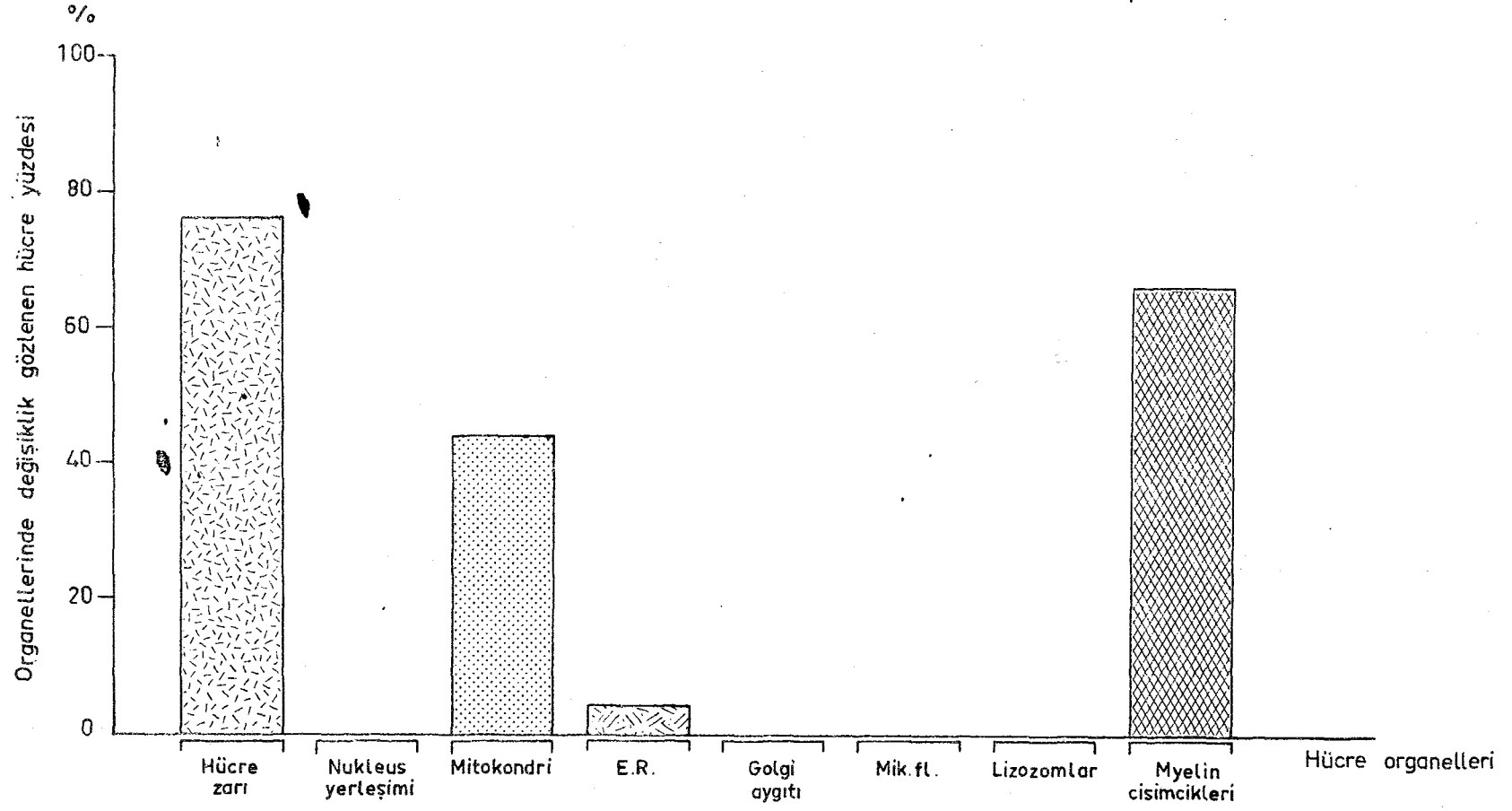
E.R : Endoplazmik Retikulum
Mik.fl ; Mikrofilamentler

GRAFİK 2: 9 L GLİOMA DOKU KÜLTÜRÜNDE 1 µg/ml BCNU DOZU İLE
ORGANELLERİNDE DEĞİŞİKLİK GÖZLENEN HÜCRELER
(% olarak)



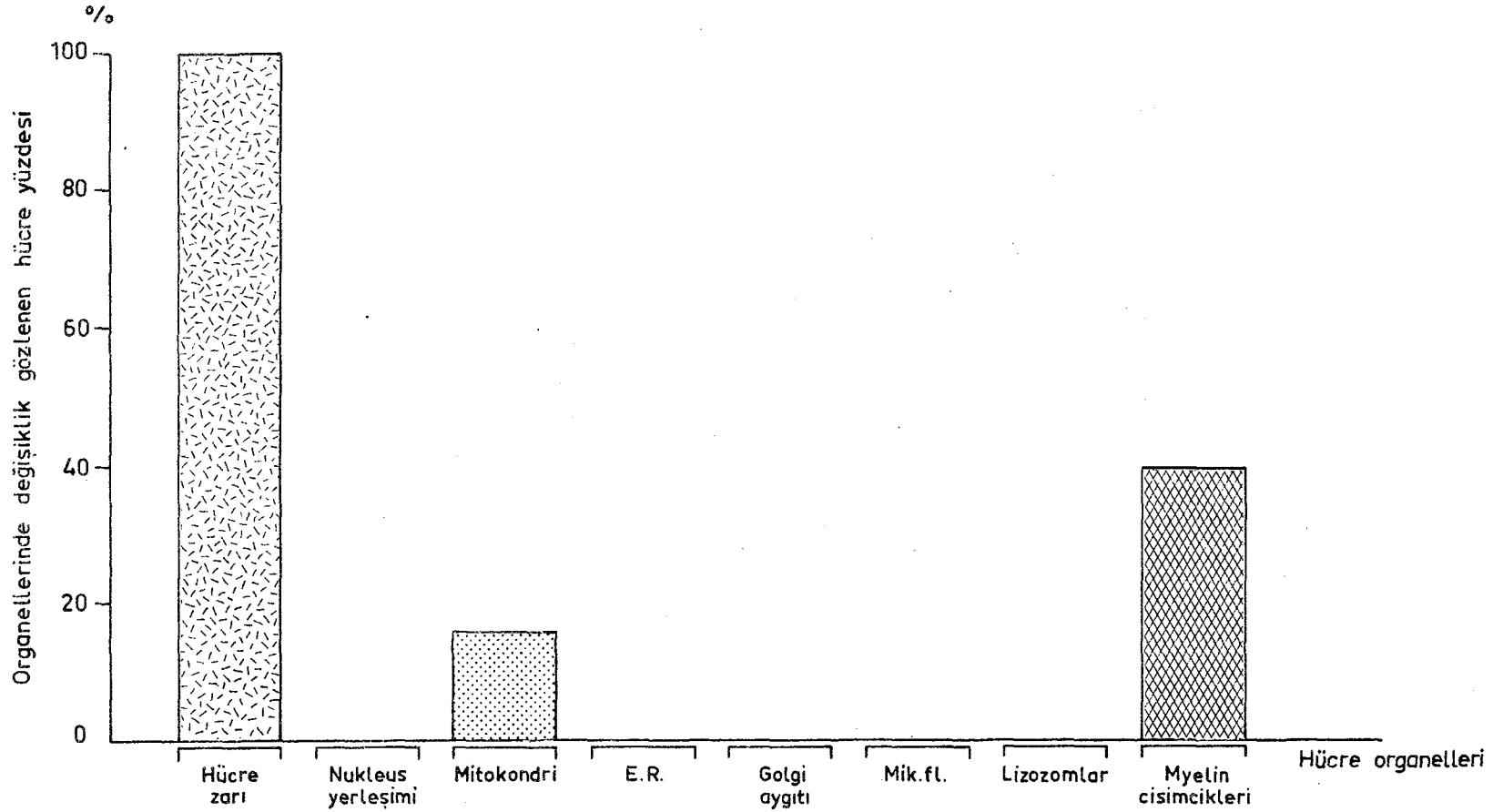
E.R. : Endoplazmik Retikulum
Mik.fl. : Mikroflamentler

GRAFİK 3: 9 L GLIOMA DOKU KÜLTÜRÜNDE 10µg/ml BCNU DOZU İLE
ORGANELLERİNDE DEĞİŞİKLİK GÖZLENEN HÜCRELER
(% olarak)



E.R. : Endoplazmik Retikulum
Mik.fl : Mikrofamentler

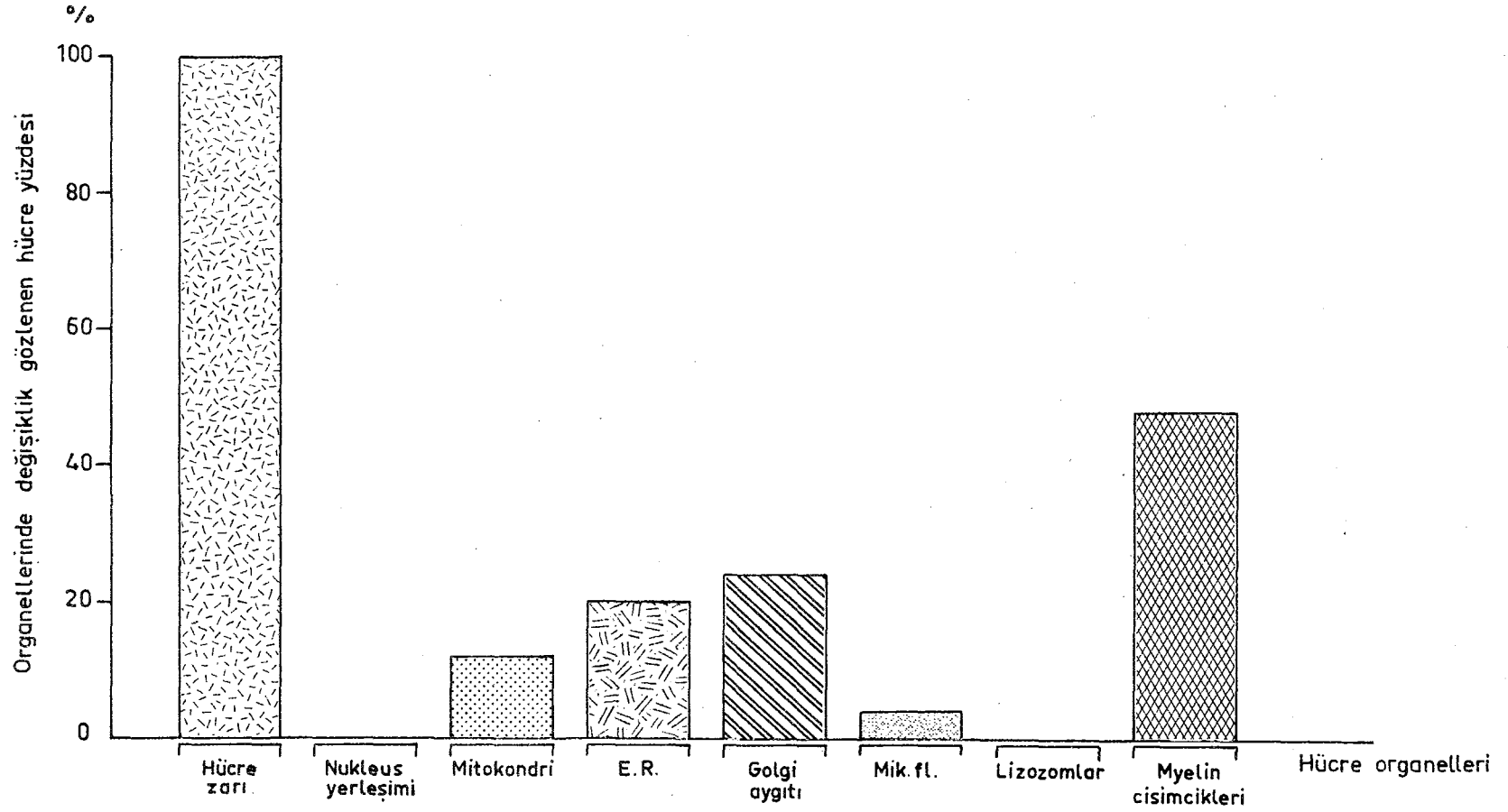
GRAFİK 4: 9 L GLİOMA DOKU KÜLTÜRÜNDE 20 µg/ml BCNU DOZU İLE
ORGANELLERİNDE DEĞİŞİKLİK GÖZLENEN HÜCRELER
(% olarak)



E.R. : Endoplazmik Retikulum

Mik.fl : Mikroflamentler

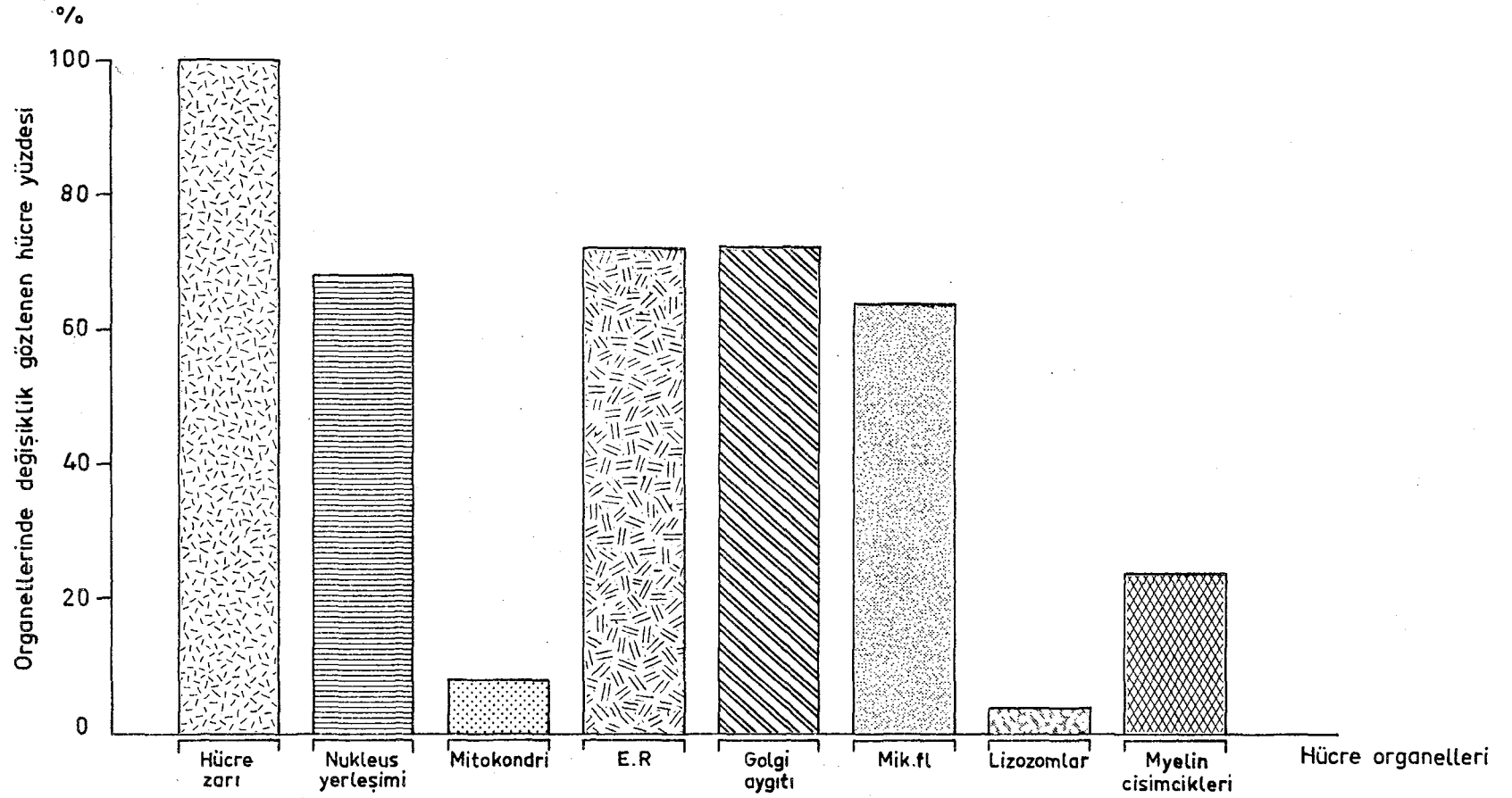
GRAFİK 5 : 9L GLİOMA DOKU KÜLTÜRÜNDE 40 µg/ml BCNU DOZU İLE
ORGANELLERİNDE DEĞİŞLİK GÖZLENEN HÜCRELER
(% olarak)



E.R. : Endoplazmik Retikulum

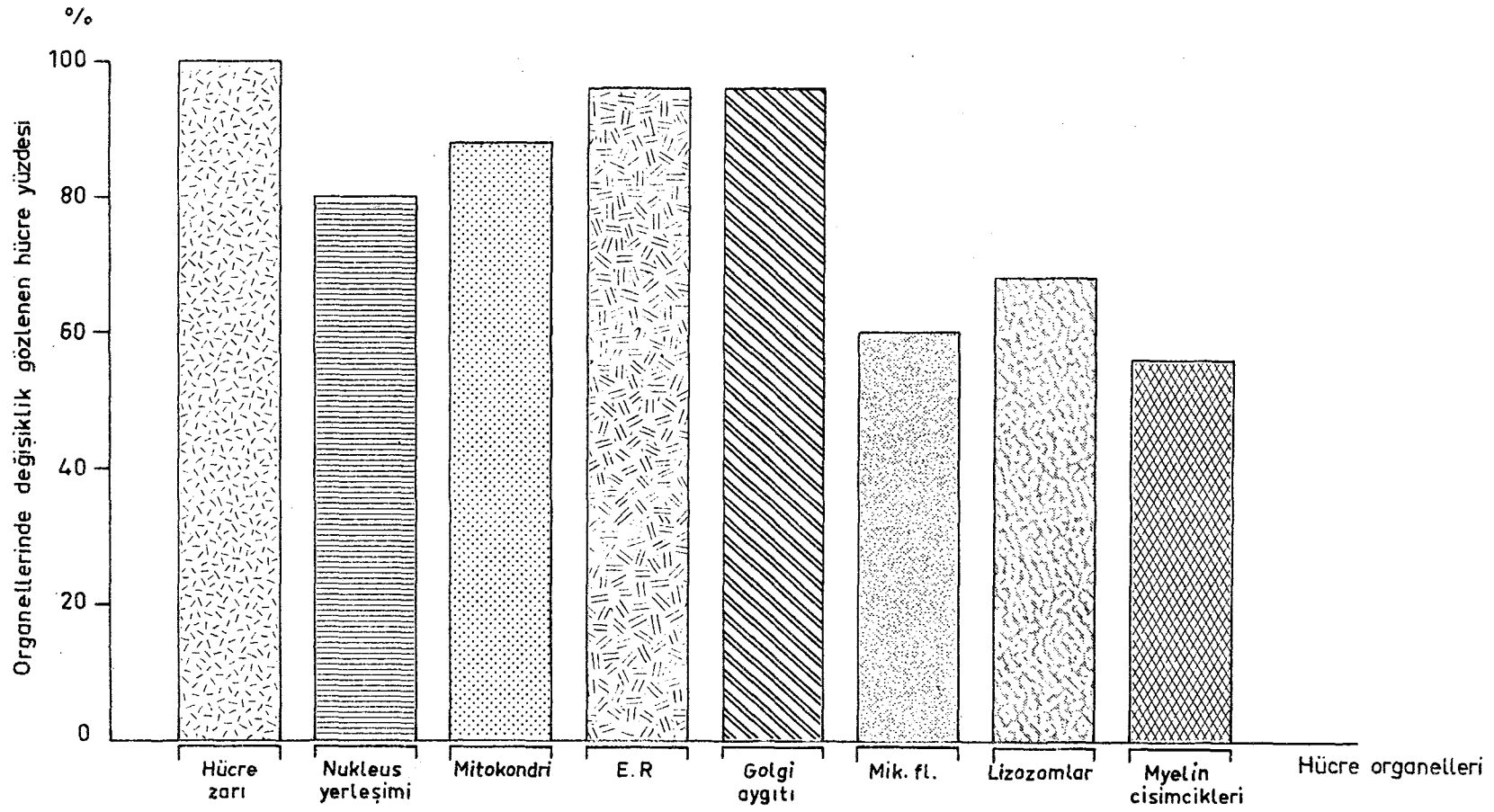
Mik. fl. : Mikrofilamentler

GRAFİK 6 : 9L GLIOMA DOKU KÜLTÜRÜNDE 60 µg/ml BCNU DOZU İLE
ORGANELLERİNDE DEĞİŞİKLİK GÖZLENEN HÜCRELER
(% olarak)



E.R. : Endoplazmik Retikulum
Mik.fl. Mikroflamentler

GRAFİK 7. 9L GLİOMA DOKU KÜLTÜRÜNDE 80 µg/ml BCNU DOZU İLE
ORGANELLERİNDE DEĞİŞİKLİK GÖZLENEN HÜCRELER
(% olarak)



E.R. : Endoplazmik Retikulum
Mik.fl. : Mikrofilamentler

TARTIŞMA

Elektron mikroskop tekniği ilerledikçe hemen her dokunun ince yapısı merak edilmiş ve incelenmeğe başlanmıştır. İleri ülkelerde bazı patoloji laboratuvarlarında rutin olarak elektron mikroskobu kullanılmaktadır. İnsan beyin tümörlerinden birçoğu da ince yapısal olarak incelenmiştir. Örneğin, Matakas ve arkadaşları elektron mikroskobik çalışma yaptıkları 9 medulloblastoma vak'asında oldukça özel bir histolojik ve sitolitik yapı gördüler (22). Tümörü oluşturan hücreler değişik şekillerde idi ve az sayıda organel içeriyordu. Golgi aygiti nukleusa yakın yer alıyordu. Mikrotubuli ve mikrofilamentler vardı. Mitokondriler ufak ve az sayıda idi.

Liu ve arkadaşları çocukluk çağı ependimomalarının değişik histolojik tipleri üzerinde yaptıkları elektron mikroskobik çalışmalarda bu tümörlerin, ependimal hücrelerin yanında ayrı tipte hücreleri de içerdiğine dikkati çekmişlerdir. Birinci grup tipik ependimal hücrelerde ki, bunlar silia, mikrovilli ve spesifik junctional apparatus içeriyorlardı. İkinci tip, astrositlere çok benzeyen hücrelerdi. Bunlar bol miktarda mikrofilament ve mikrotubuli içeriyorlardı. Üçüncü gruptaki hücreler ise bu özelliklerin hiçbirini göstermeyen indifferansiye hücrelerdi (18).

Lynn ve arkadaşları, ışık mikroskobu özellikleri ile beyinin Monstro sellüler sarkoması olarak bilinen tümörünün, ince yapısının incelenmesinden sonra fibrosarkomdan çok astroglial orijinli olduğunu anlaşıldığını bildirmişlerdir (19).

Yukarıda verilen örnekler ameliyatta veya otopside alınan tümör dokularının direkt olarak ince yapısal incelenmesi ile elde edilmiştir. Çalışmaların birçoğunda ise ameliyatta alınan doku kültüre ekilmiş ve pasajlar yapıldıktan sonra ince yapısı incelenmiştir. Örneğin, Sipe ve arkadaşları, 4 glioblastoma ve 2 serebellar astrositoma vak'asından ameliyatta aldıkları materyalin yarısını doğrudan doğruya, diğer yarılarını kültüre ekip pasajlar yaptıktan sonra elektron mikroskopu ile incelediler (35). İkisi arasındaki ince yapısal fark şöyle idi; kültürde yaşatılan her iki cins tümörde gliofibrillogenesis vardı. Ayrıca granüllü endoplazmik retikulumda ve serbest ribozomlarda da artma görüldü. Halbuki, direkt incelenen tümörlerde mikrofilamentler, granüler endoplazmik retikulum ve serbest ribozomlar fazla değildi. Bu organellerin artışının, hızlanan protein sentesinin morfolojik bir bulgusu olduğu bilinmektedir ve böyle olduğu aynı araştırmada bu proteinin (glial asidik fibriller protein) haf-talarca kültür sisteminde kalması ile gösterilmiştir. Ayrıca, glial mikrofilamentlerin artması hücrelerin daha diferansiye olduğunu göstermektedir ki, bu doku kültürlerinde astrositik gliomaların dediferansiye olacakları hakkında daha evvelce edinilen bilgilerin tam tersi olmuştur.

Hayvanlarda deneysel olarak meydana getirilen tümörlerin de elektron mikroskopik yapısı incelenmiştir. Zimmerman, 1967 de yayınladığı çalışmasında deneysel olarak elde edilmiş medulloblastomada virüse benzer partiküller gördüklerine dikkati çekmiş, aynı yazar, 1968 ve 1969 da çıkan yazılarında da deneysel fare ependimoblastomasının ince yapısında virüse benzer partiküllerden söz etmiştir. Bu partiküller tümör hücrelerini % 30'unda görmüştür. Yapısal özellikleri ile fare virusu görünümünde olduğu bildirilmiştir. Bu bulguların ışığında faredeki latent virusun, kimyasal karsinojenler ile aktive edildiği ve onkojenik bir potansiyel kazandığı görüşü kuvvetlenmiştir (27, 28, 49).

Lantos ve arkadaşları meydana getirdikleri transplasental induced tümörlerinden birinde nöroblastlara benzer hücreler görmüşler ve elektron mikroskop seviyesinde nöronal hücrelere özgü sekretuar granüller içerdiğini göstermişlerdir. Böylece kimyasal karsinojenlere sadece glial hücrelerin değil, nöronların da hassas olduğu anlaşılmıştır (17).

Çalışmamızda kullandığımız 9 L sıçan glial tümörü de daha önce sözü edildiği gibi elektron mikroskopunda incelenmiştir (6).

Tümörün çok sayıda pasajlardan sonraki durumu, çalışmamızda kullandığımız kontrol grubunda araştırılmıştır. Aynı tümörün (9 L sıçan glioması) ilk elde edildiği zamanki ve - pasajlardan sonraki ince yapısı karşılaştırıldığında, iki tümör arasındaki fark pasajlardan sonraki tümörde golgi aygıtı ve mitokondrilerin daha belirgin ve bol miktarda bulunmuş olmasıdır. Ayrıca dev hücreler ilk tarif edilen örneklerdeki kadar çok sayıda değildir. Bu bulgular yukarıda sözü edilen Sipe ve arkadaşlarının kültürde yaşattıkları tümör hücrelerindeki bulgularına uygunluk göstermektedir. Yani tümör kültür pasajlarında dediferansiye olmamıştır ve protein sentesinin arttığına ilişkin morfolojik bulgular vardır.

Tümör hücrelerinin direkt veya kültür pasajlarının ince yapısının araştırılmasından başka bir kısım araştırmalarda bu tümörler, radyasyon veya kemoterapötik ajanların etkisi açısından da incelenerek ince yapısal değişimler gösterilmek istenmiştir. Örneğin; Heilporn, C₆ sıçan glial tümörüne 120, 300 ve 600 Rad radyasyon verdikten sonra mikrotulubuli ve mikrofilamentlerde artma görmüş, otoradyografi ile DNA ve RNA sentezinin kuvvetle inhibe edildiğini buna karşılık protein sentezinin stimüle edildiğini göstermiştir (16).

Bu bulgu bizim çalışmamızda BCNU ile elde ettiğimiz neticeye uymaktadır. BCNU dozu yükseldikçe mikrofilamentler belirgin ölçüde artma göstermiştir. Ayrıca Heilporn, hücrelerin radyasyondan sonra mitotik aktivitelerine devam ettiklerini yazmaktadır. Biz, bu çalışmaya paralel yaptığımız ikinci bir araştırmada, aynı dozlar ile tedavi ettiğimiz hücreleri tekrar kültür yaptığımızda 14 gün sonra meydana getirdikleri kolonilerin sayısının doz yükseldikçe azaldığını, yani BCNU dozu arttıkça mitoz yeteneğinin de azaldığını gördük (43).

BCNU nun tümör hücrelerine etkisinin bu yönden radyasyon etkisinden farklı bulunması, kullanılan radyasyon dozunun düşük oluşu ile açıklanabilir.

Pinkerton ve Rana iki insan glioblastomasının in vitro kültürüne gittikçe artan dozlarda BCNU verdiklerinde ve sonuçları ışık mikroskopunda incelediklerinde, mitozun durduğunu, hücre sayısının azaldığını, hücrelerin yuvarlak bir şekil aldığını, nükleer piknoz ve hücre ölümü olduğunu görmüşlerdir (25).

Shapiro ve arkadaşları intrakranial tümör implante ettikleri hayvanları BCNU, Cyclophosphamide, Mithramycin ve Methotrexate ile tedavi ederek yaşam sürelerini incelemiş ve bu 4 ilaçtan sadece BCNU nun tümör büyümesine devamlı engelleyici etki ettiğini ve hayvanlarda en uzun yaşam süresinin BCNU tedavisi ile elde edildiğini saptamışlardır (32).

Bu in vitro arařtırmalar ve hayvan deneyleri sűrerken BCNU klinik olarak da deneme ğe bařlanmıřtır. Willson ve Duffy 26 glioblastoma vak'asında, BCNU + X - Ray, sadece irradiasyon ve sadece cerrahi giriřim sonuçlarını biopsi ve otopsi materyallerinde histolojik ve sitolojik özellikleri ynűnden karřılařtırdıklarında birinci grupta tűmrlerin hiposellűler olduėunu ve dev hűcrelerinde çok arttıėını saptamıřlardır (45).

Walker'da BCNU kullandıėı beyin tűmrlű hastalarının yarısında orta derecede veya daha fazla klinik iyileřme grűldűėini rapor etmiřtir (40).

Arařtırma laboratuvarında nitrozűrealar ile çalıřan ve bunları hastalarında da deneyen Wilson, BCNU nun tűmre olan olumlu etkisi kadar santral sinir sistemine geçme kolaylıėının da tedavideki seçiminde önemli etken olduėunu bildirmiřtir (46).

Vogel ve arkadaşları diğer tedavilere cevap vermiyen Kaposi sarkomu vak'alarını BCNU ile tedavi etmişler ve % 29'unda iyi netice almışlardır (39).

Calogero ve arkadařları da cerrahi giriřim ve radyasyondan sonra rekűrens gösteren 3 hastalarında BCNU denemiřler ve sonuçların iyi olduėunu rapor etmiřlerdir (9).

BCNU ile ilginç bir arařtırmayı Pezzotta ve arkadařları yapmıřlar ve BCNU nun, ENU (Ethylnitrosourea) ile deneysel tűmr veya mikrotűmr geliřmesine % 80 e varan oranda engel olduėunu göstermiřlerdir (24).

BCNU intrakarotid olarak verildiėinde tűmre daha çabuk ulařabileceėi ve daha az dozlar ile aynı etkinin saėlanabileceėi dűřűncesi ile 1973 de De Wys ve Fowler 8 köpekte (12). 1976 da Crafts, Levin ve Nielsen 6 Rhesus maymununda bu yolu denediler (10). Komplikasyon olarak köpeklerde korneal opasite, retinal dem ve krlűk meydana geldi. Maymunlarda ise otopside beyin ve gözlere ait patoloji tesbit edilmemekle birlikte, Karotis Arterde enjeksiyon yerlerinde fibrozis, dev hűcre reaksiyonu ve organize trombus teřekkűlű bulundu. Bu bulguların bařka hiç bir damarda grűlmemesi nedeni ile BCNU nun Karotis artere yerel reaksiyon yaptığı kabul edildi. Bilinen bu lokal yan etkileri için gerekli önlemler alındığında Karotis arter yolu ile az dozlarda BCNU tedavisinin tercih edilen bir yöntem olarak uygulanabileceėini belirttiler.

BCNU nun řimdiye kadar saydıėımız olumlu zellikleri (Kan beyin barajını geçmesi, kuvvetli antitűmr etkisi, klinik uygulamada yűz gűldűrűcű sonuçlar vermesi) laboratuvarlarda deneysel çalıřmalarda da birinci sırayı almasına neden olmuřtur. Özellikle, diėer kemoterapötiklerle birlikte kullanılması, etkisini azaltıcı veya çoėaltıcı yeni ortamların oluřturulması, arařtırmaların bařlıca amacı ve hedefi olmuřtur. Grasso ve arkadařları, BCNU ve Dexamethasone kombinasyonunun subletal dozda tűmr hűcrelerinin çoėalmasını inhibe ettiklerini göstermiřlerdir. Bu alıřmalarında C₆ sıçan gliomasına ait tűmr kűltűrűnű kullanmıřlar, tek bařına BCNU ile inhibisyon etkisi 1 gűn, yalnız Dexamethasone ile 3 gűn sűrdűėi halde, iki ilaç birlikte verildiklerinde bu sűrenin 5 gűne çıktığı saptamıřlardır (15). Bu etkinin temelindeki metabolik olaylar bilinmemekle birlikte, klinik uygulamadaki önemi ařıkardır. İlaç subletal dozdan sonra kesildiėinde hűcreler tekrar űreme gösterebilir. Halbuki alıřmamızda tűmr hűcrelerinin % 56 sı ile % 100 űnde hűcre organellerinde dejenerasyon meydana getiren doza kadar çıkılmıř ve bunun 80 μ gm/ml BCNU olduėu saptanmıřtır. Grasso, alıřmasında C₆ sıçan glioması hűcrelerinin ultrastrűktűrel yapısını da incelemiřtir (14). Bu alıřma literatűrde bizim çalıřmamıza en çok benzeyen ve bulgularını karřılařtırabileceėimiz tek kaynak olarak bulunmuřtur.

Sözü edilen Grasso ve grubu, araştırmalarında yukarıda ki tedaviyi takiben tümör hücrelerini elektron mikroskobu ile incelemiş ve hücrelerin ortasından geçen kesitlerin resimlerini büyölterek organellerin volum fraksiyonlarını özel teknikle analize etmişlerdir (42). BCNU ve Dexamethasonun birlikte verilmesi ile granüler endoplazmik retikulum yüzdesinin önemli derecede arttığını görmüşler ve artışı protein metabolizmasındaki değişikliğin morfolojik bulgusu ve hücre proliferasyonunun durmasının bir işareti olarak nitelendirmişlerdir.

Mitokondrilerde hacim artımı yalnız Dexamethasone ile tedavi edilen hücrelerde de görülüş ve sonuçta gene hücre proliferasyonunun durmasına yol açmıştır. Sonuç olarak, bu iki anti tümoral ajan, mitokondri ve granüler endoplazmik retikulum ile ilgili mekanizmaları bozarak mitozu, dolayısı ile hücre proliferasyonunu engellemiştir.

Biz de çalışmamızda artan BCNU dozlarına bağlı olarak tümör hücre organellerindeki ince yapısal değişimleri inceledik. 40 μ gm/ml BCNU dozundan sonra endoplazmik retikulumda (granülsüz) önemli derecede şişme, 80 μ gm/ml lik dozdan sonra ise mitokondrilerde şişme, kristalarında intizamsızlık gibi dejenerasyon işaretlerini gözledik. Bilindiği gibi bu iki organelin hücre yaşamında çok önemli yeri vardır. Düşüncemize göre BCNU etkisi ile tümör hücresinde detoksikasyon işlemi yapan düz endoplazmik retikulumun fonksiyonları bozulmakta ve hücre içinde toksik maddeler birikmektedir. Ayrıca hücreye her türlü hayatsal olay için enerji sağlayan mitokondriler bu işlemi yapamamakta dolayısı ile hücrenin protein metabolizması bozulmakta ve çoğalma da durmaktadır. Mitokondrilerdeki şişlik ve kristalarındaki düzensizliği ise BCNU nun mitokondrinin iyon seçici ve pompalayıcı özellikteki zarı üzerine zararlı etkisi ile açıklamak mümkündür. Geçirgenliği artan ve iyi fonksiyon göremeyen zardan mitokondri içine su girmekte ve şişmesine neden olmaktadır.

Çalışmamızda önemli bulduğumuz diğer bir bulgu BCNU dozu yükseldikçe mikrofilamentlerde yoğunluğun artmasıdır. Mikrofilamentlerin hücredeki fonksiyonu ve önemi ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Örneğin, Spooner ve arkadaşları invitro olarak glial-hücre hareketlerini incelemişler ve mikrofilamentlerin hareket için gerekli olduğunu söylemişlerdir (36). Sherline ve arkadaşları da sekretuar granüllerin intrasellüler hareketinde mikrotubulilerin rol oynadığını saptamışlardır (34). Katherine M. Lyser gelişmekte olan aksonlarda ve optik sinir hücrelerinde mikrotubuli ve mikrofilamentleri göstermiştir (20). Beyin hücrelerinin filament ve tubulilerinin kimyasal yapısını anlatan Shelanski, bazı gözlemcilerin bu iki fibriller yapının birbirine dönüşebilen aynı protein subunit'i olduğunu varsaydıklarını belirtmiştir (33). Adelman ve arkadaşları da mikrofilamentlerin hücrelerin nonsferik şekillerinin korunmasına yaradıklarını söylemişlerdir (1). Spooner'in deneylerinde Cytochalasin B hücre hareketini hemen durdurmuş ve mikrofilament ağını parçalamıştır (36). Shelanski de sporadik motor nöron hastalıklarında ve Colchicine, Vinblastin ile diğer antimitotik ajanların entoksikasyonlarında hücredeki mikrofilament sayılarının çok arttığını bildirmektedir (33). Bu bulgular BCNU nun da aynı mekanizma ile mikrofilament miktarını arttırdığını yani antimitotik ajanlar gibi etki ettiğini düşündürmektedir. Everhart ve Rubin Cytochalasin B nin evvelce bilindiği gibi sadece mikrofilamentleri parçalamadığı, primer etki yerinin hücre zarı olduğu kanısındadırlar (13). İlaç verilir verilmez hücrenin normal yüzey uzantıları küçülmüş ve kaybolmuş, hücre yuvarlak bir şekil almıştır. İlacın etkisi kalkar kalkmaz da hücre eski haline dönmüştür. Everhart ve Rubin bunu, ilacın hücre içine girmeyip satıhta kaldığı ve mikrofilamentleri parçalamayıp sadece yüzeyde tutundukları yere etki ederek bu bağlantıyı kopardığı şeklinde yorumlamışlardır. BCNU nun da ilk temasta hücre zarına etki ederek uzantıları kısaltıp hücreyi yuvarlak hale getirmesi, daha yüksek dozlarda da mikrofilament miktarını arttırması aynı mekanizma ile açıklanabilir. Yalnız BCNU, hücrenin sadece dış zarını etkilemekle kalmamış, ortamdaki konsantrasyonu arttırıldıkça hücre içi organellerde de gittikçe artan degeneratif bulgular meydana getirmiştir. Bu bakımdan ilacın hücre içine de girip etkisini sürdürdüğü aşıkardır.

Çalışmamızda lizozom sayısının da $40 \mu \text{ gm/ml}$ BCNU dozundan sonra önemli derecede arttığını gösterdik. $1-40 \mu \text{ gm/ml}$ BCNU dozlarında gördüğümüz lizozomlar primer tip-te idi. Bu dozdan sonra gördüklerimiz ise hücre yıkımına ait artık maddeleri içeren sekonder tip lizozomlar olarak yorumlandı (7, 8). Myelin cisimcikleri ve lizozomların artımı daha önce sözü edildiği gibi hücre dejenerasyonunu belirtirlerdir. Bununla beraber Grasso ve arkadaşlarının deneylerinde Kortizonun BCNU nun etkisini arttırdığı gösterilmiştir (14). Kortizonun lizozomların membranını stabilize ettiği ve geçirgenliğini azalttığı ise bilinen bir gerçektir. Buna dayanarak BCNU nu da lizozomal membrana stabilizatör olarak etki ettiğini düşünmekteyiz. Bu suretle parçalanamayan ve sayıları artan lizozomlar aynı zamanda hücrede artan dejenerasyon olayları sonucu ortaya çıkan artık maddeleri de sindirmeğe çalışacaktır. Membranı parçalanan lizozomlardan bazı hücrelerin mitotik aktivitesini stimüle eden enzimler açığa çıkar. BCNU nun bu fonksiyonu da engelliyerek mitozu azalttığını düşünmekteyiz. Bütün bunların morfolojik bulgusu olarak grafik 7 de görüldüğü gibi hücre için de lizozom sayısı belirgin şekilde artmıştır.

Yüksek dozlarda BCNU verilmesinden sonra nukleusun eksantrik yerleşimine literatürde örnek bulunamamıştır. Bu durumun BCNU nun özel bir etkisi olup olmadığının anlaşılması için daha ileri araştırmaların yapılması gereklidir. Golgi aygıtında görülen şişme ve sayıca artma endoplazmik retikulumun gösterdiği değişikliklerle aynı paralelde açıklanabilir.

Serbest ribozomlarda ise belirli bir değişiklik gözlenmediğinden çalışma kapsamına alınmamıştır.

Bu çalışmada önemli olan diğer bir bulgu, tümör hücrelerinin en düşük dozda ($1 \mu \text{ gm/ml}$ BCNU) sadece zarlarının etkilenmesidir. Bu doz ile hücrelerin % 4 ünde hücre zarı uzantıları kısalmış ve kalınlaşmış künt bir görünüm almıştır. Bu değişikliğin belirgin hale geldiği ilk BCNU dozu ise $10 \mu \text{ gm/ml}$ olmuştur. $20 \mu \text{ gm/ml}$ lik BCNU dozundan itibaren ise hücrelerin % 100 ü aynı değişiklikleri göstermiştir. Hücre zarındaki bu değişiklikler geri dönebilir. Fakat hücrenin yaşam fonksiyonları için önemli olan diğer organelleri ancak $40 \mu \text{ gm/ml}$ BCNU dozunda dejenerasyon bulguları vermeğe başlamışlardır. Bütün organellerde dejenerasyon ve tümör hücresi ölümünün morfolojik bulguları ancak $80 \mu \text{ gm/ml}$ BCNU dozunda elde edilmiştir. (Grafik 7). Bu dozda ilaç verilmesi ile tümör hücrelerinin % 56- %100 ünde organellerde dejenerasyon bulguları gözlenmiştir.

Bu bulguların ışığında in-vitro deneylerde tümör hücresi (9 L) için letal dozun $80 \mu \text{ gm/ml}$ BCNU olduğu söylenebilir. Subletal dozlar ile tedavi in-vitro olduğu kadar in-vivo olarak da amaca yönelik olmamaktadır. Çünkü tümör hücresinde ilaç verildiği sürece üreme durdurulmuş fakat hücreler ölmemiştir. İlaç kesilince hücreler tekrar hızla üremeğe başlarlar ve tümör eski hacmine ulaşır. Bu çalışma, etkin dozlarda verildiği takdirde, BCNU nun, tümör hücrelerini % 100 e varan oranda öldürerek rekürrenslere de mani olacağı yolunda ümit vermiştir.

SONUÇLAR

Bu çalışmada, deneysel bir sıçan beyin tümörü olan 9 L sıçan gliomasının tek kat hücre kültürüne artan dozlarda, 1, 3 – Bis (2–Chloroethyl)–1–nitrosourea (BCNU) verilerek elektron mikroskopi düzeyinde tümör hücre organellerinde meydana gelen dejeneratif değişiklikler incelenmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir.

1– En düşük doz olan 1 μ gm/ml BCNU ile hücrelerde ilk değişiklik hücre zarında gözlenmiştir. Hücre mikrovillusları kısalıp kalınlaşmış ve künt bir görünüm almıştır. Doz artımı ile bu bulgu süratle artmış ve 20 μ gm/ml BCNU dozundan itibaren hücrelerin tümünde gözlenmiştir. Bu bulgu BCNU nun hücre zarında mikrofilamentlerin yapışma yerine etki ederek bu bağlantıyı kopardığı ve hücrenin yuvarlak biçim aldığı şeklinde yorumlanmıştır.

2– Kontrol grubunda hücrelerin ortasında yer alan nukleusların 60 ve 80 μ gm/ml lik BCNU dozları verildiğinde hücrelerin % 68 – 80 inde kenara itildiği saptanmıştır.

3– Verilen BCNU dozlarına oldukça dayanıklı görünen mitokondriler ancak en yüksek doz olan 80 μ gm/ml BCNU ile etkilenmişler ve bu dozda hücrelerin % 88 inde dejenerasyon bulguları göstermişlerdir. Bu bulgu da BCNU nun mitokondri zarına etki ederek selektif permeabilitesini bozduğu, dolayısı ile de hücrenin enerji kaynağı olan mitokondrilerde dejenerasyon meydana getirdiği şeklinde yorumlanmıştır. Bu yol ile hücrenin tüm hayatsal olayları mitoz dahil engellenmiş olmaktadır.

4– Endoplazmik retikulumda (granülsüz) şişme 40 μ gm/ml BCNU dozundan itibaren belirginleşmiş ve en yüksek doz olan 80 μ gm/ml de hücrelerin % 96 sının vesiküllü bir görünüm aldığı saptanmıştır. Kanımızca bu bulgu hücrede detoksikasyon işlemi yapan düz endoplazmik retikulumun fonksiyon bozukluğu ile açıklanabilir. BCNU etkisi ile hücrede toksik maddeler birikmektedir.

5– Golgi aygıtında görülen şişme ve sayıca artma 40 μ gm/ml BCNU dozunda başlamış ve doz yükselişine paralel olarak artarak 80 μ gm/ml de, endoplazmik retikulumda olduğu gibi hücrelerin % 96 sında şiş bulunmuştur. Golgi aygıtı bir endoplazmik retikulum komponenti olarak düşünüldüğünden bu bulgu da detoksikasyon işleminin engellenmesi ve toksik madde birikimi ile açıklanmak istenmiştir.

6- Kontrol tümör hücrelerinde (+ ile ++) miktarda bulunan mikrofilamentlerin 60-80 μ gm/ml BCNU dozlarında hücrelerdeki yoğunluğunun çok arttığı gözlenmiştir. Bu bulgu antimitotik ajanların hücre içinde mikrofilamentleri arttırma etkisine benzetilmiştir. Ayrıca BCNU nun hücre zarına etki ettiği yerin mikrofilamentlerin zara bağlandıkları yer olduğu düşüncesini kuvvetlendirmiştir. Dolayısı ile hem hücre şekli kaybolup yuvarlaklaşmış hem de mikrofilament sayısı artmıştır.

7- Kontrol tümör hücrelerinde belirli sayıda (1-3 tane) bulunan lizozom ve myelin cisimcikleri, ancak en yüksek doz olan 80 μ gm/ml BCNU verildiğinde farklılık göstermişler ve sayıca çok artmış olarak bulunmuşlardır. Myelin cisimcikleri yaşlı veya dejenere hücrelerde görülür. Lizozomlar da böyle hücrelerde artar. BCNU nun bu organelle kortizon gibi membran stabilizatörü olarak etki etmiş olabileceği ve dolaylı olarak hayatsal olaylar ile mitozun durdurulmasında katkısı olduğu düşünülmüştür.

8- Bu in-vitro çalışmada 80 μ gm/ml in altındaki BCNU dozları, hücre organellerinde doz artımına paralel olarak artan bir dejenerasyona sebep olmuşlardır. Fakat tüm hücre organellerinin, bilhassa mitokondrilerin dejenerasyonu ancak 80 μ gm/ml lik doz ile elde edilmiştir. Yani 9 L sıçan glial tümörü için in-vitro letal dozun 80 μ gm/ml BCNU olduğu saptanmıştır.

ÖZET

Deneysel olarak elde edilmiş bir sıçan glioması olan 9 L Tümörünün tek katlı doku kültürüne 1.3-Bis (2-Chloroethyl)-1-nitrozourea (BCNU) verilerek, bu antitümöral ajanın, tümör hücrelerinin ince yapısında ne gibi değişiklikler yaptığı araştırılmıştır. Tümör kültürüne gittikçe artan dozlarda BCNU verilerek, elektron mikroskobunda tümör hücrelerinin organelleri tek tek incelenmiş ve doz artışına paralel olarak artan dejenerasyon bulguları gözlenmiştir. En az doz ile ilk etkilenen hücre organeli hücre zarı, en geç etkilenen organeller de mitokondriler, lizozomlar ve mikroflamentler olmuştur. Hücre ölümünün bütün bulguları $80 \mu \text{ gm/ml}$ dozu verildiğinde elde edildiğinden in-vitro denemeler için bunun letal doz kabul edilebileceği düşünülmüştür. Bu çalışma, etkin dozlarda verildiği takdirde "BCNU" nun tümör hücrelerini % 100 e varan oranda öldürerek rekürrensleri de engelleyebileceği yolunda ümit vermiştir.

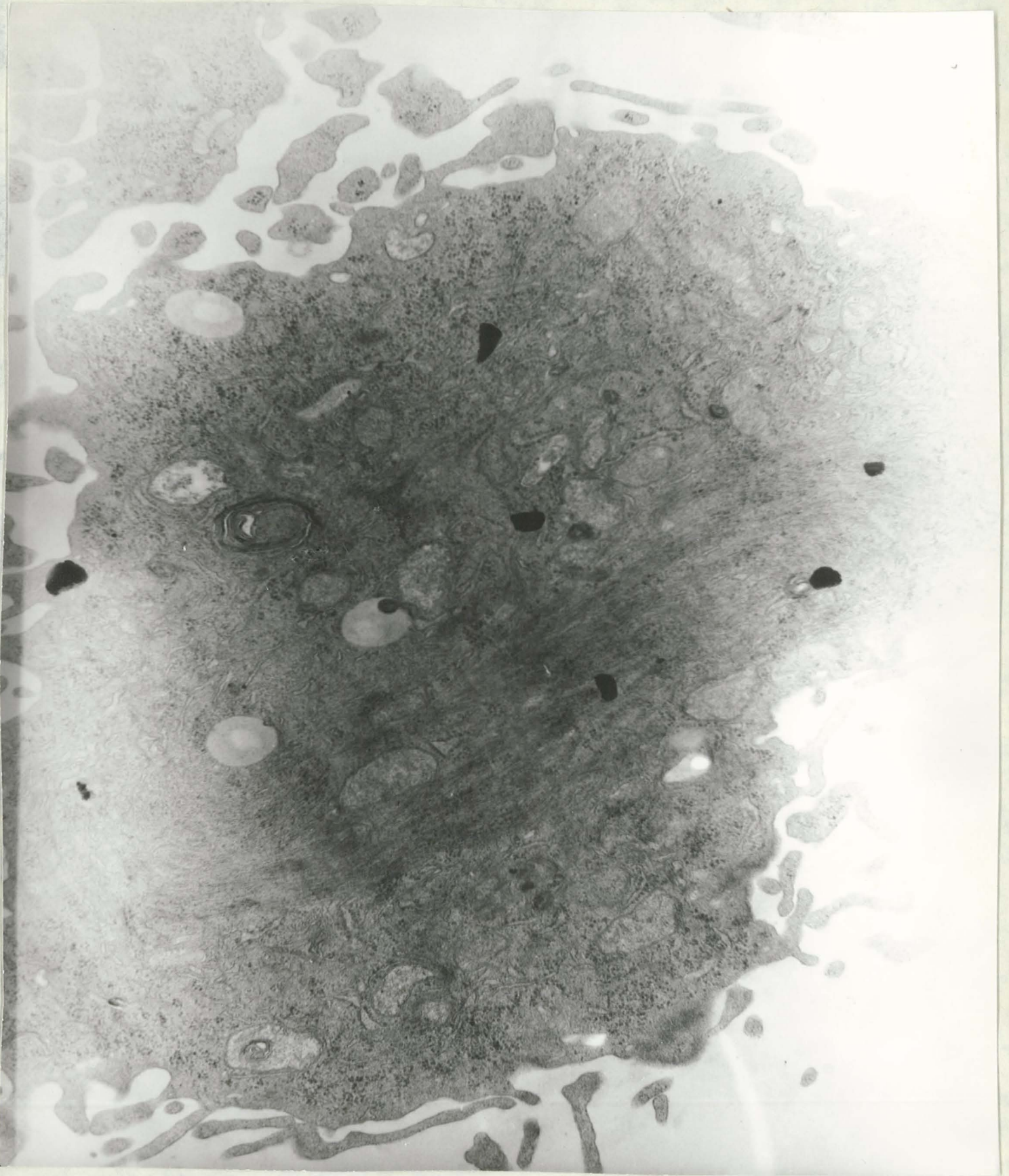
KAYNAKLAR

- 1– Adelman, M.R., Borisy, G.G., Shelanski, M.L., Weisenberg, R.C. and Taylor, E.W. Cytoplasmic Filaments and Tubules. Federation Proceedings. 27 (5): 1186–1193, 1968.
- 2– Andaç, S.O. Hücre Fizyolojisi. Sayfa: 8–62, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 1977.
- 3– Anderson, W.A.D., Kissane, J.M. Pathology, Volume one, pp: 1–24. The C.V. Mosloy Company. Saint Louis, 1977.
- 4– Barker, M., Hoshino, T., and Wilson, C.B. Tissue Culture of Human Brain Tumors. In: W.N., Kirsh, E.G. Paoletti, and P.Paoletti (eds.), The Experimental Biology of Brain Tumors, pp: 57–84, Springfield, III: Charles C.Thomas, Publisher, 1972.
- 5– Barker, M., Hoshino, T., Gürçay, Ö., Wilson, C.B., Nielsen, S.L., Downie, R. and Eliason, J. Development of an Animal Brain Tumor Model and Its Response to Therapy with 1, 3–Bis (2–chloroethyl)–1–nitrosourea. Cancer Res.33: 976–986, 1973.
- 6– Benda, P., Someda, K.Messer, J., Sweet, W.H. Morphological and Immunochemical Studies of Rat Glial Tumors and Clonal Strains Propagated in Culture J. Neurosurg 34: 310–323, 1971.
- 7– Brunk, V., Ericsson, J.L.E., Ponten, J., and Westermark, B. Residual Bodies and "Aging" in Cultured Human Glia Cells. Exp. Cell. Res. 79: 1–14, 1973.
- 8– Brunk, V. Distribution and Shifts of Ingested Marker Particles in Residual Bodies and Other Lysosomes. Exp. Cell. Res. 79: 15–27, 1973
- 9– Calogero, J., Crafts, D.C., Wilson, C.B., Boldrey, E.B. Rosenberg, A. and Enot, K J. Long-term Survival of Patients Treated with BCNU for Brain Tumors. j. Neurosurg 43 (2): 191–196, 1975.
- 10– Crafts, D.C., Levin, V.A., Nielsen, S. Intracarotid BCNU (NSC–409962): A toxicity Study in Six Rhesus Monkeys. Cancer Treat. Rep. 60 (5): 541–545, 1976.
- 11– Davignon, J.P., Yang, K.W., Wood, Jr., H.B., and Cradock, J.C. Formulation of Three Nitrosoureas for intravenous Use. Cancer. Chemother. Rep. (Suppl) 4: 7–11, 1973.
- 12– De Weys., W.D. and Fowler, E.H. Report of Vasculitis and Blindness After Intracarotid Injection of 1,3–Bis (2–chloroethyl)–1–nitrosourea (BCNU; NSC–409962) in Dogs. Cancer Chemother. Rep. Part. 1, 57: 33–40, 1973.
- 13– Everhart, Jr., L.P., Rubin, R.W. Cyclic Changes in the Cell Surface. II. The effect of Cytochalasin B on the Surface Morphology of Synchronized Chinese Hamster Ovary Cells. The J. of Cell Biol. 60: 442–447, 1974.
- 14– Grasso, R.J., Moore, N.A., Boler, R.K. and Johnson, C.E. Increased Volumes of Mitochondria and Granular Endoplasmic reticulum in Rat Glioma Cells Treated with Anti-tumor Agents (39777). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 155 (2): 219–224, 1977.

- 15– Grasso, R.J., Johnson, C.E., Boler, R.K. and Moore, N.A. Combined Growth–inhibitory Responses and Ultrastructural Alterations Produced by 1, 3–Bis (2–chloroethyl)–1–nitrosourea and Dexamethasone in Rath Glioma Cell Cultures. *Cancer Res.* 37: 585–594, 1977.
- 16– Heilporn, V., Lievens, A., Limbosch, S., Zampetti–Bosseler, F. and Steinert, G. Morphological Modifications of Rat Glial Tumor Cells After X–Irradiation. *Radiat. Res.* 54: 252–260, 1973
- 17– Lantos, P.L., and Pilkington, G.J. Neuroblasts in Cerebral Tumors Induced by Ethylnitrosourea in Rats. A Fine structural study. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.* 25: 243–259, 1977.
- 18– Liu, H.M., Mc Lone, D.G., and Clark, S. Ependymomas of Childhood. II. Electron–Microscopic Study, *Child's Brain.* 3: 281–296, 1977.
- 19– Lynn, J.A., Panopio, I.T., Martin, J.H., Shaw, M.L. and Race, G.J. Ultrastructural Evidence for Astroglial Histogenesis of the Monstrocellular Astrocytoma (so called Monstrocellular Sarcoma of Brain) *Cancer*, 22: 256–366, 1968.
- 20– Lyser, K.M., Microtubules and Filaments in Developing Axons and Optic Stalk Cells, *Tissue and Cell* 3 (3): 395–404, 1971.
- 21– Marulyalı (Tınaztepe), K.: Çocuklarda Lösemi ve Habis Tümörler. *Çocuk Sağlığı ve Hast. Dergisi.* 3: 231, 1960.
- 22– Matakas, F., Navarre, J.C. and Gullotta, F. The Ultrastructure of Medulloblastomas. *Acta. Neuropath. (Berl).* 16: 271–284, 1970
- 23– Oliverio, V.T. Toxicology and Pharmacology of the Nitrosoureas. *Cancer Chemother. Rep. (Suppl.)* 4: 13–20, 1973.
- 24– Pezzotta, S., Agradi, E. Paoletti, P. The Effect of BCNU, CCNU, and Me CCNU in the prevention of the Development of Tumors of the Nervous System. *Pharmacol. Res. Commun* 7 (1): 49–53, 1975.
- 25– Pinkerton, H., and Rana, M.W. Cytotoxic Effects of 1, 3–Bis (2–chloroethyl)–1–Nitrosourea (BCNU) on Cultured Human Glioblastomas (39251). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 151 (3): 532–534, 1976.
- 26– Robbins. S.L., Angell, M. Basic Pathology, Morphologic expressions of cell injury, pp: 15, W.B. Saunders Company. Philadelphia, London, Toronto, 1971.
- 27– Rubin, R., Sutton, C.H., and Zimmerman, H.M. Experimental Ependymoblastoma (Fine Structure). *J. of Neuropath. and Exp. Neurol.* 27: 421–437, 1968.
- 28– Rubin, R., Ames, R.P., Suttan, C.H., and Zimmerman, H.M. Virus–Like Particles in Murine Ependymoblastoma *J. of. Neuropath. and Exp. Neurol.* 28: 371–387, 1969.
- 29– Russel, R.S., and Rubinstein, L.J. Pathology of Tumours of the Nervous System. pp: 146–152, Edvard Arnold (Publishers) LTD. Fourth ed. 1977.
- 30– Russel, R.S., and Rubinstein, L.J. Pathology of Tumours of the Nervous System pp: 230–232. Edvard Arnold (Publishers) LTD. Fourth ed. 1977.

- 31– Schabel, Jr.F.M Historical Development and Future Promise of the Nitrosoureas as Anticancer Agents. *Cancer Chemother Rep. Part 3, 4*: 3–6, 1973.
- 32– Shapiro, W.R., Ausman, J.I., and Rall, D.P. Studies on the Chemotherapy of Experimental Brain Tumors: Evaluation of 1, 3–Bis (2–chloro–ethyl)–1–nitrosourea, Cyclo phosphamide, Mithramycin, and Methotrexate. *Cancer Res.* 30: 2401–2413, 1970.
- 33– Shelanski, M.L. Chemistry of the Filaments and tubules of Brain. *The J. of Histochem. Cytochem.* 21 (6): 529–539, 1973.
- 34– Sherline, P., Lee, Y.C. and Jacobs, L.S. Binding of Microtubules to Pituitary Secretory Granules and Secretory Granule Membranes. *J. Cell Biol.* 72 (2): 380–389, 1977.
- 35– Sipe, J.C., Herman, M.M., and Rubinstein, L.J. Electron Microscopic Observations on Human Glioblastomas and Astrocytomas Maintained in Organ Culture Systems. *Am. J. of Pathol.* 73: 589–606, 1973.
- 36– Spooner, R.S., Yamada K.M., Wessels, N.K. Microfilaments and Cell Locomotion *J. Cell Biol.* 49: 595, 1971.
- 37– Uysal, T.M., Kılıçturgay, K., Kerse, İ. *Hücre: İnce Yapı ve Görev. Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, 1978.
- 38– Venable, J.H., and Coggeshall, R.A. A simplified Lead Citrate Stain for use in Electron Microscopy *J. of cell Biol.* 25: 407–408, 1965.
- 39– Vogel, L.C., Clements, D. Wanume, A.K., Toya, T., Primack, A. and Kyalwazi, S. Phase II Clinical Trials of BCNU (NSU–409962) and Bleomycin (NSC–125066) in the Treatment of Kaposi's Sarcoma. *Cancer. Chemother Rep. Part 1*, 57: 325–333, 1973.
- 40– Walker, M.D. Nitrosoureas in Central Nervous System Tumors. *Cancer Chemother. Rep. (Suppl)* 4: 21–26, 1973.
- 41– Wasserman, T.H., The Nitrosoureas: An outline of Clinical Schedules and Toxic Effects *Cancer Treat. Rep.* 60: 709–711, 1976.
- 42– Weibel, E.R. Stereological Principles for Morphometry in Electron Microscopic Cytology. *Intern. Rev. Cytol.*, 26: 235–302, 1969.
- 43– Wheeler, I.T., Tel, N., Williams, M.E., Sheppard, S., Levin, V.A. and Kabra, P.M. Factors Influencing the Survival of Rat Brain Tumor Cells after in Vitro Treatment with 1, 3–Bis (2–chloroethyl)–1–nitrosourea. *Cancer Res.* 35: 1464–469, 1975.
- 44– Wheeler, K.T., Deen, D.F., Wilson, C.B., Williams, M.E., Sheppard, S. BCNU–Modification of the in Vitro Radiation Response in 9 L Brain Tumor Cells of Rats, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2: 79–88, 1977.
- 45– Willson, N., Duffy, P.E. Morphologic Changes Associated With Combined BCNU and radiation therapy in Glioblastoma Multiforme. *Neurology (Minneap)* 24: 465–471, 1974.
- 46– Wilson, C.B., Wheeler, K., Levin, V.A., Rosenblum, M., Brain Tumor Chemotherapy: Translation of Laboratory Experiments into Clinical Trials. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* 101: 214–216, 1976.

- 47- Wilson, C.B., Barker, M., and Slagel, D E Tumors of the Central Nervous System in Monolayer Tissue Arch Neurol 15: 275-282, 1966.
- 48- Young, J.S., Miller, R.W.: Incidence of malignant tumors in US children. J Pediat. 86: 254, 1975.
- 49- Zimmerman, H.M. The Histopathology of Experimental 'Medulloblastoma'. Acta Neuropath. 8: 69-75, 1967.
- 50- Zimmerman, A-M., Padilla, G.M., Cameron, I., L. Drugs and the Cell Cycle, pp. 220-227, Academic Press. New York and London, 1973.
- 51- Zülch, K.J. and Wechsler, W. Pathology and Classification of Gliomas. in: Progress in Neurological Surgery, pp: 32-42, Vol: 2 Edited by H.Krayenbühl, P.E Maspes and Sweet, W.H., Karger, Basel, 1968.

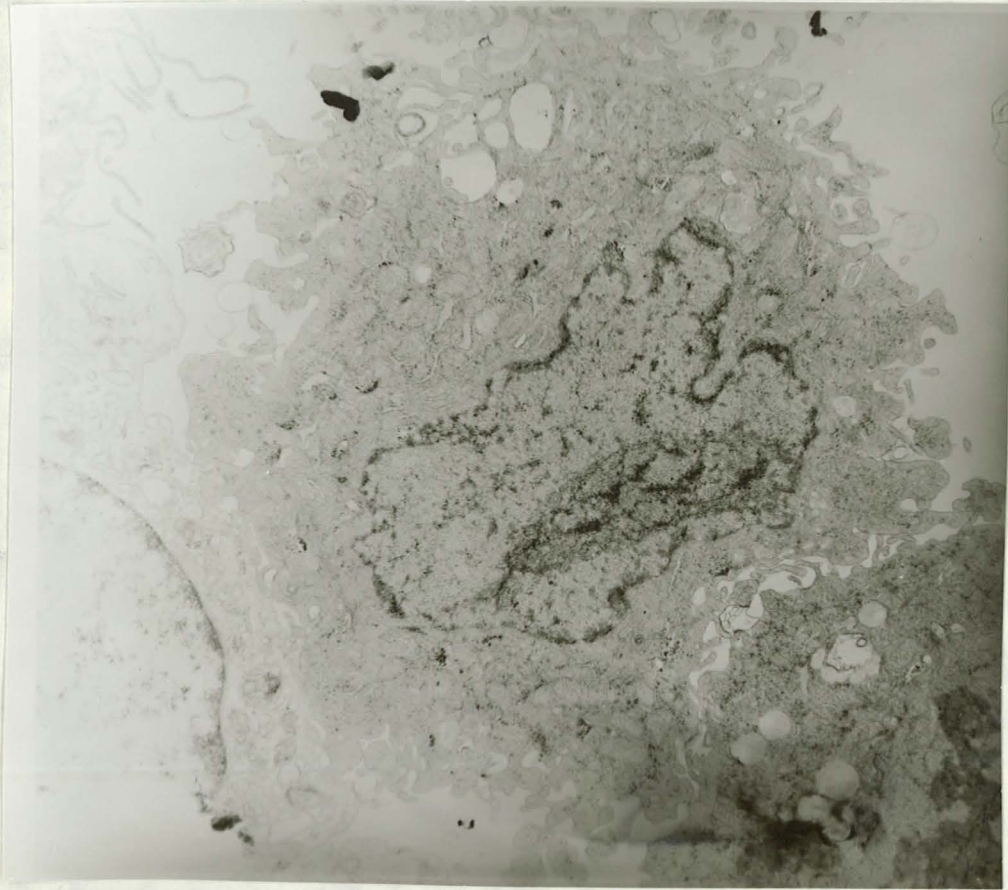


RESİM I
KONTROL OLARAK KULLANILAN BOWI İLE KARŞILAŞTIRILMAMIŞ
9 L TÜMÖR HÜCRELERİNİN GÖRÜNÜMÜ EMx 6700



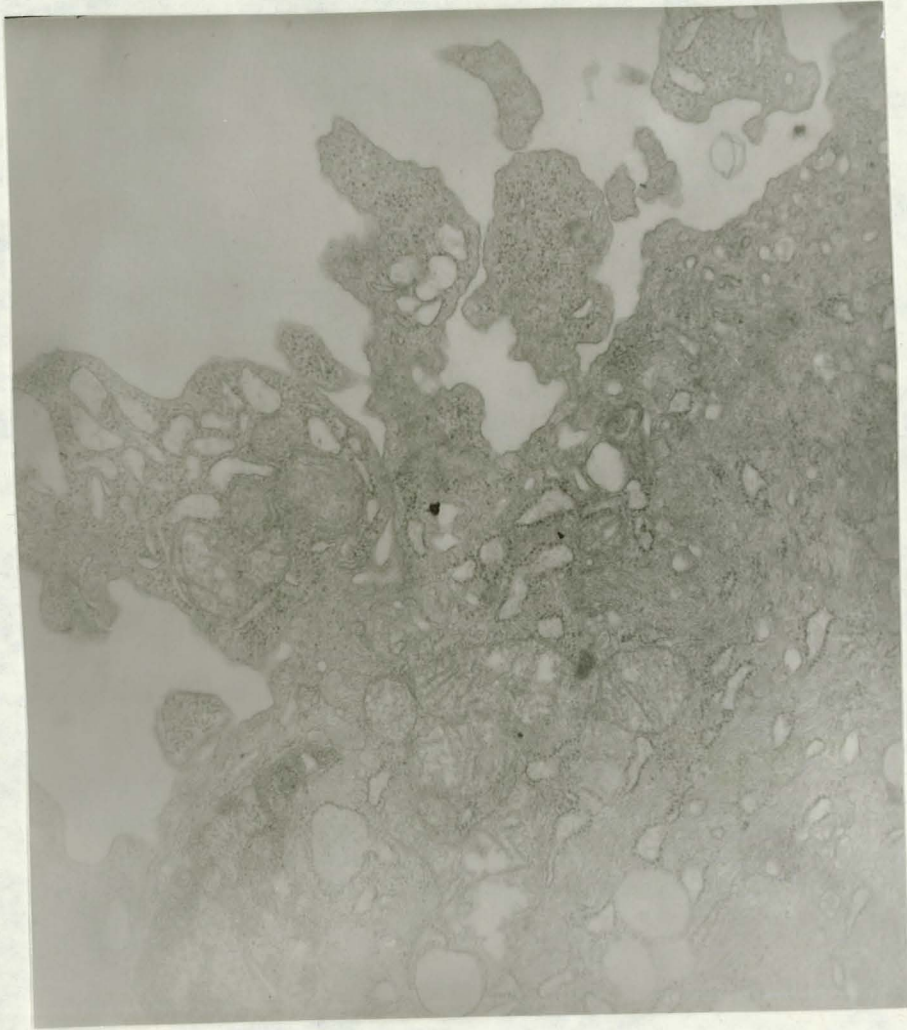
RESİM II

• 10 µg/ml BCNU İLE KARŞILAŞTIKTAN BİR SAAT SONRA
9 L TÜMÖR HÜCRESİNİN GÖRÜNÜMÜ EMx6700



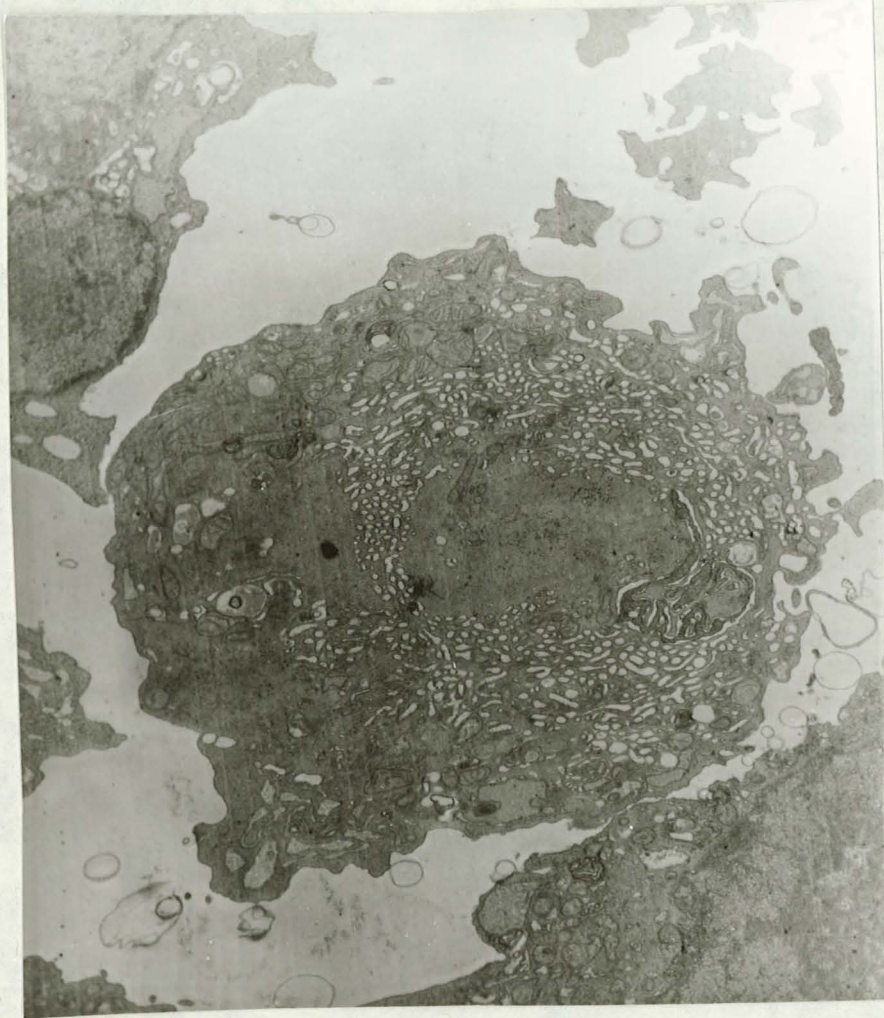
RESİM III

• 20 µg/ml BCNU İLE KARŞILAŞTIKTAN BİR SAAT SONRA
9 L TÜMÖR HÜCRESİNİN GÖRÜNÜMÜ EMx 6700



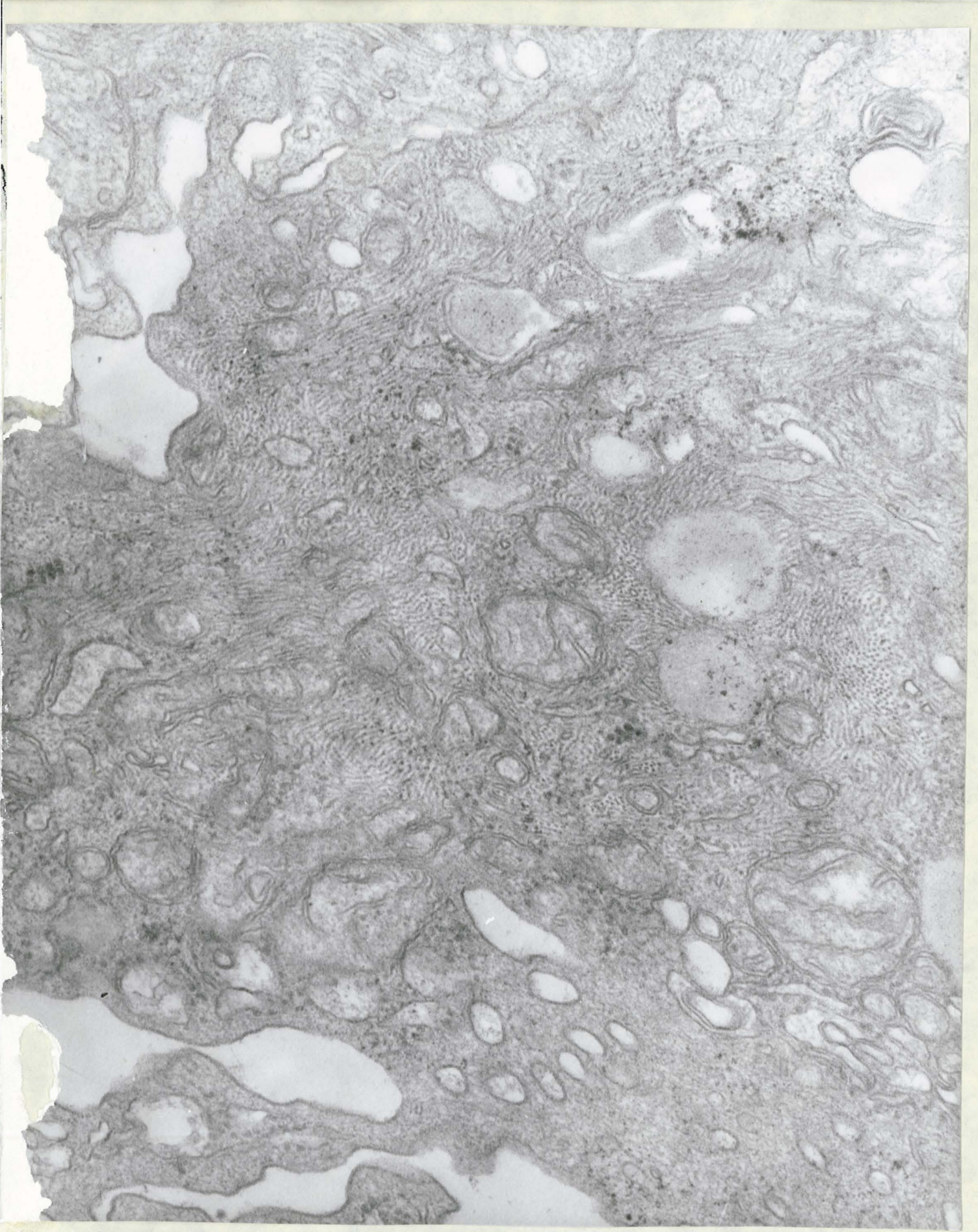
• RESİM IV

• 40 µg/ml BCNU İLE KARŞILAŞTIKTAN BİR SAAT SONRA
9 L TÜMÖR HÜCRESİNİN GÖRÜNÜMÜ EMx 8900



RESİM V

60 $\mu\text{g/ml}$ BCNU İLE KARŞILAŞTIKTAN BİR SAAT SONRA
9 L TÜMÖR HÜCRESİNİN GÖRÜNÜMÜ EMx 3500



RESİM VI

80 ug/ml BCGU İLE KARŞILAŞTIKTAN BİR SAAT SONRA
9 L TÜMÖR HÜCRESİNİN GÖRÜNÜMÜ EMx 22200