

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

JAR VE JEG-3 KORYOKARSİNOM İNSAN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
LİPOZOMAL DOKSORUBİSİN VE KAROTEN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dr. Seyit Ahmet EROL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet İbrahim HARMA

Zonguldak 2016

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

JAR VE JEG-3 KORYOKARSİNOM İNSAN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE
LİPOZOMAL DOKSORUBİSİN VE KAROTEN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Dr. Seyit Ahmet EROL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet İbrahim HARMA

Zonguldak 2016

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı :JAR ve JEG-3 Koryokarsinom İnsan Hücre Kültüründe Lipozomal Doksorubisin ve Karoten Etkisinin İncelenmesi

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Seyit Ahmet EROL

Tez Savunma Tarihi : 26/02/2016

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Mehmet İbrahim HARMA

Prof.Dr. Mehmet İbrahim HARMA
Jüri Başkanı



Prof.Dr. Hasan KAFALI



Doç.Dr. Aykut BARUT

UYGUNDUR



Prof.Dr. Tanrı BAYRAKTAROĞLU
Dekan

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince klinik bilgisi, tecrübesi ve cerrahisi ile, özgüvenli ve el becerisi iyi bir uzman olarak yetişmemi sağlayan, tezimin seçilmesi, yürütülmesi ve şekillenmesinde hoşgörü ve sabrıyla bana destek olan, ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum tez danışmanım değerli hocam, anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet İbrahim HARMA' ya çok teşekkür ederim. Her konuda yardımını, bilgisini ve zamanını esirgemeyen, hekimliğin bilgi kadar sevgiyle de yapılması gereken bir iş olduğunu bizlere yaşatarak öğreten, anne şefkatini eğitimime yansıtan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Müge HARMA' ya, mesleğimi öğrenmem, sevmem ve cerrahi beceri kazanmam konusunda desteklerini hiçbir zaman eksiltmeyen Sayın Prof. Dr. Ülkü ÖZMEN' e, bilgi, emek ve deneyimleriyle her konuda sonsuz destek olan değerli hocam Sayın Doç. Dr. Aykut BARUT' a, hekimlik hayatımda doğru yolda kalmam konusunda tecrübe ve bilgi birikimi ile yol gösteren Sayın Doç. Dr. İlker ARIKAN' a, desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ahmet ŞAHBAZ ve Yrd. Doç. Dr. Öner AYNIOĞLU' na çok teşekkür ederim.

İmmünoloji kliniğinin tüm imkanlarıyla, büyük emeklerle tezimin laboratuvar aşamasının gerçekleşmesini sağlayan Sayın Doç. Dr. İshak Özel TEKİN' e, tezimin istatistik aşamasında çalışmama yaptığı değerli katkılarından dolayı Öğr. Gör. Mustafa Çağatay BÜYÜKUYSAL' a, araştırma için gerekli maddi olanakları sağlayan BEÜ Bilimsel Araştırmalar Birimine teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma, iyi bir ekip olarak çalıştığımız tüm hemşire arkadaşlarıma, personel ve bölüm sekreterlerimize teşekkür ederim.

Bu günlere gelirken hayatımın her anında hep yanımda olan, bana zorluklarla başatmayı öğreten canım anneme, babama, kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Varlığı ile hayatın güzel ve yaşanabilir olduğunu hatırlatan, mutluluk kaynağım, yol arkadaşım, biricik sevgili eşim Dr. Gözde EROL' a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Dr. Seyit Ahmet EROL
ZONGULDAK, 2016

ÖZET

Seyit Ahmet Erol, JAR ve JEG-3 Koryokarsinom İnsan Hücre Kültüründe Lipozomal Doksorubisin ve Karoten Etkisinin İncelenmesi, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tezi, Zonguldak 2016.

Amaç: Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar, insanda plasentadan gelişen bir grup hastalıktır ve koryokarsinom bunların malign formudur. Etiyolojisinde, retinoik asit eksikliği ve A vitamini alımının azlığının, hastalık riskini arttırdığı çeşitli çalışmalarda saptanmıştır. Medikal tedavide, hastalığın evresine göre, tek başına veya kombine kemoterapotik ajanlarla uygulanan pek çok tedavi rejimi bulunmaktadır. Doğal bir antioksidan olan Karoten'in peroksit radikallerinin yakalanması ve detoksifikasyonunda rol alarak özellikle kimyasal karsinogenezde koruyucu rol aldığı bilinmektedir. Karoten' in hücre çoğalmasını azaltıcı, apoptozu uyarıcı, invazyonu inhibe edici etkileri bildirilmiştir. Lipozomal doksorubisin antrasiklin türevi kemoterapötiktir, hidrokloridin pegile lipozomlar içerisine gömülmesiyle oluşturulmuş uzun salınımlı bir formülasyondur. DNA içine enterkalasyon yapar, transkripsiyon esnasında DNA'nın açılmasını sağlayan Topoizomeraz II enziminin ilerlemesini ve DNA ikili sarmalının tekrar birleşmesini engeller. Bu formül artmış kardiyak riskli metastatik meme kanseri hastalarında, platinum bazlı kemoterapinin başarısız olduğu ileri evre over kanseri olgularında ve kaposi sarkomu ile ilişkili kazanılmış immun yetmezlik sendromlarında kullanılır. Ayrıca multipl myelom, mide, akciğer, tiroid, mesane kanserikemoterapi rejimleri içerisinde yer almaktadır.

Çalışmamızın amacı, farklı hücre kültürü modelleri (JAR, JEG) kullanılarak Lipozomal Doksorubisin ve Karoten'in tek başına veya kombine kullanıldığında, koryokarsinom tedavisindeki etkinliğinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: İnsan koryokarsinom benzeri JAR ve JEG-3 hücrelerin RPMI-1640 ortamında %10 fetal dana serumu, penisilin-steptomisin varlığında 37°C, %95 hava, %5 CO₂ içeren atmosferde çoğaltıldı. Lipozomal Doksorubisin (LD) ve Karoten'in uygulama grupları aşağıdaki gibi belirlendi;

Tek ilaç uygulaması için LD'nin 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml; Karoten'in 1 µg/ml'lik, 5 µg/ml'lik ve 10 µg/ml'lik dozları kullanılmıştır.

LD ve Karoten kombinasyonunda; LD'nin 1 µg/ml'lik, 2 µg/ml'lik ve 5 µg/ml'lik, dozları ile Karoten'in 5µg/ml'lik dozu kullanılmıştır.

Maddeler hücrelere aynı anda verilmiştir. İlaç uygulamasını izleyen 72. saatte hücreler Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) solüsyonu ile kaldırılıp, apopitoz çalışmasına alınmıştır. Bu çalışmada JAR ve JEG-3 hücrelerinde apoptozun derecesi Flowsitometri (FCM) ile belirlenmiş, sadece bir set için tripsin öncesi süpernatant toplanıp, β-hCG ve h-hCG ölçümü için derin dondurucuda saklanmıştır. İmmünoenzimatik yöntemle β-hCG ve h-hCG ölçümü literatürde ilk kez birlikte yapılmıştır. SPSS 19.0 ve Minitab 17 istatistik programları kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır.

Bulgular: Yaptığımız çalışmada Karoten'in tek başına artan dozlarda kullanıldığında JAR hücre serileri üzerinde ki apoptotik etkilerinin istatistiksel olarak arttığı ancak JEG-3 hücre serileri üzerinde ki apoptotik etkilerinin istatistiksel olarak artmadığı görülmüştür. LD'nin tek başına artan dozda ve bu iki ilacın kombine edilip Karoten dozu sabit tutulurken LD'nin dozu arttırılarak kullanıldıklarında JAR ve JEG-3 hücre serisi üzerinde apoptotik etkilerinin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür.

Sonuç: İnsan Koryokarsinom hücre hattı modelleri olan JAR ve JEG-3 üzerinde LD ve Karoten'in tek ajan ve kombine kullanımları ayrıca immünoenzimatik yöntemle β-hCG ve h-hCG ölçümü, her iki hücre hattında birden literatürde ilk kez yapılmıştır. Elde edilen sinerjistik apoptotik veriler LD ve Karoten'in Koryokarsinom tedavisinde karşılaşılan çoklu ilaç direnciyle mücadelede kullanılabilecek seçeneklerden biri olabileceğini göstermektedir. Ancak ilaçların etkileri ve kombinasyonlarındaki etkilerin in vivo sistemlerde farklı olabileceğinden, veriler ilk olarak hayvan deneyleri ve sonra klinik araştırmalarla da desteklenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Lipozomal doksorubisin, karoten, koryokarsinom, kemoterapi, hücre kültürü, apopitoz

ABSTRACT

Seyit Ahmet Erol, The examination of the effect of Liposomal Doxorubicin and Carotene on JAR and JEG-3 choriocarcinoma human cell culture models, Bülent Ecevit University Faculty of Medicine Obstetrics and Gynecology Department of the Thesis. Zonguldak 2016.

Aim: Gestational trophoblastic diseases are the group of diseases that originates from human placenta and choriocarcinoma which is the malignant form. In several studies it is showed that retionic acid and vitamin A deficiency increase the risk of this disease at the etiology of these diseases. There are many medical treatment methods with single or combined chemotherapeutic agents, depend on stage of the disease. Taking part in the capture and detoxification of peroxide radicals, carotene is a natural antioxidant known to particularly protective role in chemical carcinogenesis. Carotene in reducing cell proliferation, stimulating apoptosis, invasion inhibitory effects has been reported.

Liposomal Doxorubicin is an anthracycline derivated chemotherapeutic that hydrochloride pegylated liposomes formed by buried in extended-release formulation. It makes intercalation into DNA, blocks the progression of the enzyme topoisomerase II and providing the opening of the DNA during transcription rejoining of DNA double helix. This formula is an increased cardiac risk in patients with metastatic breast cancer, who have failed platinum-based chemotherapy in advanced stage ovarian cancer and is used in cases of Kaposi's sarcoma associated with acquired immune deficiency syndrome. In addition, multiple myeloma, stomach, lung, thyroid, bladder cancer is located within the chemotherapy regimens.

The aim of our study is research the effectiveness of single agent use and combined chemotherapy with Liposomal Doxorubicin and Carotene on JAR and JEG-3, human choriocarcinoma cell line models for treatment of choriocarcinoma.

Materials and Methods: Human choriocarcinoma like JAR and JEG-3 cells were cultured at conditions 37°C, O₂ 95%, CO₂ 5% in RPMI-1640 environment that include 10% fetal bovine serum, penicillin-streptomycin. Liposomal Doxorubicin (LD) and Carotene trial groups are determined as shown below;

For single drug trial; LD 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml; Carotene 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml dosages were maintained.

For the combination of LD and Carotene; LD 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml dosages were maintained with Carotene 5 µg/ml dosage.

Drugs were given to the cells at the same time. Following drug administration at the 72nd hour the cells were detached by the Trypsine- Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) solution. The degree of apoptosis was obtained by flow cytometry (FCM). Supernatant was collected before trypsin application for only one set, and stored in deep-freeze to investigate β-hCG and h-hCG levels. β-hCG and h-hCG levels were investigated by immunoenzymatic method. SPSS 19.0 and Minitab 17 programmes were used to make statistical analysis.

Findings: We observed that in our study Caroten's single application with increasing dosages cause to statistically significant increase of apoptosis ratios on the JAR cell lines but statistically significant increase of apoptosis ratios on the JEG-3 cell lines hasn't shown. We showed that there's been increase of apoptosis ratios on the both of JAR and JEG-3 cell lines when we apply the fixed dose of Carotene with the increasing dosages of LD.

Result: The single or combined application of LD and Carotene on the JAR and JEG-3 human choriocarcinoma cell line models, also β-hCG and h-hCG with immunoenzymatic method measured, is made in both cell lines for the first time in the literature. The obtained synergistic apoptotic data indicated that; the combination of LD and Carotene could be used as one of the options in the struggle against multi-drug resistance encountered in the treatment of choriocarcinoma. However, the effect of the drugs with single application and with combination methods may be different in vivo systems, therefore the data should be supported initially by animal experiments and then clinical trials.

Key words: Liposomal doxorubicin, carotene, choriocarcinoma, chemotherapy, cell culture, apoptosis

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. GTH'larda Epidemiyoloji.....	3
2.2. GTH'larda Genetik Özellikler	4
2.3. GTH'larda Patolojik Bulgular ve Etiyopatogenez	5
2.4. GTH'larda Hormonal aktivite	6
2.5. Tedavide Boşaltım Sonrası Profilaktik Kemoterapi.....	6
2.6. Boşaltım Sonrası İzlem	7
2.7. GTH'larda Sınıflama ve Evrelendirme	7
2.8. Gestasyonel Trofoblastik Neoplazilerde Tedavi.....	10
2.8.1. Kemoterapi ve Radyoterapi	11
2.9. Tedavi Sonrası	13
2.10. Lipozomal Doksorubisin	14
2.11. Karoten	16
2.12. Hücre Kültürü.....	18
2.12.1 Başlıca Hücre Kültür Tipleri.....	19
2.12.1.1 Primer Kültürler	19
2.12.1.2 Sürekli Kültürler	20
2.13. Sitotoksisite.....	20
2.14. Apoptoz	21
2.15. Flowsitometri.....	21

3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	23
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	23
3.3. Kullanılan Aletler	25
3.4. JAR ve JEG-3 Hücre Kültürleri	25
3.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması	27
3.5.1. Lipozomal Doksorubisin dozunun hazırlanması.....	27
3.5.2. Karoten dozunun hazırlanması.....	27
3.6. Yöntem.....	27
3.6.1. Hücre hatlarının kültüre edilmesi	27
3.6.2. Kemoterapötiklerin testler için hazırlanması, β -HCG ve h-HCG ölçümü	27
3.6.3. Annexin V yöntemi ile apoptoz tespiti ve istatistiksel analiz	28
4. BULGULAR	30
4.1. Karoten'in JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri.....	30
4.2. Karoten'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri.....	32
4.3. LD'nin JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri	34
4.4. LD'nin JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri	35
4.5. Karoten ile Birlikte Kullanılan LD'nin JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri	37
4.6. Karoten ile Birlikte Kullanılan LD'nin JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri	40
4.7. Tek Başına ve Karoten ile Birlikte Kullanılan LD'nin JEG Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkilerinin Karşılaştırılması	42
4.8. Tek Başına ve Karoten ile Birlikte Kullanılan LD'nin JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkilerinin Karşılaştırılması	43
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ	50
7. KAYNAKÇA	51
8. EKLER	67
Ek 1: Etik kurul kararı	67

KISALTMALAR LİSTESİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Act-D	: Aktinomisin-D
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
APL	: Akut Promiyelosit Lösemi
ATRA	: All-trans retinoik asit
β	: Beta
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
DHFR	: Dihdrofolat Redüktaz
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EMA-CO	: Etoposid, Metotreksat, Aktinomisin-D, Siklofosamid, Vinkristin
FA	: Folinik Asit
FCM	: Flow Sitometri
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FIGO	: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
GTH	: Gestasyonel Trofoblastik Hastalık
GTN	: Gestasyonel Trofoblastik Neoplazi
hCG	: Human Koryonik Gonadotropin
h-hCG	: Hiperglikolize Human Koryonik Gonadotropin
hPL	: Human Plasental Laktojen
HM	: Hidatidiform Mol
LD	: Lipozomal Doksorubisin
KT	: Kemoterapi
KS	: Kaposi Sarkomu
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTX	: Metotreksat
NCI	: Amerikan Milli Kanser Derneği
PLD	: Pegile Lipozomal Doksorubisin

- PS** : Fosfatidilserin
- PYBGTT** : Plasental Yerleşim Bölgesinden Gelişen Trofoblastik Tümör
- RNA** : Ribonükleik Asit
- RPMI** : Roswell Park Memorial Institute
- RT** : Radyoterapi
- SPSS** : Statistical Package for the Social Sciences
- 9-cis RA** : 9-cis retinoik aist

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. DSÖ Histolojik Sınıflama Sistemi.....	8
Tablo 2. 2000 FIGO Evrelendirmesi	8
Tablo 3. GTH için DSÖ/FIGO prognostik skorlama sistemi	9
Tablo 4. Karoten'in artan dozlarda JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı	30
Tablo 5. Karoten verildiğinde JEG-3 hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri ..	31
Tablo 6. Karoten'in artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı	32
Tablo 7. Karoten verildiğinde JAR hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri.....	33
Tablo 8. LD'nin artan dozlarda JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı	34
Tablo 9. LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	35
Tablo 10. LD verildiğinde JEG-3 hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri.....	35
Tablo 11. LD'nin artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı	36
Tablo 12. LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	37
Tablo 13. LD verildiğinde JAR hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri.....	37
Tablo 14. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı.....	38
Tablo 15. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	39
Tablo 16. Karoten ile birlikte LD verildiğinde JEG-3 hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri	39
Tablo 17. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı.....	40

Tablo 18. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	41
Tablo 19. Karoten ile birlikte LD verildiğinde JAR hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri	42
Tablo 20. Tek başına ve Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	43
Tablo 21. Tek başına ve Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	44

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. LD 'nin formülü.....	14
Şekil 2. Karoten'in kimyasal yapısı	16
Şekil 3. JAR ve JEG-3 hücre kültürlerini içeren flasklar ve hücre kültür plakları	24
Şekil 4. 24 kuyucuklu hücre kültür plağı	24
Şekil 5. Flowsitometri	24
Şekil 6. Nüve CO ² inkübatörü.....	25
Şekil 7. JAR hücre kültürü mikroskopik görünümü	26
Şekil 8. JEG-3 hücre kültürü mikroskopik görünümü	26
Şekil 9. Karoten'in JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi	30
Şekil 10. Karoten verildiğinde JEG-3 hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri ...	31
Şekil 11. Karoten'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	32
Şekil 12. Karoten verildiğinde JAR hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri	33
Şekil 13. LD'nin JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	34
Şekil 14. LD verildiğinde JEG-3 hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri.....	35
Şekil 15. LD'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	36
Şekil 16. LD verildiğinde JAR hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri.....	37
Şekil 17. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	38
Şekil 18. Karoten ile birlikte LD verildiğinde JEG-3 hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri.....	39
Şekil 19. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	40
Şekil 20. Karoten ile birlikte LD verildiğinde JAR hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri.....	41
Şekil 21. Tek başına ve Karoten ile birlikte kullanılan LD'in JEG-3 hücre hattı üzerine apoptotik etkilerinin grafiksel karşılaştırılması.....	42

Şekil 22. Tek başına ve Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JAR hücre hattı üzerine apoptotik etkilerinin grafiksel karşılaştırılması.....	43
--	----

1. GİRİŞ

Gestasyonel trofoblastik hastalıklar (GTH) tanım olarak fetal koryondan kaynaklanan birbiri ile ilişkili hastalıkları ifade etmekte olup genellikle hastalığın spontan gerilemesi ile sonuçlanan, benign mol hidatidiformdan (HM), hayatı tehdit eden koryokarsinoma kadar değişkenlik gösteren geniş bir spektruma sahiptirler (1).

Histopatolojik olarak komplet ve parsiyel HM, invaziv mol, koryokarsinom, plasental yerleşim bölgesinden köken alan trofoblastik tümörler (PYBGTT) olarak sınıflandırılırlar. Gestasyonel trofoblastik neoplaziler (GTN) genellikle HM sonrası gelişebildikleri gibi terapötik veya spontan abortus, ektopik ya da term gebeliği de takiben gelişebilmektedirler. Bir GTN olan koryokarsinom, yüksek metastatik potansiyeli olan neoplastik bir durum iken HM, malign dönüşüm ihtimali bulunan anormal plasenta yapısına sahiptir (3; 4). Gebeliği takiben gelişen koryokarsinom ve PYBGTT'ler gerçek neoplazmlardır.

Kemoterapinin (KT) etkin olması, human koryonik gonadotropinin (hCG) beta (β) subünitinin hassas olarak ölçülebilmesi ve tümör belirteci olarak kullanılması sayesinde günümüzde GTN'ler hastalığın yaygın olduğu durumlarda dahi tedavi edilebilmektedir. Koryokarsinomada üretilen hCG normal gebelikte sentezlenen hCG'den daha büyük oligosakkarid yan zincirine sahip olduğundan hiperglikozile hCG olarak adlandırılır. Hiperglikozile hCG gelecekteki çalışmalarda kullanılabilecek bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir (2)

Kimyasal olarak Karoten, A vitamininin doğal bir derivesi olup, hayvansal (retinoidler) ve bitkisel (karotenoid provitamin) gıdalarla vücuda alınır. Yaygın form olan beta (β) karoten ince bağırsak mukozasında yıkıma uğrayıp bir tür A vitamini olan retinole dönüşür. A vitamininin antineoplastik etkinlik gösterdiği düşünülmektedir. Epitelyum hücreleri yanında diğer hücrelerin de normal büyümesinde ve farklılaşmasında rol oynadıkları ve kimyasal etkenlere, radyasyona ve virüslere bağlı kanser oluşmasını antioksidan etkileri ile önledikleri gösterilmiştir (4; 5).

β -karoten'in retinol türevi olan Retinoik asitin; All-trans retinoik asit (ATRA) ve 9-cis retinoik asit (9-cis RA) olmak üzere iki formu vardır (6). Retinoik asit türevleri olan ATRA ve 9-cis RA gen transkripsiyonunun regülatörleri olup hücre

proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli roller oynamaktadırlar. Retinoik asitin anjiogenezde de hücre proliferasyonunu ve gen ekspresyonunu düzenleyerek apoptozu indüklemek ve anjiogenezisi inhibe etmek şeklinde etkileri vardır (7; 8).

Doğal bir antioksidan olan β -karoten'in peroksit radikallerinin yakalanması ve detoksifikasyonunda rol alarak özellikle kimyasal karsinogenezde koruyucu rol aldığı bilinmektedir. Bu aktivitesi sayesinde serbest radikalleri tutan bir ajan olarak hareket eder, hücre ve değişik dokulardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu önler. İlaç veya gıda takviyesi olarak kullanılmasının kanser önleyici etkisi hala tartışmalıdır (9). Sentetik β -karoten kullanımında akciğer ve prostat kanseri oranının arttığı ve bu artışın sigara içenlerde ölüm oranını artırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar doğal olarak β -karoten bulunduran besinlerin tüketiminde ise görülmemiştir (9).

Lipozomal doksorubisin antrasiklin türevi kemoterapotik ajandır. Lipozom içine kapsüllenmiş bir doksorubisin biçimidir. Daha az kardiyotoksiktir. DNA içine enterkalasyon yapar, transkripsiyon esnasında DNA'nın açılmasını sağlayan Topoizomeraz II enziminin ilerlemesini engeller. DNA replikasyonu sırasında topoizomerazın DNA'yı kesmesinin ardından meydana gelen topoizomeraz-DNA kompleksini stabilize ederek DNA replikasyonunu durdurur (10; 11). Doksorubisinle karşılaştırıldığında, aktif neoanjiogenez gösteren tümör dokularında daha fazla ve uzun süreli birikim göstermesi, kardiyak ve miyelosüpresif yan etkilerin ise nadir izlenmesi nedeniyle, başlıca agresif seyirli non-Hodgkin lenfoma, dirençli over ve meme kanserleri ve AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomunun tedavisinde kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (12). Öte yandan, LD tedavisine bağlı akral eritrodisestezi, intertrigo-benzeri erüpsiyon, yaygın folliküler erüpsiyon, stomatit ve yeni melanotik maküllerin oluşumu gibi sık rastlanan ve doza bağımlı olarak gelişen mukokütanöz yan etkiler bildirilmektedir (13). Doksorubisinin lipozomal formunun mukokütanöz yan etkilerinin çözünebilir forma göre daha fazla çeşitlilik gösterdiği görülmektedir. Bu durum, LD'nin uzun yarı ömrü nedeniyle deride daha fazla birikim göstermesine bağlanabilir (14).

Bu çalışmanın amacı, koryokarsinom tedavisinde yeni bir protokol geliştirmek amacıyla Karoten, Lipozomal Doksorubisin ve kombine KT'lerinin hücre kültüründe geliştirilen koryokarsinom modelleri oluşturulmuş hücre kültürleri üzerindeki etkileri ve tedavi etkinliklerini araştırmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. GTH'larda Epidemiyoloji

GTH insidansı ile ilgili veriler dünyanın değişik bölgelerinde farklılıklar göstermektedir. Örnek olarak Japonya'da molar gebelik insidansı bin gebelikte 2, Avrupa ve Kuzey Amerika'da ise bin gebelikte 0.6 ile 1.1 arasında değişmektedir (17; 18). Etnik, çevresel ve kültürel faktörlerin insidans üzerine olan etkileri araştırılmış ve çevresel ve kültürel faktörlerin, irksal faktörler kadar önemli olabileceği gösterilmiştir (18). Türkiye'de yapılan çalışmalar hastane verilerine dayalı olduğu için gerçek insidans hakkında bilgi sahibi olmak güçtür. Özalp ve ark.larının çalışmasına göre Türkiye'de HM insidansı 1000 doğum için 1.1 ile 12.1, 1000 gebelik için ise 0.3 ile 18 arasındadır (15). Türkiye'de toplumsal kaynaklı başka bir çalışmaya göre ise; insidans 1000 canlı doğum için 0.8, 1000 gebelik için ise 0.6 olarak saptanmıştır (16). Başka bir çalışma ise bölgesel farklılığa dikkat çekmektedir. Ülkemizde GTH güneydoğu anadoluda bulunan Şanlıurfa ilinde 1000 doğumda 12.1 oranıyla insidansın en fazla olduğu ildir (19).

Molar gebelik gelişmesi için HM öyküsü risk faktörüdür. Bir kez HM geçirmiş bir kadında hastalığın nüks etme sıklığının yaklaşık 10 kat arttığı saptanmıştır (22). Molar gebelik geçirenlerde bir sonraki gebeliğinde mol gelişme olasılığı %1.1 olarak saptanmıştır (23). Ayrıca geçirilen molar gebelik sayısı arttıkça risk de orantılı olarak artmaktadır. Türkiye'de yapılan bir çalışmada yedi kere tekrar eden HM olgusu yayınlanmıştır (24).

Molar gebelik gelişiminde rol oynayan en önemli risk faktörlerinden biri anne yaşıdır. Yirmi yaş altı gebeliklerde görülen minimal insidans artışı 35 yaş üzerindeki gebeliklerde belirgin hale gelmektedir. Doğurganlığın erken ve geç yaşlarında görülen HM'de malignite riski artmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da doğurganlığın erken ve geç yaşlarında hastalığın insidansında belirgin farklar olduğu saptanmıştır (20). HM olgularının %0.3-1.6, 21 yaşın altında ve %1.7-23.1'i, 39 yaşın üzerinde olarak saptanmıştır (20). Nadiren HM postmenapozal dönemde de karşımıza çıkmaktadır (21).

Koryokarsinomda ırk, yaş, geçirilmiş HM, oral kontraseptifler, gebelik sayısı, östrojen, kan grubu antijenleri gibi risk faktörleri tanımlanmıştır. Koryokarsinomda en önemli risk faktörü geçirilmiş molar gebelik öyküsüdür (25). Koryokarsinom olgularının

%29-83'ünün öyküsünde HM olduğu saptanmıştır (26). Olguların önemli bir bölümünün öyküsünde de normal gebelik ya da spontan abortus vardır ve koryokarsinomun %9-42 arasında değişen oranlarda spontan abortuslardan sonra geliştiği saptanmıştır (27). Türkiye'de 6 merkezde 10 yılda 351650 doğum incelenerek yapılan çalışmaya göre tekrar eden mol oranı %1.1 olarak saptanmıştır (23).

Literatürde hastalığa beslenme ve diyetin olan etkileri incelendiğinde, HM tanısı almış olan hastaların serumunda vitamin B12 seviyesi kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmalarda 247.21'e 180.32 pg/mL olmak üzere belirgin olarak yüksek, folat seviyesi 7.91'e 10.72 ng/mL olmak üzere düşük, homosistein seviyesi ise 10.58'e 8.79 nmol/mL olmak üzere yüksek bulunmuştur (28). Bir başka çalışmada serum çinko seviyesi 86.3'e 68.7 µg/l olmak üzere yüksek, serum bakır seviyesi ise 123.8'e 147.8 µg/l olmak üzere düşük bulunmuştur (29). İtalya ve Amerika'daki vaka kontrollü çalışmalarda ise karoten eksikliğinin molar gebelik insidansını artırabileceği öngörülmüştür (30; 31). Ayrıca molar gebelik insidansının yüksek olduğu bölgelerde, A vitamini eksikliğinin insidansının da arttığı saptanmıştır. Diyetel faktörler de GTH insidansındaki bölgesel farklılıkları kısmen açıklayabilmektedir.

2.2. GTH'larda Genetik Özellikler

Yapılan sitogenetik çalışmalar sonucunda komplet molün diploid karyotipik yapıda olduğu ortaya konulmuştur. Yaklaşık %75-85'i 46XX, geriye kalan kısmı 46XY yapısındadır. Diandrik diploidinin oluşumunda pek çok mekanizma öne sürülmektedir. Genel kabul gören iki mekanizmadan biri nükleussuz ya da boş bir ovumun iki haploid sperm ile fekundasyonu ile 46 XX ya da 46 XY şeklinde bir heterozigot molün ortaya çıkmasıdır. Diğer bir mekanizma nükleussuz veya boş bir ovumun bir tek haploid sperm ile birleşmesi, takiben bu kromozomların duplike olmasıdır. Bunun neticesinde bütünüyle homozigot 46XX bir yapı oluşur.

Parsiyel molde genoma, iki paternal bir maternal yapının katıldığı gösterilmiştir. Bu durum diandrik triploidi olarak adlandırılır ve fazla haploid komponent paternal kaynaklıdır (32). Parsiyel moller genellikle 69 XXX, 69 XXY veya 69 XYY karyotip yapıya sahip olan triploiddirler.

2.3. GTH'larda Patolojik Bulgular ve Etiyopatogenez

Makroskopik olarak bakıldığında komplet mol üzüm salkımına benzemektedir. Fetus veya embriyo görülmez. Çapı 1 mm'den 2 cm'ye kadar değişen avasküler yapıda, düz, şeffaf, gri ya da pembe hidropik veziküller karakteristiktir. Bu veziküller ince bağ dokusundan oluşan yapılarla birbiriyle ilişkilidirler. Mikroskopik değerlendirme aşamasında üç önemli ölçüt vardır. Bunlar: trofoblastik proliferasyon, villuslarda hidropik şişme ve avaskülarizasyondur. Bunların yanında komplet ve parsiyel mol ayırımında, parsiyel molün immünohistokimyasal olarak p57 ile boyanması da ayırt edici yardımcı tekniklerdendir (34). Plasenta, amniotik kese ve amniotik sıvı tanımlanamaz ve intervillöz saha tipik olarak anormaldir. Ancak bazı olgularda amnion izlenmiştir (35; 36).

Parsiyel molde fetus veya embriyo ve embriyonik membranlar vardır. Histolojik yapı genellikle mozaiktir, yani hidropik villuslarla birlikte hidropik olmayan villuslar da gözlenir. Parsiyel molde ayrıca fetal damarlar, bazen de fetal eritrositlerin gözlenebilmektedir (33).

İnvaziv mol myometriuma invaze olan komplet moldür. Molar hücreler sütunlar ya da plaklar şeklinde myometriuma ilerler ve kan damarlarını invaze ederek o bölgede kanamaya neden olur. Bazı olgularda ise molar doku vücudun başka bölgelerine metastaz yapabilir. İnvaziv molün histolojik kriterleri komplet mol ile aynıdır (33).

Koryokarsinomun histolojisinin tipik görünümü trofoblastik hücrelerin kolonlar halinde myometriuma doğru ilerlemesidir. Villöz yapı yoktur ve hücrelerde önemli düzeyde sitolojik atipi bulunur. Nekroz ve hemoraji tümörün belirgin özellikleridir (36).

PYBGTT'ler sıklıkla uterusu sınırlıdır ve hastalığın ileri evrelerinde metastaz yaparlar. Vakaların büyük çoğunluğunda tümör term gebeliği takiben gelişir. İntermediet yapıda ki trofoblastlardan köken alırlar. Diğer GTH'lara oranla daha az hCG salgırlar ve görece olarak human plasental lactogen (hPL) salınımı artmıştır. Bu tümörler KT'ye dirençlidirler ve olguların diğer GTH'lardan ayrı olarak rapor edilmesi kabul görmektedir (37; 38; 39). PYBGTT'ler gestasyonel trofoblastik tümörler arasında en nadir olanlarıdır

Endotelial nitrik oksid sentaz ekspresyonunun trofoblastik hücrelerin proliferasyonunda öneme sahip olduğu bilinmektedir (43). Serum nitrik oksid seviyesi ve plazma arjinaz seviyesi HM'da yüksek bulunmuştur (44; 45). Ayrıca oksidatif stresin

de HM etiopatogenezinde önemli bir rola sahip olduğu yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir (40; 41; 42). Oksidatif stresle beraber artmış Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı da HM'da izlenmektedir (46). Bu çalışmalar da GTH etiopatogenezinde oksidatif stresin önemli bir yere sahiptir.

2.4. GTH'larda Hormonal Aktivite

HCG seviyeleri GTH'ların takibinde en uygun belirteçtir (53). Serum veya idrardaki β -hCG miktarı canlı tümör hücrelerinin sayısı ile paralellik göstermektedir. Bu sayede GTH'ların izleminde hCG etkin tümör belirteci olarak rol almaktadır. Hastalığın tedavisi ile β -hCG miktarı azalmakta, rekürrenslerde ise değeri artmaktadır (54; 55).

HCG Gebelikte ve GTH'larda peptid varyantları serumda ve idrarda saptanabilen, heterojen yapıda bir moleküldür (47). Koryokarsinomada üretilen hCG normal gebelikte sentezlenen hCG'den daha büyük oligosakkarid yan zincirine sahip olduğundan hiperglikozile hCG olarak adlandırılır, hiperglikozile hCG gelecekteki çalışmalarda kullanılabilir bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir (2). Koryokarsinomda üretilen hCG molekülü gebelikte üretilen hCG molekülünden daha büyük yapıdadır (48; 49). HCG'nin biyokimyasal yapısına bakıldığında koryokarsinomada üretilen hCG'nin daha büyük oligosakkarid yan zincirine sahip olduğunu göstermektedir (50; 51; 52).

PYBGTT'lerde hücrelerin büyük kısmının hPL içerdiği tespit edilmiş, buradan hareketle bu tümörlerin belirlenmesinde hPL'nin yararlı olabileceği bildirilmiştir. Tanı anında komplet mol olgularının %2-7'sinde belirgin hipertiroidizm saptanmıştır. Molar doku tirotropin benzeri bir madde sentezlemekte bunun sonucu olarakta hipertiroidizm oluşmaktadır. (56; 57).

2.5. Tedavide Boşaltım Sonrası Profilaktik Kemoterapi

Günümüzde hastaların hCG ile izlenebilmeleri nedeniyle profilaktik KT genellikle uygulanmamaktadır. Profilaktik KT uygulaması nonmetastatik hastalık olasılığını büyük oranda azaltmakta ve metastatik hastalık riskini ortadan kalkmaktadır. Ayrıca lokal invazyon gösteren vakalarda uygulanan ek KT kürünü takiben hastaların tamamında

remisyon izlenmiştir. Bu veriler sayesinde, profilaktik KT'nin hem metastazı önlediği, hem de lokal uterin invazyona bağlı insidans ve morbiditeyi düşürdüğü sonucu çıkarılmıştır (58).

Yapılan retrospektif bir çalışmada; 1987-2006 yılları arasında analiz edilen 265 hasta içerisinde profilaktik KT uygulanan yüksek riskli hastalarda, KT almayanlara göre anlamlı bir şekilde daha düşük oranda postmolar neoplazi gelişimi izlenmiştir (59). Bununla birlikte HM'de %80 spontan remisyon gerçekleştiği için profilaktik KT verilmesi remisyonunda ki olguları da KT'nin yan etkilerine maruz bırakmaktadır. Diğer bir tedavi rejimi, metastatik ve nonmetastatik hastalık gelişimi yönünden yüksek risk altında olan olgulara tedavi verilmesidir. Bu yaklaşım özellikle hCG ile takibin mümkün olmadığı veya güvenilir olmadığı durumlarda geçerli olabilir. HM'de yüksek risk kriterleri; yüksek hCG değerleri, yaşın 18'in altında veya 35'in üzerinde olması, teka lutein kistleri bulunması, aşırı büyük uterus ve tekrarlayan HM varlığıdır (55; 60).

2.6. Boşaltım Sonrası İzlem

Molar gebelik tahliye edildikten sonra genel kabul gören izlem süresi 12 aydır (55). Boşaltım sonrasında ilk olarak haftada bir hCG tayini yapılarak üst üste üç kez negatif değer elde edilmeye çalışılır. Bu aşamadan sonra ayda bir bakılmalıdır. Uterin subinvolyusyonuna bağlı anormal uterin kanama persiste eden hastalık açısından uyarıcı olmalıdır. Klinik ve fizik muayene bulguları akciğer tutulumunu yönünden şüphe uyandırıcı ise akciğer grafisi veya tomografi ile değerlendirme yapılmalıdır (61; 62; 63).

2.7.GTH'larda Sınıflama ve Evrelendirme

Günümüzde trofoblastik hastalıklarda histolojik kriterlerin prognozu tayin edip edemeyeceği tartışması devam etmektedir. Genel olarak kabul gören görüş histolojik kriterlerin prognoz tayininde yetersiz kaldığı şeklindedir. Ayrıca her olguda histolojik tanının mevcut olmaması tedaviyi histolojik ölçütlere göre planlamayı engellemektedir. Bunlarla beraber FIGO ve DSÖ'nün evreleme sistemleri ile birlikte değişik merkezler arasında verilerin nesnel olarak karşılaştırılmasını sağlayabileceği ümit edilmektedir (64).

Tablo 1. DSÖ Histolojik Sınıflama Sistemi

1. HM
Komplet
Parsiyel
2. İnvaziv HM
3. Koryokarsinom
4. PYBGTT
5. Trofoblastik tümör (diğer)
Abartılmış plasental yerleşim bölgesi
Plasental yerleşim bölgesi nodülü veya plağı
6. Sınıflanamayan trofoblastik lezyonlar

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) histolojik sınıflaması Tablo 1'de verilmiştir (66).

Tablo 2. 2000 FIGO Evrelendirmesi

Evre I Hastalık uterusu sınırlı
Evre Ia: Risk faktörü yok
Evre Ib: Bir risk faktörü var
Evre Ic: İki risk faktörü var
Evre II Tümör uterus dışında ancak genital organlarda sınırlı (adneks, vajen, geniş bağ)
Evre IIa: Risk faktörü yok
Evre IIb: Bir risk faktörü var
Evre IIc: İki risk faktörü var
Evre III Tümör akciğerlerde; genital organ metastazı var veya yok
Evre IIIa: Risk faktörü yok
Evre IIIb: Bir risk faktörü var
Evre IIIc: İki risk faktörü var
Evre IV Tümör diğer tüm metastaz sahalarında
Evre IVa: Risk faktörü yok
Evre IVb: Bir risk faktörü var
Evre IVc: İki risk faktörü var
Risk faktörleri:
1. İdrar hCG > 100.000 miÜ/ml veya kanda hCG >40.000 miÜ/ml
2. Önceki gebeliğin terminasyonundan itibaren geçen süre >6 ay. Ayrıca aşağıdaki risk faktörlerinin varlığı da araştırılmalı ve bildirilmelidir.
a. GTH için daha önceden uygulanmış KT
b. PYBGTT (ayrı olarak bildirilmelidir)
c. Hastalığın histolojik verifikasyonu gerekli değildir.

GTH'lar için Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu'nun (FIGO) önerdiği evreleme sisteminde hastalığın anatomik lokalizasyonu esas alınmış, ayrıca iki risk faktörü değerlendirmeye eklenmiştir (Tablo 2) (65).

FIGO'nun önerdiği bu sistem, değerlendirmeye risk faktörlerinin eklenmesi ile daha yaygın kullanım alanı bulmuştur. Günümüzde genel olarak kabul edilebilecek değerlendirme ve evreleme sistemi arayışları devam etmektedir.

Tablo 3. GTH için DSÖ/FIGO prognostik skora sistemi

	0	1	2	4
Yaş	<40	≥40		
Önceki gebelik	Mol	Abort	Term	
Önceki gebelik ile KT'ye başlanması arası geçen süre (ay)	<4	4-6	7-12	>12
Tedavi öncesi serum hCG IU/l	<10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	>10 ⁵
En büyük tümör çapı (cm)	<3	3-5	≥5	
Metastaz yeri	Akciğer	Dalak, böbrek	Gastrointestinal	Beyin, karaciğer
Metastaz sayısı		1-4	5-8	>8
Önceki KT			1 ajan	>1 ajan

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından GTN için anatomik sınıflamanın dışında hazırlanmış olan prognostik skora sistemi demecuttur. Bu sınıflandırmada KT'ye karşı muhtemel bir direncin öngörülebilirliği hedeflenmiştir (Tablo 3) (65).

Koryokarsinomun histolojik tanısı tedaviyi kesinleştirse de, ilk tedavi seçeneğini değiştirmez. Histolojik inceleme ile koryokarsinom tanısı konduktan sonra hastada klinik veya radyolojik olarak ekstrauterin metastaz bulgusu mevcutsa, hasta metastatik GTN kategorisine dahil edilir. Prognostik skor 0–6 ise düşük risk, ≥7 ise yüksek risk kabul edilir. Evre I hastalar genellikle düşük risk skoruna sahip iken, Evre IV hastalar genellikle yüksek risk skoruna sahiptir. DSÖ, Evre II ve Evre III hastaların yönetiminin belirlenebilmesi, tek ajan veya multiple ajan ile KT protokollerinden hangisinin uygulanabilir olduğunun öngörülebilmesi amacı ile bu sistemi üretmiştir (65).

2.8. Gestasyonel Trofoblastik Neoplazilerde Tedavi

GTN'lerin tedavileri planlanırken en önemli parametre hCG düzeyinin takip edilmesidir. GTN'ler term gebelik, düşük, HM ya da ektopik gebelik sonrası gelişebilirler. HM sonrası KT başlama kriterlerinden birisi histolojik olarak koryokarsinom tanısının konulmasıdır. Diğer KT'ye başlama kriterleri ise hCG takip sonuçlarına göre belirlenmektedir. Birinci kriter hCG değerinin yükselmesi, ikinci kriter bir ile dört hafta dilimi boyunca hCG değerlerinde ki değişimlerin %10 oranının altında kalarak plato çizmesi, üçüncü kriter belli bir süre geçmesine rağmen hCG değerinin hala pozitif olmasıdır ancak bu süre bazı merkezlerde 6-8 hafta olarak kabul edilirken bazı merkezler tarafından 6 ay olarak belirlenmiştir. Dördüncü kriter ise belli bir zaman dilimi sonrasında hCG düzeyinin yüksek olarak saptanmasıdır. Bazı merkezler 6-8 hafta sonunda bu yüksek değeri 20.000 mİÜ/ml, bazı merkezler ise 200.000 mİÜ/ml olarak belirlemişlerdir (61).

Molar olmayan gebeliklerde ise spontan düşük, elektif gebelik terminasyonu veya term gebelik sonrası 3 ile 6 hafta geçmesine karşın hCG düzeyi hala yüksek seyrediyorsa yine koryokarsinom şüphesiz konusudur. Hastalığın yaygınlığının, mümkünse histopatolojisinin tespit edilebilmesi için tam bir sistemik değerlendirme yapılmalıdır. Detaylı fizik muayene yapılması, karaciğer, böbrek, tiroid fonksiyonlarının ve kan tablosunun tespit edilmesi gerekir. Uterin trofoblastik hastalığın varlığı pelvik muayene, pelvik ultrason, küretaj ve pelvik Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ile ortaya konulmalıdır. Akciğer grafisi, karaciğer fonksiyon testleri, karaciğer sintigrafisi, batın ultrasonografisi, beyin BT, beyin omurilik sıvısında hCG tayini ve bazı olgularda abdominal ve pelvik organların selektif anjiyografisi ile metastaz varlığı ortaya konabilir. Yapılan çalışmalarda BT'nin, karaciğer ve akciğer metastazlarının erken tanısında önemli bir yeri olduğu ortaya konulmuştur (33; 63).

FIGO'ya göre Evre I ve düşük riskli Evre II-III olgularında ve DSÖ skorlama sistemine göre düşük risk grubuna tedavi; tek ajan KT, KT ile birlikte histerektomi ve bazı seçilmiş vakalarda KT'nin intraarterial infüzyon yolla verilmesi olarak üç grupta toplanır. Tedavi rejimi olarak ilk ve mutlak uygulanması gereken KT'dir. Bir diğer tedavi şekli KT'ye ek olarak histerektomi yapılmasıdır. Fertilite isteği olmayan hastalarda histerektomi uygulandığında hastalık sadece uterusu sınırlıysa %100 remisyon

sağlanmaktadır. KT ve histerektominin birlikte uygulanması hastanede kalış süresini kısaltmakta ve verilen KT kür sayısını da düşürmektedir. KT'ye cevap vermeyen olgularda uterus dışında ki hastalığın kontrol altına alındığı olgularda histerektomi uygulanabilir. Bu tür uygulamaya geç histerektomi uygulaması adı verilmektedir. Gerek KT ile birlikte gerekse geç dönemde yapılan histerektomi KT baskısı altında yapılmaktadır. Bu uygulama sayesinde herhangi bir morbidite artışına neden olmaksızın tümör embolizasyonu önlenebilmektedir (57; 67; 68; 69).

KT'ye ek karaciğer ve beyin metastazlarının tedavisinde radyoterapi (RT) yardımcı tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Karaciğer metastazı olan olgularda da, KT ile kombine 10 günde verilmek suretiyle total 2000 rad RT uygulanabilmektedir. Bu doz tümörü öldürücü dozun altındadır. Karaciğer toleransının olmaması dolayısıyla daha yüksek dozlara çıkılamamaktadır. Beyin metastazlarında RT, KT ile başlamak üzere 10 günde total 2000-3000 rad verilerek uygulanmaktadır. Beyin metastazı olan olgularda öne çıkan amaç beyin ödeminin önlenmesi ve hastanın hayati tehlikesinin ortadan kaldırılmasıdır. Bu nedenle kraniyotomi ve yüksek doz kortikosteroid uygulanan yöntemlerdir. (70).

GTN'lerde tedavi planlaması ölçülen hCG düzeylerine göre yapılır. Remisyon tanısı, hCG düzeyi normal değerlere düştüğünde birer hafta aralarla bakılan dört hCG düzeyi normal sınırlarda bulunmasıyla konur. Bu tanı konulduktan sonra 1 veya 2 kür daha ilave KT uygulanır. Remisyon sağlandıktan sonraki takiplerde ise 12 ay süre ile ayda bir hCG düzeyine bakılır. Bir yıllık takip döneminde üçer aylık aralıklarla fizik muayene ve pelvik muayene yapılır, akciğer grafisi çekilir ve hematopoetik değerler kontrol edilir. KT uygulanmasını takiben remisyon sağlanan olgularda bir yıl süreyle etkin kontrasepsiyon sağlanmalıdır. Bu amaçla oral kontraseptiflerin kullanılması önerilir(71; 72).

2.8.1. Kemoterapi ve Radyoterapi

GTN'de KT, tek ajan veya kombine tedavi olarak uygulanır. Tek ajan kemoterapisinde Aktinomisin-D (Act-D) ve metotraksat (MTX) ile, hem metastatik olmayan hem de düşük riskli metastatik GTH'da %100'e yaklaşan oranlarda remisyon elde edilmektedir. Tekli ajan seçiminde farklı protokoller mevcuttur (73; 74; 75).

MTX da 5 günlük protokol ile veya haftada bir pulsatil olarak verilebilir. Act-D iki haftada bir 5 gün veya pulsatil olarak verilebilir. Tekrarlayan dozlarda kullanıldığında MTX'in sistemik toksisitesini istenilen seviyede tutabilmek için beraberinde Folinik asit (FA) de verilmelidir (76; 77). MTX-FA tedavisi ile trombositopeni, granülositopeni, mukozit ve hepatotoksisite gelişebilir, yapılan çalışmalarda bu oranlar yaklaşık olarak, sırasıyla %2.9, %5.8, %6.4 ve %10.2 bulunmuştur (78; 79). İlk tedaviden sonra, β -hCG seviyesi sürekli bir düşüş gösterdiği sürece ek KT uygulanmaz ve standart aralıklı ek tek ajan KT protokolü yoktur. Tedaviden sonraki 18 gün içerisinde β -hCG'deki 1 log (%10) düşüş başarılı tedaviyi göstermektedir. β -hCG 3 hafta ardarda plato çizerse ya da yükselme eğilimine girerse veya ilk tedavinin tamamlanmasından sonraki 18 gün içerisinde 1 log azalma göstermezse ikinci bir KT kürü daha uygulanır (79). Tek ajana direnç geliştiğinde ikinci yaklaşım diğer tek ajan kemoterapisi ile tedavinin yürütülmesidir. Yani daha önce MTX kullanılmışsa aktinomisin-D, daha önce aktinomisin-D kullanılmışsa MTX kullanılır. İkinci seçenek kemoterapiye de direnç geliştiğinde tedavi çoklu ajanlarla sürdürülür.

Dirençli vakalarda en sık kullanılan kemoterapi protokolü Etoposid, MTX, Act-D, siklofosfamid ve vinkristinden (EMA-CO) oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu rejimin, yüksek riskli GTN grubunda %76-94 arasında değişen oranlarda remisyon sağladığı gösterilmiştir (80; 81). Bu nedenle ki EMA-CO rejimi, metastazı olan ve prognostik skoru yüksek riskli olan hastalarda öncelikli tedavi seçeneğidir (82; 83). EMA-CO KT'sine direnç gelişirse Etoposid ve Cisplatin 8. günde yer değiştirilir (EMA-EP). EMA-CO'ya dirençli olguların %76'sında tek başına ya da cerrahi ile beraber remisyon sağlanmaktadır (84; 85). Kombine KT'ye, ciddi yan etkiler oluşmadığı sürece, ardışık 3 ölçümde normal serum β -hCG değeri görülene kadar devam edilmelidir. Normal değerlere ulaşılmasını takiben relaps olasılığını azaltmak amacıyla iki ek KT kürü daha uygulanmalıdır (80).

Kemoterapiye direnç ile ilişkili nedenler (86):

- Koryokarsinom patolojik tanısı alması
- Metastatik hastalık varlığı
- Önceki gebelikte molar gebelik öyküsünün olmaması
- Yüksek hCG seviyelerinin varlığı
- Yüksek FIGO skoru
- Artan yaş

Kombine KT rejimleri uygulanımına bağlı olarak bulantı, kusma, alopesi, mukozit, nöropati, myelosupresyon, enfeksiyon, karaciğer, böbrek, over fonksiyon kaybı, lösemi, meme, kolon gibi ikincil kanser gelişim riski, tek ajan tedavilerine göre daha da artar(87).

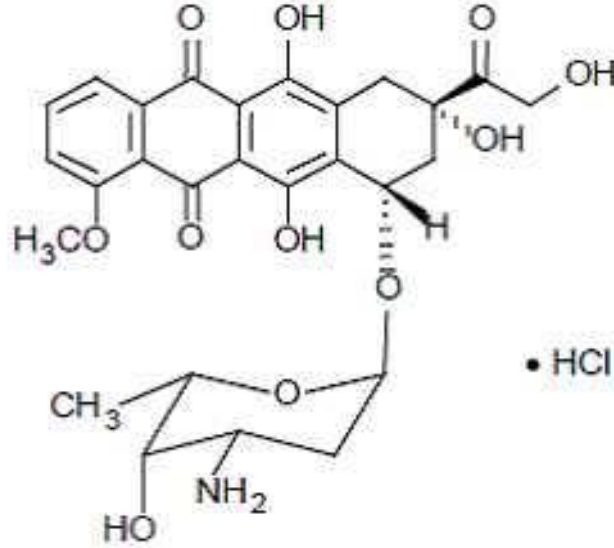
Beyin metastazı olan hastalarda 10 gün boyunca 3000 cGY tüm beyin RT, karaciğer metastazlarında da 10 gün süresince 2000 cGY tüm karaciğer RT uygulanır (88). Refrakter hastalıkta, KT'nin ciddi yan etkilere yol açtığı durumlarda Paklitaksel yalnız başına ya da ifosfamid, carboplatin, cisplatin veya etoposid ile kombine kullanılabilir (89; 90).

2.9. Tedavi Sonrası

Molar gebeliği takiben sonraki gebeliklerde hastalığın tekrarlama riski %1'dir (91). KT sonrası kür sağlanmış GTN'li hastalar normal fertilitesine kavuşabilirler (92; 93). Bu hastalarda infertilite riskinin artmadığı tespit edilmiştir (92; 93). Kullanılan kemoterapötik ilaçların teratojenik ve mutajenik etkileri olmasına karşın majör ve minör malformasyonların oranı %2,5 ile normal sınırlarda tespit edilmiştir (94; 95).

2.10. Lipozomal Doksorubisin

Şekil 1. Lipozomal Doksorubisin'in formülü



Doksorubisin ya da hidrosidaunorubisin (ticari adıyla Adriamisin) kanser kemoterapisinde kullanılan antrasiklin türevi antibiyotiktir. Doğal bir ürün olan daunomisin ile yakından ilişkilidir. 1950'lerde Farmitalia adlı bir İtalyan araştırma şirketinin toprak numunesinde yeni bir *Streptomyces peucetius* suşundan izole edilmiştir. 1960'larda akut lösemi ve lenfoma tedavisinde başarılı olmuştur. 1967'de ölümcül kardiyak toksisiteye neden olduğu bulunmuştur (96; 97).

Doksorubisin'in etki mekanizması karmaşık ve tam anlaşılammış olmakla beraber enterkalasyon yoluyla DNA ile etkileştiği düşünülmektedir (98). Transkripsiyon sırasında DNA'nın açılmasını sağlayan Topoizomeraz II enziminin ilerlemesi engellenir. Doksorubisin DNA ikileşmesi sırasında topoizomerazın DNA'yı kesmesinin ardından meydana gelen topoizomeraz-DNA kompleksini stabilize ederek DNA ikili sarmalının tekrar birleşmesini engeller ve böylece DNA ikileşmesini durdurur (99).

Doksorubisin; Hodgkin lenfoma, yumuşak doku sarkoması, multipl miyelom, lösemi ayrıca mesane, meme, mide, akciğer, over, tiroid kanseri tedavi rejimlerinde yer almaktadır (100).

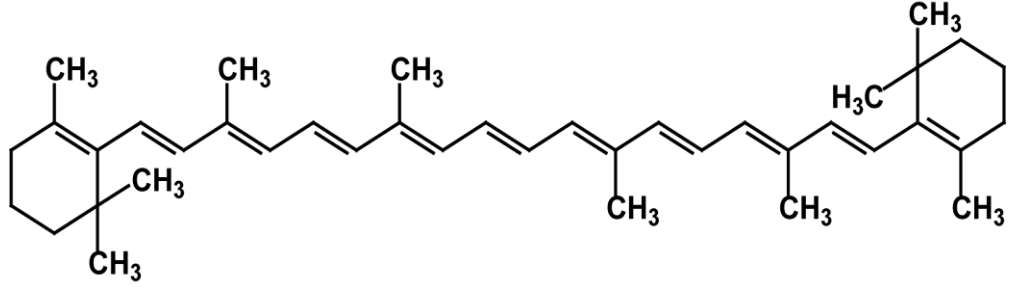
Lipozomal doksorubisin, peglenmiş (polietilen glikol kaplı) lipozom içine kapsüllenmiş bir doksorubisin biçimidir. AIDS'le ilişkili Kaposi sarkomu tedavisi için geliştirilmiştir. Polietilen glikol kaplama deride konsantr olmayı sağlar. Ancak yan etki olarak el-ayak sendromu (palmar plantar eritrodistezi) sık görülür. Klinik çalışmalarda 4 hafta boyunca 50 mg/m² dozunda verildiğinde hastaların yaklaşık %50'sinde el-ayak sendromu oluşmuştur. Lipozomal doksorubisin daha az kardiyotoksiktir. Over kanseri ve multipl miyelom tedavisi için ABD'de FDA tarafından onaylıdır. Over kanseri için önerilen konvansiyel doz 4 haftada bir 50mg/m²'dir (101).

Lipozomal doksorubisin platin esaslı kemoterapirejimlerinden cevap alınamayan kadınlarda, ilerlemiş over kanseri tedavisinde endikedir. AIDS'e bağlı Kaposi Sarkomunda (KS) düşük CD4 sayımı (<200 CD4 lenfosit/mm³) ve yaygın mukokütanöz veya viseral tutulumu olan hastalarda da endikedir. Sistemik kemoterapide ilk ilaç olarak veya vinka alkaloidi, bleomisin ve konvansiyonel doksorubisinden (veya diğer antrasiklinlerden) en az ikisini içeren bir kombinasyon ile tedavi edilmesine rağmen hastalığı ilerlemiş veya ilaçları tolere edememiş AIDS-KS hastalarında ikinci tercih olarak kullanılır (102).

Akut yan etkileri arasında bulantı, kusma, kardiyak aritmiler, nötropeni, alopesi yer almaktadır. Kümülatif olarak doksorubisin dozu 550mg/m²'ye ulaşıncı kardiyak yan etkiler (kalp yetmezliği, kardiyomiyopati ve ölüm) dramatik olarak artar. Doksorubisin kardiyotoksitesini mitokondriyal oksidatif fosforilasyonda dozla orantılı bir azalma ile karakterizedir. Oluşan reaktif oksijen radikalleri miyofibriler kayba, sitoplazmada vakuol oluşmasına ve miyosit hasarına neden olmaktadır. Diğer DNA hasarı oluşturan antineoplastik ajanlarda olduğu gibi, doksorubisin ile kombinasyon tedavisi gören hastalarda sekonder akut miyeloid lösemiler ve miyelodisplaziler bildirilmiştir (101).

2.11. Karoten

Şekil 2. Karoten'in kimyasal yapısı



Karoten, $C_{40}H_{56}$ formüllü birbirleriyle ilişkili birkaç bileşik için kullanılan bir terimdir. Karoten, fotosentez için önemli bir fotosentetik pigmenttir. Soğurduğu ışığı klorofile aktararak fotosenteze katkıda bulunur (103). Kimyasal olarak karoten bir terpendir, sekiz izopren birimden biyokimyasal olarak sentezlenir. Başlıca iki türü vardır, bunlar Yunan harfleri ile belirtilir: Alfa-karoten (α -Karoten) ve beta-karoten (β -karoten). Gama, delta ve epsilon (γ , δ ve ϵ -) karotenler de vardır. β -karoten iki retinil gruptan oluşur ve ince bağırsak mukozasında beta-karoten dioksijenaz tarafından yıkıma uğrayıp bir tür A vitamini olan retinole dönüşür. Karoten karaciğerde depolanıp gerekli olduğu zaman A vitaminine dönüşebildiğinden birprovitamin sayılır (103).

Karotenin iki başlıca izomeri, α -karoten ve β -karoten arasındaki fark, uçtaki halkalı gruptaki çift bağın konumundadır. β -karoten daha yaygın olan biçimdir. Sarı, turuncu ve yeşil yapraklı meyve ve sebzelerde bulunur. Bir antioksidan olan β -karoten yağda çözünür, peroksit radikallerinin yakalanması ve detoksifikasyonunda rol alarak özellikle kimyasal karsinogeneze koruyucu rol aldığı bilinmektedir. Ancak gıda veya ilaç takviyesi olarak alınmasının kanser önleyici etkisi tartışmalıdır (104). Yapılan çalışmalarda sentetik beta karoten kullanımında, akciğer ve prostat kanseri oranının arttığı ve bu artışın sigara içenlerde ölüm oranını arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar beta karoten takviyeleri için görülmüş, içinde doğal olarak beta karoten bulunduran yiyeceklerde görülmemiştir (103). Britanya kanser örgütü, beta-karoten takviye ambalajlarında sigara içenlere bu takviyelerin akciğer kanser

riskini artıracığına dair ikaz etiketleri konması gerektiğini öne sürmüştür (105). Günlük E vitamini (alfa tokoferol) ve β -karoten alımının akciğer kanseri üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada karotenoidli meyve ve sebzelerin tüketimi ile akciğer kanseri oranlarının azalması arasında bir bağlantı olduğu saptanmış fakat β -karoten takviyesi alanlarda akciğer kanseri oranında azalma bulunamamıştır (106).

ABD Milli Kanser Derneği dergisinde (NCI) 1996'da yayınlanan bir çalışmada, A vitamini (retinil palmitat olarak) ve beta-karotenin kanser koruyucu etkisi araştırılmış, β -karotenin gıda takviyesi olarak kullanımında akciğer kanseri riskinde artış bulunmuştur (107). Antioksidan desteğin mortalite üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir meta analizde β -karotenin mortaliteyi %5 oranında artırdığı bulunmuştur (108).

Diğer bir çalışmada, meme kanseri hastalarının serum beta-karoten düzeylerinin kanser olmayan kadınlara göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Serum beta-karoten serum düzeyleri en düşük dörtte birlik dilimin içinde yer alan kadınlarda meme kanseri riskinin en yüksek dörtte birlik dilimdeki kadınlara göre %221 daha fazla olduğunu bildirmiştir (109).

β -karoten yıkım ürünleri ve A vitamininin karboksilik asit formları olan ATRA ve 9 *cis*-retinoikasit (9 *cis*-RA) nükleer retinoid reseptörlerine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen aktif metabolitlerdir (110). Günlük diyetle direk olarak alınamayan ATRA, özellikle embriyonik dönemde hücre büyümesi ve gelişimi üzerine etkilidir. Laboratuvarlarda sentetik olarak da sentezlenen ATRA, akne gibi cilt hastalıklarının tedavisinde ve bazı kanser tiplerinde hem tedavi hemde kanserden korunma amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca β -karoten güçlü bir antioksidandır ve süperoksit dismutazın etkisini artırarak serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasını engeller ve böylece oksidatif stresi azaltmış olur (111). Retinoid ailesine mensup olan β -karoten ve ATRA bu nedenle aynı zamanda anti-kanser ilaçları arasında yer almaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucu ATRA'nın Akut Promiyelosit lösemi (APL) tedavisinde başarılı sonuç verdiği saptanmıştır. İn vitro ve in vivo olarak yapılan çalışmalarda retinoidlerin, kemoterapötik ajanlarla kombinasyon uygulamalarında sinerjik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. ATRA ayrıca Kaposi sarkoma, baş boyun skuamoz hücreli karsinoması, over kanseri, mesane kanseri ve nöroblastoma gibi

çeşitli tümöral hastalıkların tedavisinde kullanılan KT şemalarına eklenmesi klinik çalışmalarda araştırılmaktadır. Ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde de standart kemoterapötikler ile kombine edilerek kullanıldığında olumlu sonuçlar vermektedir (112).

ATRA ve retinoik asit izoformları nöronal farklılaşmayı indüklediklerinden, in vitro nöroblastom farklılaşma modellerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Fizyolojik konsantrasyonlarda ATRA ile tatbik edilen hücrelerde apoptotik sürece giren hücre sayısında artma meydana geldiği ve hücrelerde genel olarak büyümenin durduğu belirgin bir biçimde görülmektedir. ATRA, c-Jun N-terminal kinaz ve fosfatidilinositol 3-kinaz gibi protein kinazları hızlıca aktive etmektedir. Protein kinaz aktivasyonu sinir hücrelerinde hızlıca değişime neden olmaktadır. Ayrıca retinoik asit, fosfotaz-1, protein fosfotaz 2A ve protein fosfotaz 2B gibi mitozu aktive edici protein fosfotazları da aktive etmektedir (113).

Vitamin A ve retinoidler servikal hücre büyümesinde de etkindirler. Yapılan klinik çalışmalar, çeşitli retinoidlerin serviks kanser hücrelerinde büyümeyi engellediğini göstermektedir. Human Papilloma Virüsünün neden olduğu serviks kanserinde serumda bulunan ATRA seviyesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (112). Ayrıca β -karotenin, meme kanseri hücrelerinin gelişimini apoptotik yollar üzerinden engelleyebileceği gösterilmiştir (114).

2.12. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin laboratuvar koşulunda kontrol altında üretilmesi sürecidir. Hücre kültürü tanımı pratikte ökaryot hayvan hücrelerinden elde edilen hücrelerin kültürleri için kullanılmaktadır. Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Hücre kültüründe, hücrelerin gelişmesi ve büyümesi için gerekli teknikler 20. yüzyıl boyunca geliştirilmiştir. 1885'te bir tavuk embriyosunun nöral plağının bir kısmını ayıran ve ılık bir tuzlu su çözeltisinde dokuyu birkaç gün yaşatan Wilhelm Roux doku kültürünün temellerini de atan kişidir (115). 1952'de George Gey ve arkadaşları tarafından ilk insan kanser hücre hattı olan HeLa'nın ekilmesinin ardından binlerce yeni hücre kanser hattı geliştirilmiştir (116).

Moleküler biyolojik çalışmalarda, kanser araştırmaları, doku ve deri mühendisliğinde, biyokimyasal çalışmalarda, aşı üretiminde, sitogenetik alanında, hastalıkların tanı ve araştırılmasında, kök hücre çalışmalarda, farmasötik proteinlerin üretiminde, hormon üretiminde, bitki ve hayvan ıslahı ve geliştirilmesi çalışmalarda, tüp bebek ve kısırlık tedavilerinde, hücre kültürü çalışmaları kullanılmaktadır (116; 117).

Günümüzde hayvan hakları savunucularının kamuoyunda oluşturdukları baskı nedeniyle hayvan haklarına geçmişe nazaran çok daha fazla önem verilmektedir. Hayvan hakları savunucuları, birçok hayvan deneyininboş yere yapıldığı yönündeki iddialarını, bu deneylerden çıkan sonuçların, güvenilemeyecek oranlarda değişken ve hayvanlara acı çektirilmesine, öldürülmelerine değmeyecek kadar önemsizolmaları söylemine dayandırmaktadırlar. Hücre kültürü çalışmaları birçok hayvan çalışmasının yerini alabilecek bir araştırma türüdür (116).

2.12.1. Başlıca Hücre Kültür Tipleri

2.12.1.1. Primer Kültürler

Primer hücre kültürleri, ait oldukları orijinal dokudan alınarak kültür şartlarına konulan hücreleri içerir. Doğrudan dokudan elde edilir ve ayrı bir ortamda ek hücre süspansiyonunda ayrışana kadar enzimatik prosedüre tabi tutulurlar. Bu hücreler, genotipik ve fenotipik yönden orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri içerir ve dokunun fizyolojik durumunun ifadesidir. Bu tarz kültürler heterojen yapıdadırlar ve fibroblastlar tarafından etkinleştirilirler. Bu kültürlerin oluşturulması emek gerektirir ve kısıtlı zaman içinde sadece in vitro koşullarda saklanabilirler. Bu elde edilen hücreler, in vivo ortamdaki hücrelerden farklı karakteristikler göstermektedir. Primer hücre kültürleri, üretim aşamasındaki zorluklar, hassas hücreler olmaları nedeniyle çalışma esnasında ortaya çıkabilecek problemler ve bunların kontrolünün son derece güç olmasına karşın, orijinal fizyolojik durumun ifadesi olmaları nedeniyle pek çok çalışmada örnek sistem oluşturmaktadırlar (118).

2.12.1.2. Sürekli Kùltürler

Sürekli kùltürler, bir seri hücrenin hedef kùltüre dönüştürülmesiyle ya da kısıtlı bölünme sayısına izin verilen, tek hücre tipinden oluşmaktadır. Kısıtlı ömürlü hücre toplulukları diploiddir ve kısmen farklılaşmayı da barındırabilirler. Eğer 30 ya da daha fazla bölünme tekrarı olacaksa, bu tip hücre toplulukları farklı ve uzun süre saklanma yöntemlerini içeren bir sistem ile saklanmalıdır (119).

Sürekli kùltürlerde ki hücreler kendiliğinden çoğalabilirler ancak kontamine hücre oluşturma olasılıkları da vardır. Sınırsız bölünebilirliğe sahip olan bu değiştirilmiş hücreler in vivo karakteristiklerinin çok azını göstermektedirler (119).

2.13. Sitotoksosite

Piyasaya sürülen ilaçların %90'ının satıştan geri çekilmesinin ve geliştirilen ilaçların 3'te birinin klinik faz denemelerde başarısızlığa uğramasının altında yatan neden toksisitedir. Önerilen çözümlerden birisi klinik denemelere geçmeden önce ilaçların toksik olmadığını kesinleştirilmesidir. Hücre hattı kullanılarak yapılan in vitro sitotoksosite çalışmaları, test maddelerinin sitotoksik etkilerinin en iyi tanımlanmasına paralel olacak şekilde yapılmaktadır (120).

Hücre hatları kullanılarak yapılan sitotoksosite çalışmalarında ilaç bileşenlerinin hücre içerisine ne kadarının hangi koşullarda alınacağını ve de hücresel çevrede nasıl hareket edeceklerinin taraması yapılabilmektedir. Böylece bileşenin hedef proteine bağlanmasını tetikleyen ya da engelleyen mekanizmalar gözlemlenebilmekte ve buna alternatif seçeneklerle çalışmaya yön verilebilmektedir. Hücre kùltürünün yüksek duyarlılık gösterilen bir sitotoksik ajanın ortaya çıkarabileceği maksimum ve minimum zararlar bu çalışmalar sayesinde önceden tespit edilebilmektedir (122).

Kanser tedavisinde yeni ajanların geliştirilmesinde kullanılan yöntemler bazen zaman ve malzeme sarfından daha ileriye gitmemiştir. Literatür incelemelerine dayanarak hücre kùltürlerinde daha önce denenmemiş ajanların in vitro olarak denenmeye başlanması klinik denemelere geçildiğinde çalışmaların başarısızlıkla sonuçlanmalarına neden olmuştur. Tümör biyolojisi ve moleküler mekanizmalar hakkında ki bilgimiz arttıkça daha yeni ölçütler göz önüne alınmaya başlanmıştır (121).

Farklı türlere ait hücre kültürleri üzerinde ya da aynı türe ait farklı hücre kültürleri kullanılarak sitotoksosite taramaları yapılabilmektedir. Böylece temel hedefe kadar birçok sonuç in vitro olarak toksisite bakımından karşılaştırılarak incelenmiş olmaktadır (120). Hücrelerin canlılığı ve proliferasyonun saptanmasında birkaç yöntem vardır. Bu yöntemlerin uygulanabilmeleri için tasarlanmış 96 kuyucuklu plakalar birçok örneğin birlikte hızlı bir şekilde analiz edilebilmeleri açısından çok kullanışlıdır. ELISA plate okuyucu ya da mikrotiterplate kullanılarak örneklerin kolorimetrik ya da ışımaya tayinleri yapılabilmektedir. Sitotoksitenin tespiti, hücrelerin ölümü ya da çoğalmaları gibi farklı verilerle ölçüm yapılarak saptanabilmektedir (123).

2.14. Apoptoz

Terim olarak apoptoz ilk kez 1972 de J. F. K. Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve hücre ölümünü ifade eder (124; 125). Hücrenin intiharı olarak da adlandırılan apoptoz, teorik olarak hücrenin dışardan maruz kaldığı çeşitli travmalara bağlı ya da birtakım genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma yoluyla hücre ölümünü kontrol eden aktif işlemler dizisi olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, KT ve iyonize radyasyonu içeren travmatik ajanların etkisiyle gerçekleşen hücre hasarlarının ya da genetik faktörlerin etkisiyle aktive edilen hücre intihar programının apoptoz yoluyla açıldığı söylenebilir (125).

Apoptoz sinyali bir hücreye ulaştıktan sonra o hücrenin kromatini ve sitoplazması yoğunlaşmaya başlar, hücre küçülür. Daha sonra hücre apoptotik cisimcik adı verilen küçük parçacıklara bölünür. Apoptotik cisimciklerin yüzeyinde sinyal veren yapılar ortaya çıkar ve bu reseptörlere bağlanan histiyositler tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılırlar (124).

2.15. Flowsitometri (Akan Hücre Ölçer)

Kantitatif bir apoptoz belirleme yöntemi olan Flowsitometri (FCM) İlk kez 1960 yılında patolog Herbert Derman ve bilgisayar uzmanı olan John Hoffer tarafından sitoflorografi cihazı olarak tasarlandı ve Caspersson ve arkadaşlarının esaslarını

belirlediği hücre nükleusunun floresan boyanma özellikleri göz önüne alınarak geliştirildi(126). Kamenstsky 1963 yılında sistemi modifiye ederek, hareketsiz hücrelerin analizi yerine hareketli ortamda hücre analizi yapabilirliğinin mümkün kılarak FCM'yi icat etmiş oldu (127; 128). Lam üzerindeki hücrelerin optik özelliklerini tarayan sitofotometri ve imaj sitometrinin tersine, çok hızlı ve birden fazla değişkenin analizini yapma olanağı vermesi FCM'nin avantajlarından birisidir. Bu nedenle yaklaşık 100 kat kadar fazla sayıda hücrenin incelenmesi de FCM ile mümkün olabilmektedir. FCM'nin temel çalışma prensibi floresansı ölçüp kaydetme esasına dayanır. Uygun bir florokomla boyandıktan sonra eksitasyon kaynağına doğru hareket eden hücrelerin floresans dereceleri ölçülür ve elektronik uyarıma dönüştürülür. Eksitasyon kaynağı genellikle 450-514 nm dalga boyunda monokrom ışık veren Xenon-civa ya da argon laserdir. Bu ışık sayesinde hücresel elemanların floresan boyalarını maksimum emebilmeleri sağlanır. İnceleme genelde saniyede 100-200 hücre hızıyla yapılır. Floresan ölçümler sonucu elde edilen veriler bilgisayar ortamında saklanabilirler. Floresans yöntemi sayesinde hücrelerin büyüklükleri de ölçülebilir (129; 130).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ile 2.0 g/l NaHCO₃, 500 ml (İnterlab), FCS ısı ile inaktif 100 ml (Dateks), L-Glutamine (200 mM) 100 ml (BRK Kimya), Penisilin-streptomisin karışım 100 ml (BRK Kimya), Tripsin-EDTA karışımı 100ml (İnterlab), DMSO 50 ml (Dateks), β-Carotene Type I synthetic >%93 UV powder 5g (Sigma), Pegile Lipozomal Doksorubisin (Caelyx®, Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ, USA)

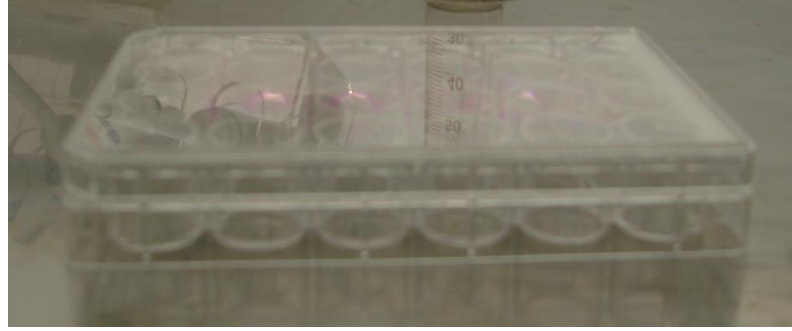
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

24 kuyucuklu hücre kültür plağı 20 adet (TC-Plate 24 well sterile with Lid Ind. Packed) (İnterlab), 12 kuyucuklu hücre kültür plağı 20 adet (TC-Plate 24 well sterile with Lid Ind. Packed) (İnterlab), Apoptoz kiti (200 test) (BRK Kimya, Beckman Coulter). DXI 600 cihazı (Beckman Coulter, CA, USA), Flowsitometri (Beckman Coulter FC 500). 25 cm²'lik ve 75 cm²'lik flasklar, 12 ve 24 kuyucuklu plaklar, steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Neubauer lamı, Thoma lamı, ependorf tüp.

Şekil 3. JAR ve JEG-3 hücre kültürlerini içeren flasklar ve hücre kültür plakları



Şekil 4. 24 kuyucuklu hücre kültür plağı



Şekil 5. Flowsitometri



3.3. Kullanılan Aletler

Soğutmalı santrifüj (Juan marka), Derin dondurucu (Juan marka -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO² inkübatörü (Nüve EC 160), Steril kabin (Nüve), otomatik pipetler, inverted Mikroskop (Leica).

Şekil 6. Nüve CO² inkübatörü

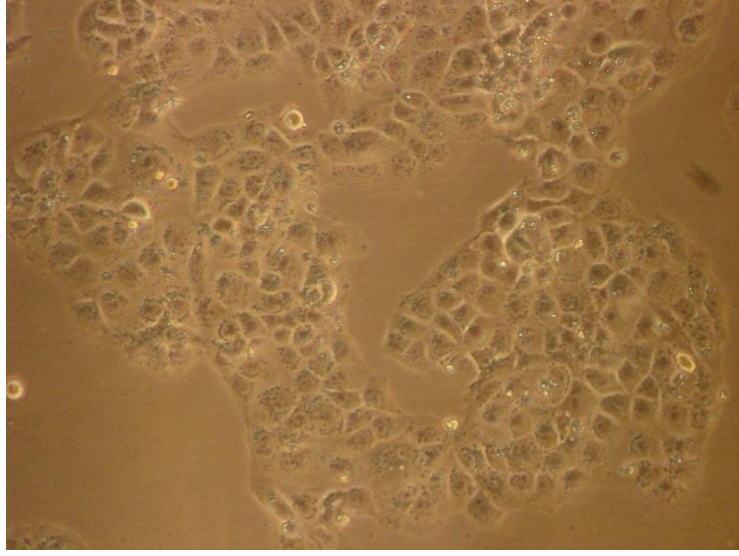


3.4. JAR ve JEG-3 Hücre Kültürleri

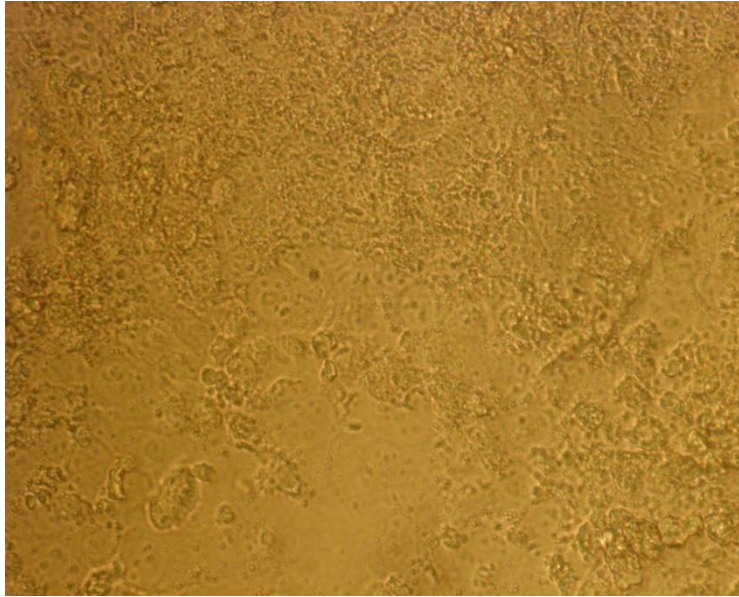
JAR ve JEG-3 hücreleri Bülent Ecevit Üniversitesi'nin Bilimsel Araştırma Projesi desteği ile Amerikan Type Culture Collection'dan satın alınmıştır. JAR ve JEG-3 hücreleri, ısı ile inaktifleştirilmiş %10'luk Fetal Bovine Serum, RPMI-1640 (İnterlab), Penicilin-Streptomycin ve L-glutamin içeren besiyerinin bulunduğu 75 cm²'lik flasklarda %95'lik hava, %5'lik CO² ortamı ve %98 nem ortamında, 37⁰C'deki Nüve CO² inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücrelerin flask tabanını doldurmasından sonra, tripsin EDTA solüsyonu ile hücreler kaldırılmış ve yıkama santrifüj işlemlerinden geçirilmiştir. Yıkamalarda RPMI 1640 kullanılmış, santrifüj işlemi 16 cm rotor çapında açılır rotor kullanılarak +4°C'de 2400 rpm (rapid per

minute)'de gerçekleştirilmiştir. Hücreler Neubauer lamında sayılıp, kuyucuk başına 1×10^5 hücre düşecek şekilde 12 ve 24 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. 2 gün inkübasyondan sonra besi ortamı tazelenerek ilaç dozları hücrelerin üzerine eklenmiştir.

şekil 7. JAR hücre kültürü mikroskopik görünümü



şekil 8. JEG-3 hücre kültürü mikroskopik görünümü



3.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

3.5.1. Lipozomal Doksorubisin dozunun hazırlanması

Pegile Lipozomal Doksorubisin (PLD), Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 1, 2 ve 5 µg/ml'lik dozlar halinde hazırlanmıştır. En yüksek konsantrasyonda DMSO oranı %1'den çok daha az olacak şekilde RPMI 1640 ile dilüsyon yapılmıştır.

3.5.2. Karoten dozunun hazırlanması

β-Carotene Type I synthetic >%93 UV powder 5g (Sigma), DMSO içerisinde çözülerek 1, 5 ve 10 µg/ml'lik dozlar halinde hazırlanmıştır. En yüksek konsantrasyonda DMSO oranı %1'den çok daha az olacak şekilde RPMI 1640 ile dilüsyon yapılmıştır.

3.6. Yöntem

3.6.1. Hücre hatlarının kültüre edilmesi

JAR ve JEG-3 hücreleri 75 cm²'lik flasklarda, yetiştirilmiş ve %95 hava ve %5 CO²'li gaz ortamında ve 37⁰ C'deki CO² inkübatöründe kültüre edilmiştir.

3.6.2. Kemoterapötiklerin testler için hazırlanması, β-HCG ve h-HCG ölçümü

β-karoten belirlenen dozları hazırlanmıştır, çözücü olarak Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde ve son konsantrasyonları; 1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, olması sağlanarak hazırlanmıştır.

Pegile Lipozomal Doksorubisin (PLD), DMSO içerisinde 1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml'lik dozlar halinde hazırlanmıştır. En yüksek konsantrasyonda DMSO oranı %1'den çok daha az olacak şekilde RPMI 1640 ile dilüsyon yapılmıştır.

Pegile Lipozomal Doksorubisin (PLD) ve β -Karoten kombinasyonunda; LD'in 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml'lik dozları ile β -Karoten'in 5 μ g/ml'lik dozu kullanılmıştır. Maddeler hücelere aynı anda verilmiştir.

İlaç uygulamalarını izleyen 72. saatte hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılıp, apopitoz çalışmasına alınmıştır. Sadece bir set için tripsin öncesi süpernatant toplanıp, β -hCG ve h-hCG (human hyperglycosylated chorionic gonadotropin) ölçümü için derin dondurucuda saklanmıştır. İmmünoenzimatik yöntemle β -hCG ve h-hCG düzeyleri (Sunred Elisa Kit) DXI 600 cihazında (Beckman Coulter, CA, USA) çalışılmıştır.

3.6.3. Annexin V yöntemi ile apopitoz tespiti ve istatistiksel analiz

Fosfatidilserin (PS) hücre membranının iç kısmına asimetric olarak yayılmış halde bulunmaktadır. Normalde hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipitlerinden biri olan PS bulunmaktadır. Hücre apopitoza gidecek olursa normalde iç kısımda yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Apopitoz indüksiyonunu takiben PS'nin açığa çıkışı, Ca^{2+} bağımlı olarak PS'ye yüksek bir affiniteyle bağlanan bir protein olan rekombinant Aneksin V kullanılarak kolaylıkla belirlenebilir (131).

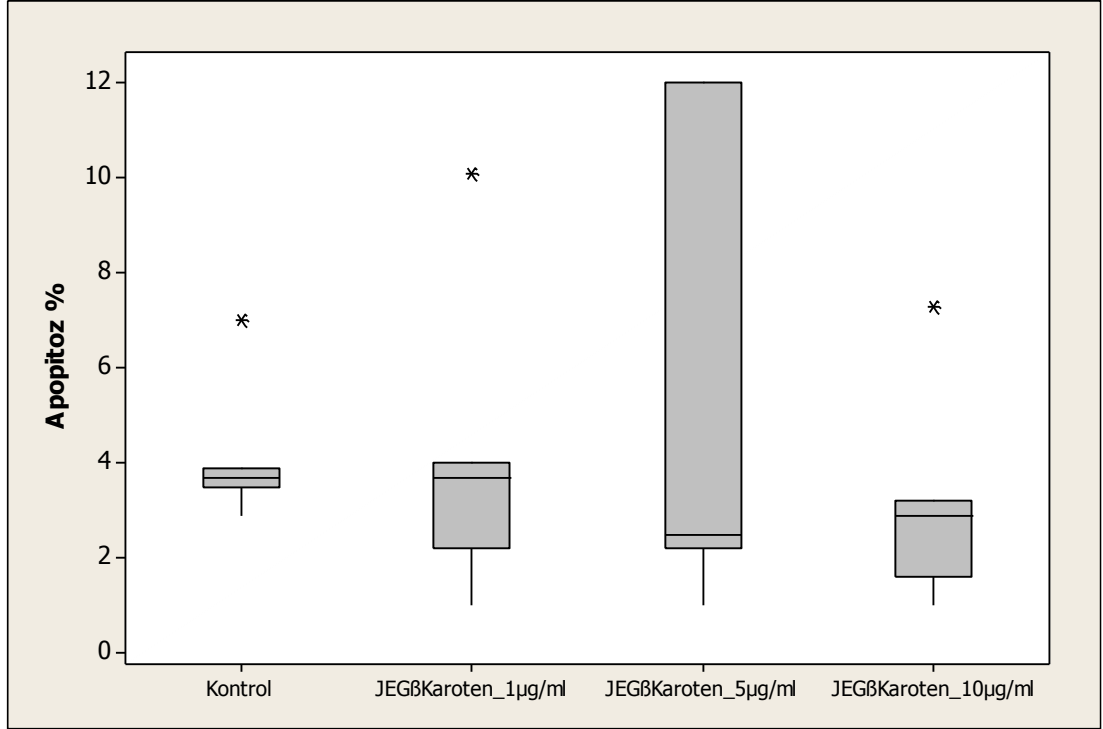
Aneksin V, hücrenin dış yüzeyine doğru yer değiştiren PS'ye bağlanabilen bir protein olduğundan, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretleyerek apoptotik hücreyi görünür hale getirilebiliriz (132). FITC-Aneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Aneksin-V bağlanması görülebildiği için ikinci boya olarak propidium iyodür eklenmektedir. Aneksin V-FITC (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidium iyodür (PI) (kırmızı floresan) ile aynı zamanda boyanan hücreler, canlı hücreler (Annexin V ve PI negatif) erken apoptotik hücreler (sadece Annexin V pozitif) (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (Annexin V ve PI pozitif) (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (133). Çalışmamızda erken apoptotik hücreler ile geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin toplamı üzerinden apopitoz oranları hesaplanmıştır.

Hücrelerin, deney setlerinde her test maddesi dozu için ekildiği deneyler, birbirinden bağımsız olarak 7 kez tekrarlanmıştır. Apoptoz sonuçlarının istatistiksel analizleri SPSS 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programında yapılmıştır. Çalışmada yer alan sürekli değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler medyan, minimum ve maksimum değerleriyle verilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Dozların 4'lü grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test, dozlar arası 2'li alt grup karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi ve Bonferonni düzeltilmeli Mann Whitney U testleri kullanılmıştır. Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde p değeri 0,05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Karoten'in JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri

Şekil 9. Karoten'in JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

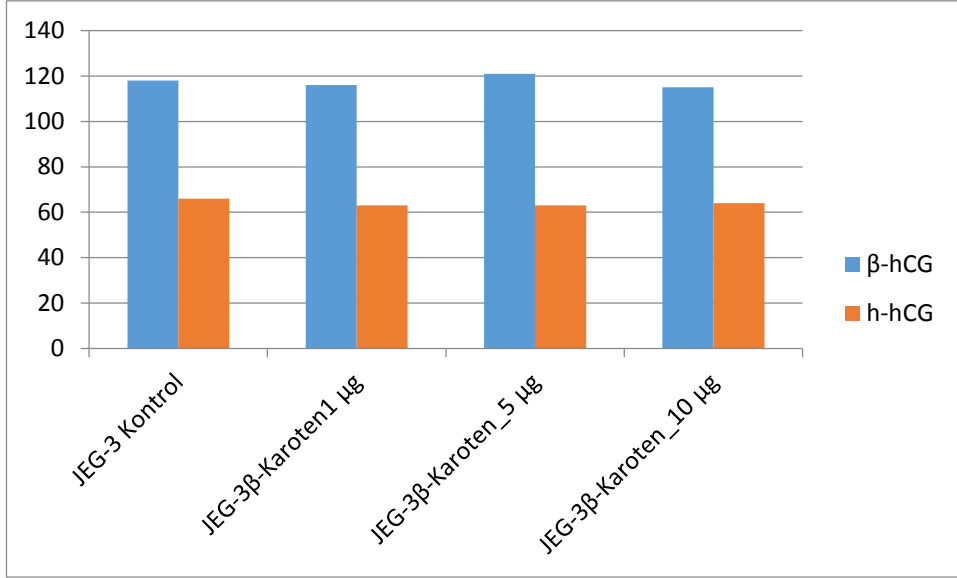


Tablo 4. Karoten'in artan dozlarda JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı

	Median (Min-Max)
JEG-3 Kontrol	3,7 (2,9-7)
JEG-3 β-Karoten_1 µg/ml	3,7 (1-10,1)
JEG-3 β-Karoten_5 µg/ml	2,5 (1-12)
JEG-3 β-Karoten_10 µg/ml	2,9 (1-7,3)

24 saat muamele sonunda β-Karoten'in 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı % 3,7'dir. 5 µg/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı % 2,5, 10 µg/ml'lik muamelesi sonucu ise %2,9'dur. Anlamlılık değeri $p < 0,05$ alındığında; apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,454$).

Şekil 10. Karoten verildiğinde JEG-3 hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri



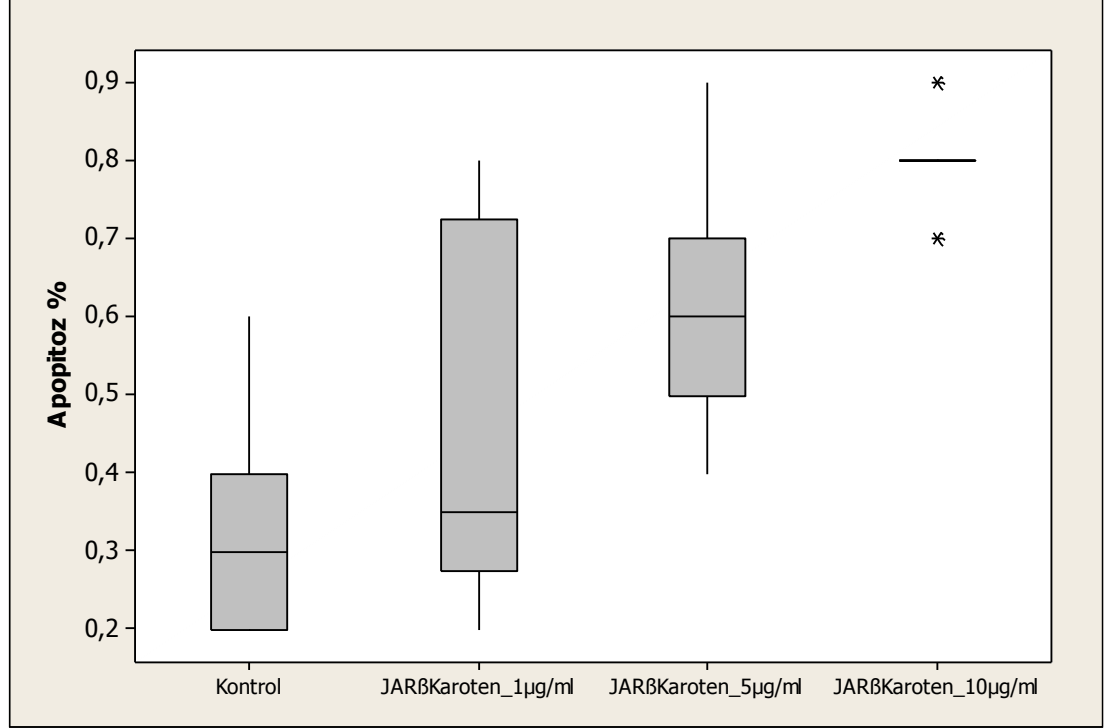
Tablo 5. Karoten verildiğinde JEG-3 hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri

	β -hCG	h-hCG
JEG-3 Kontrol	118	66
JEG-3 β -Karoten 1 μ g/ml	116	63
JEG-3 β -Karoten 5 μ g/ml	121	63
JEG-3 β -Karoten 10 μ g/ml	115	64

β -hCG ve h-hCG düzeylerinde β -Karoten'in dozu ile orantılı bir değişiklik izlenmemiştir.

4.2. Karoten'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri

Şekil 11. Karoten'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi



Tablo 6. Karoten'in artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı

	Median (Min-Max)
JAR Kontrol	0,3 (0,2-0,6)
JAR β-Karoten_1 µg/ml	0,35 (0,2-0,8)
JAR β-Karoten_5 µg/ml	0,6 (0,4-0,9)
JAR β-Karoten_10 µg/ml	0,8 (0,7-0,9)

24 saat muamele sonunda β-Karoten'in 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %0,35'dir. 5 µg/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %0,6, 10 µg/ml'lik muamelesi sonucu ise %0,8'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır (p=0,001).

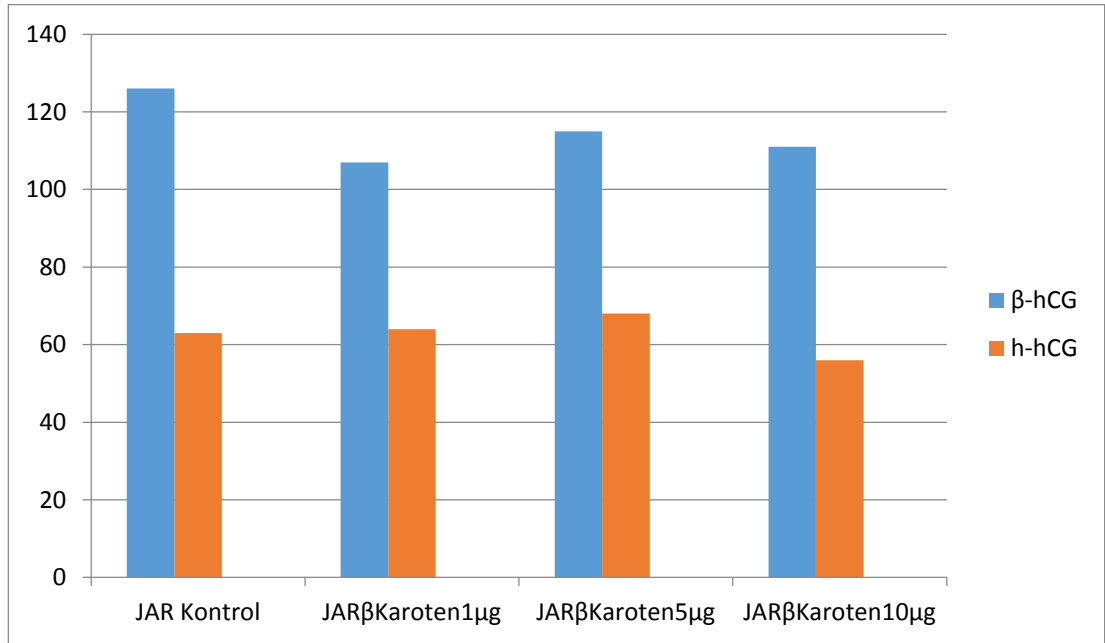
Anlamlılık değeri $p < 0,05$ alındığında;

β -Karoten_5 $\mu\text{g/ml}$ ile kontrol arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ($p=0,004$).

β -Karoten_10 $\mu\text{g/ml}$ ile kontrol arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ($p=0,001$).

β -Karoten_1 $\mu\text{g/ml}$ ile β -Karoten_10 $\mu\text{g/ml}$ arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ($p=0,014$).

Şekil 12. Karoten verildiğinde JAR hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri



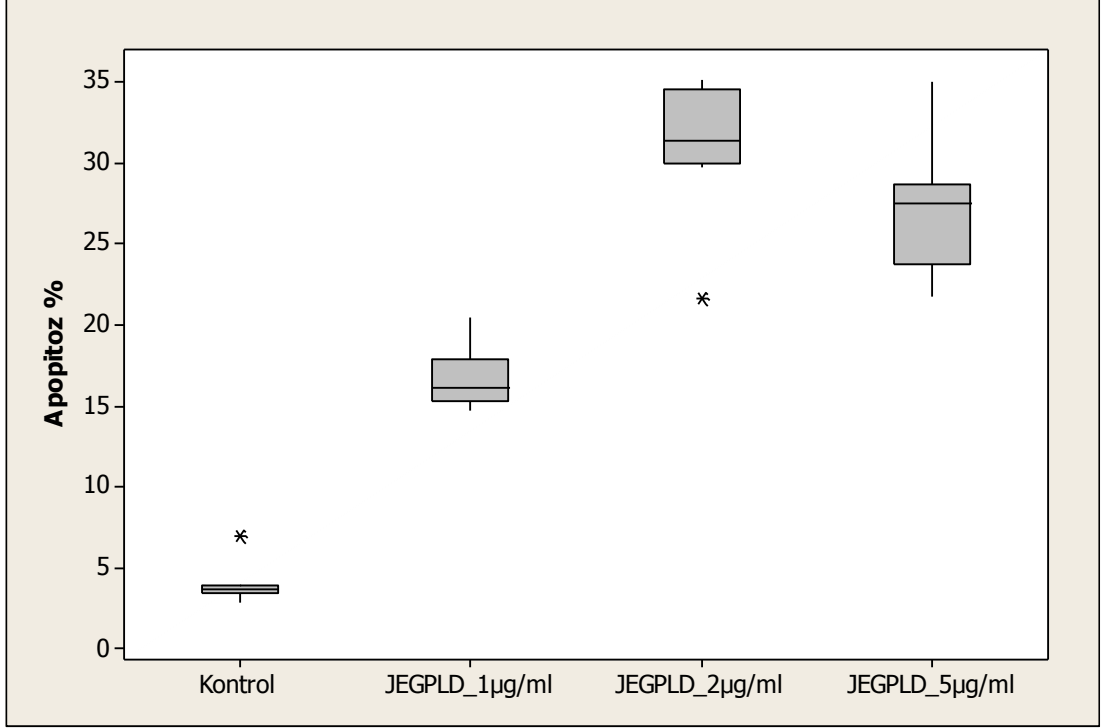
Tablo 7. Karoten verildiğinde JAR hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri

	β -hCG	h-hCG
JAR Kontrol	126	63
JAR β -Karoten 1 $\mu\text{g/ml}$	107	64
JAR β -Karoten 5 $\mu\text{g/ml}$	115	68
JAR β -Karoten 10 $\mu\text{g/ml}$	111	56

β -hCG ve h-hCG düzeylerinde β -Karoten'in dozu ile orantılı bir değişiklik izlenmemiştir.

4.3. LD'nin JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri

Şekil 13. LD'nin JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi



Tablo 8. LD'nin artan dozlarda JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı

	Median (Min-Max)
JEG-3 Kontrol	3,7 (2,9-7)
JEG-3 PLD_1 µg/ml	16,1 (14,7-20,5)
JEG-3 PLD_2 µg/ml	31,4 (21,6-35,1)
JEG-3 PLD_5 µg/ml	27,5 (21,8-35)

24 saat muamele sonunda Pegile Lipozomal Doksorubisin (PLD)'nin 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %16,1'dir. 2 µg/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %31,4, 5µg/ml'lik muamelesi sonucu ise %27,5'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır (p=0,000).

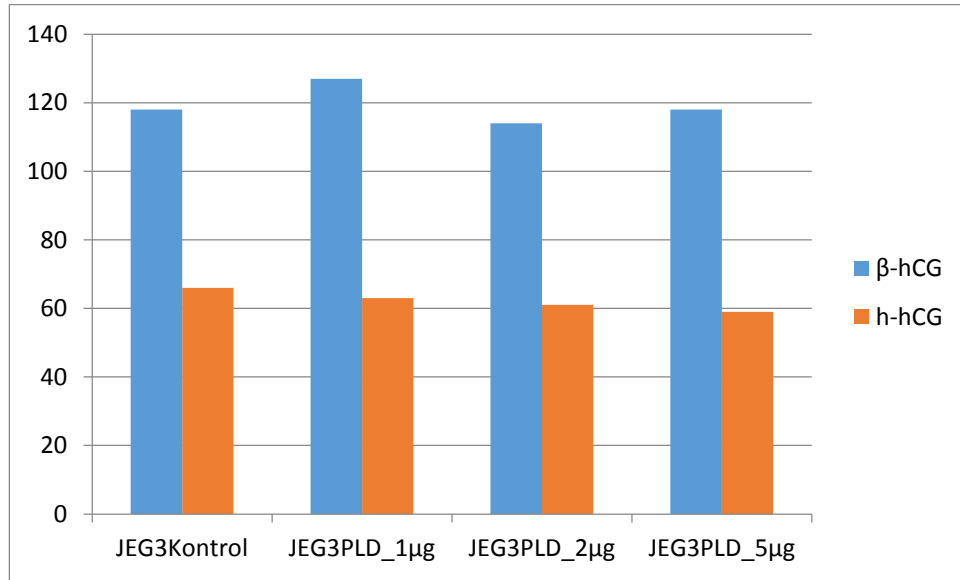
Tablo 9. LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri p<0,05

JEG-3	PLD1/ Kontrol	PLD2/ Kontrol	PLD5/ Kontrol	PLD1/ PLD2	PLD1/ PLD5	PLD2/ PLD5
p	,001	,000	,001	,001	,001	,094

Anlamlılık değeri p<0,05 alındığında;

Sadece PLD_2 µg/ml ile PLD_5 µg/ml arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yok (p=0,094). Diğer gruplar arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var.

Şekil 14. LD verildiğinde JEG-3 hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri



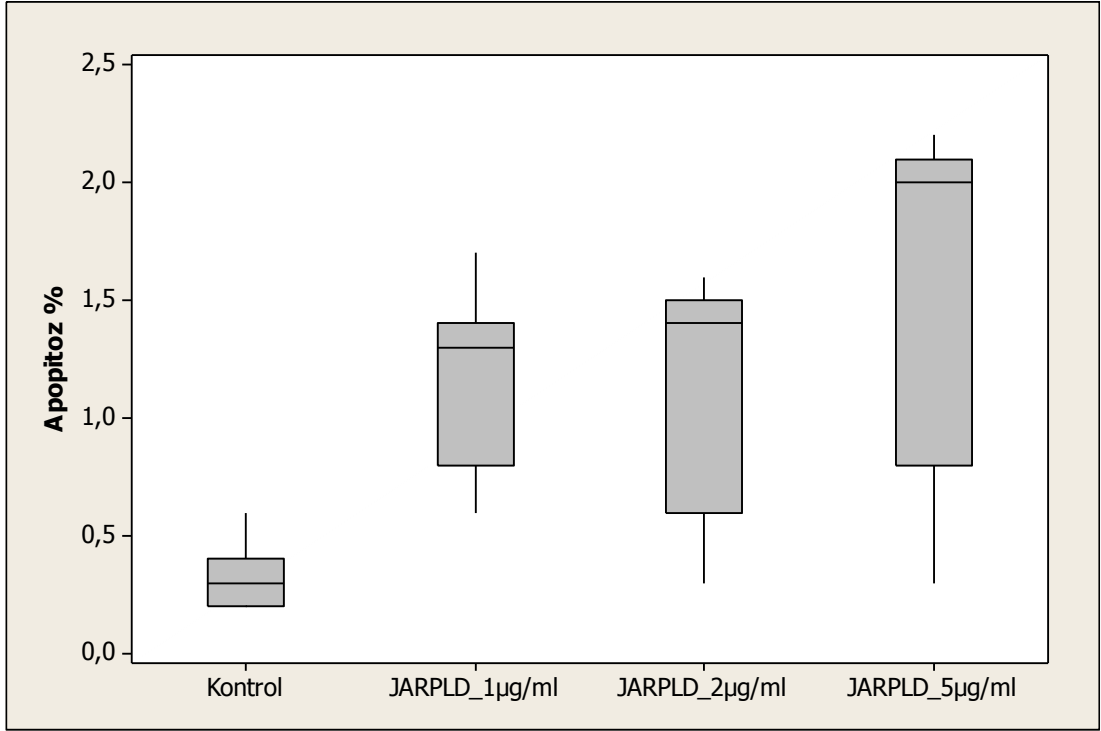
Tablo 10. LD verildiğinde JEG-3 hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri

	β-hCG	h-hCG
JEG-3 Kontrol	118	66
JEG-3 PLD 1 µg/ml	127	63
JEG-3 PLD 2 µg/ml	114	61
JEG-3 PLD 5 µg/ml	118	59

β-hCG ve h-hCG düzeylerinde PLD'nin dozu ile orantılı bir değişiklik izlenmemiştir.

4.4. LD'nin JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri

Şekil 15. LD'nin JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi



Tablo 11. LD'nin artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı

	Median (Min-Max)
JAR Kontrol	0,3 (0,6-0,2)
JAR PLD_1 µg/ml	1,3 (0,6-1,7)
JAR PLD_2 µg/ml	1,4 (0,3-1,6)
JAR PLD_5 µg/ml	2 (0,3-2,2)

24 saat muamele sonunda Pegile Lipozomal Doksorubisin (PLD)'in 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %1,3'dür. 2 µg/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %1,4, 5 µg/ml'lik muamelesi sonucu ise %2'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır (p=0,003).

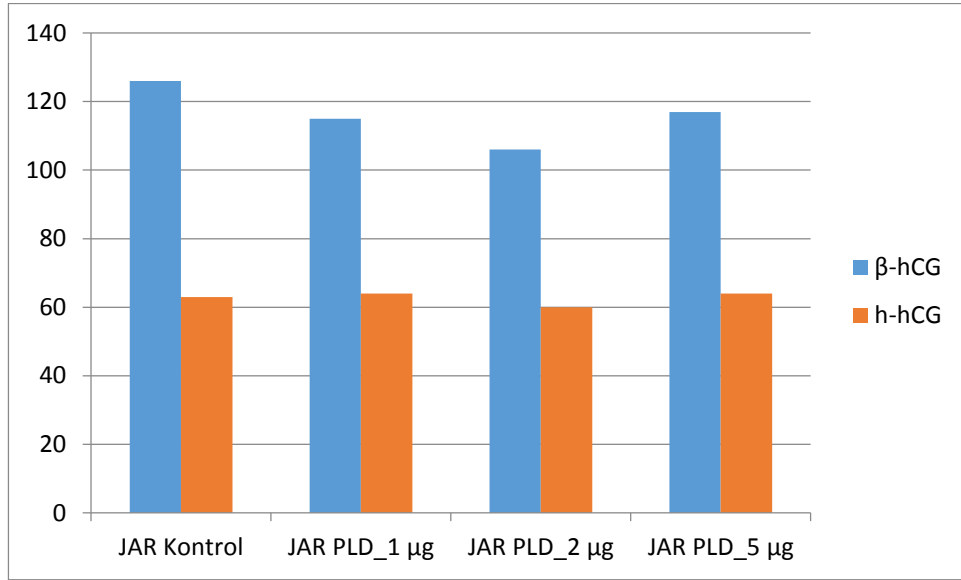
Tablo 12. LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri p<0,05

JAR	PLD1/ Kontrol	PLD2/ Kontrol	PLD5/ Kontrol	PLD1/ PLD2	PLD1/ PLD5	PLD2/ PLD5
p	,001	,007	,004	,805	,165	,128

Anlamlılık değeri p<0,05 alındığında;

Kontrol grubu ile PLD_1 µg/ml, PLD_2 µg/ml ve PLD_5 µg/ml arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var. Dozlar arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yok.

Şekil 16. LD verildiğinde JAR hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri



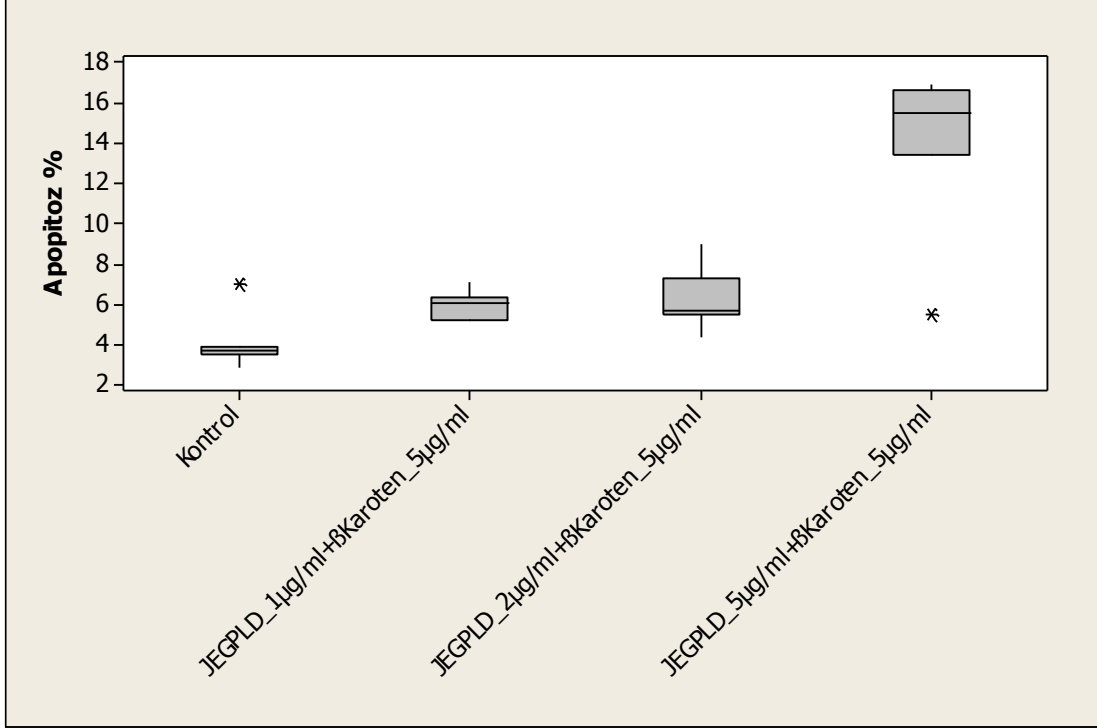
Tablo 1. LD verildiğinde JAR hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri

	β-hCG	h-hCG
JAR Kontrol	126	63
JAR PLD 1 µg/ml	115	64
JAR PLD 2 µg/ml	106	60
JAR PLD 5 µg/ml	117	64

β-hCG ve h-hCG düzeylerinde PLD'nin dozu ile orantılı bir değişiklik izlenmemiştir.

4.5. Karoten ile Birlikte Kullanılan LD'nin JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri

Şekil 17. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi



Tablo 2. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı

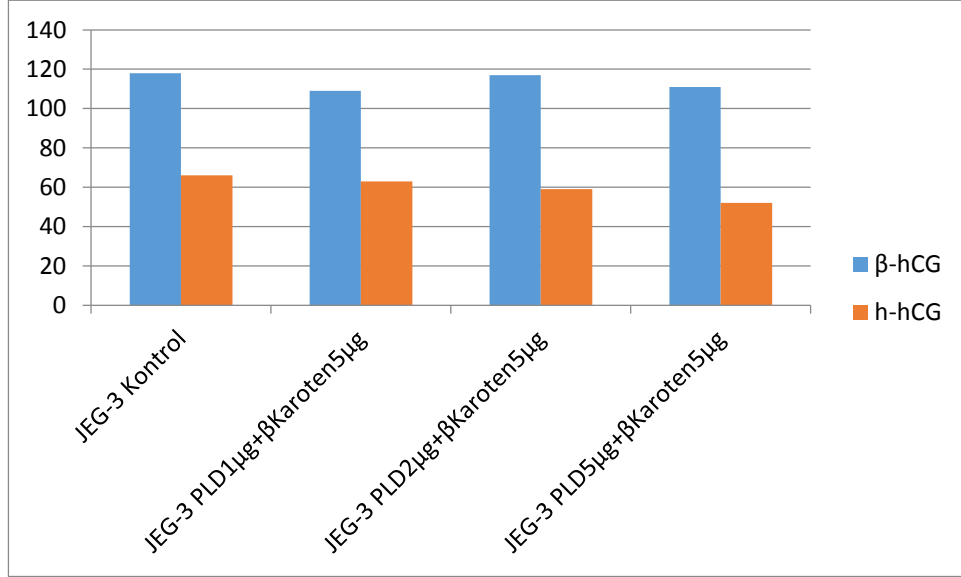
	Median (Min-Max)
JEG-3 Kontrol	3,7 (2,9-7)
JEG-3 PLD_1 µg/ml + β-Karoten_5 µg/ml	6,1 (5,2-7,1)
JEG-3 PLD_2 µg/ml + β-Karoten_5 µg/ml	5,7 (4,4-9)
JEG-3 PLD_5 µg/ml + β-Karoten_5 µg/ml	15,5 (5,5-17)

24 saat muamele sonunda 5 µg/ml β-Karoten ile birlikte kullanılan PLD'nin 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %6,1'dir. 2 µg/ml'lik PLD ile birlikte sonucu apoptoz oranı %5,7, 5 µg/ml'lik PLD ile birlikte sonucu apoptoz oranı %15,5'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır (p=0,001).

Tablo 3. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JEG-3	PLD1 + β-Karoten5/ Kontrol	PLD2 + β-Karoten5/ Kontrol	PLD5 + β-Karoten5/ Kontrol	PLD1 + β-Karoten5 / PLD2 + β-Karoten5	PLD1 + β-Karoten5/ PLD5 + β-Karoten5	PLD2 +β- Karoten5 / PLD5 +β- Karoten5
p	,017	,011	,001	,902	,011	,011

Şekil 18. Karoten ile birlikte LD verildiğinde JEG-3 hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri



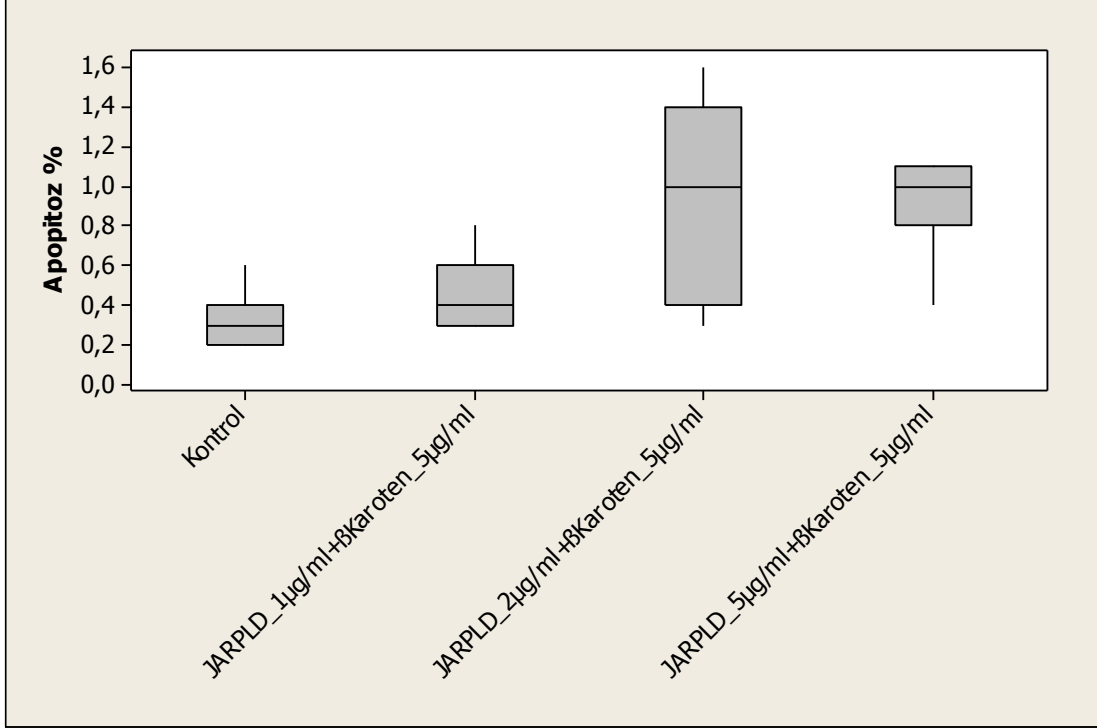
Tablo 4. Karoten ile birlikte LD verildiğinde JEG-3 hücre hattında β-hCG ve h-hCG düzeyleri

	β-hCG	h-hCG
JEG-3 Kontrol	118	66
JEG-3 PLD 1 μg/ml + β-Karoten 5 μg/ml	109	63
JEG-3 PLD 2 μg/ml + β-Karoten 5 μg/ml	117	59
JEG-3 PLD 5 μg/ml + β-Karoten 5 μg/ml	111	52

β-hCG ve h-hCG düzeylerinde de PLD'nin dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

4.6. Karoten ile Birlikte Kullanılan LD'nin JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri

Şekil 19. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi



Tablo 5. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı

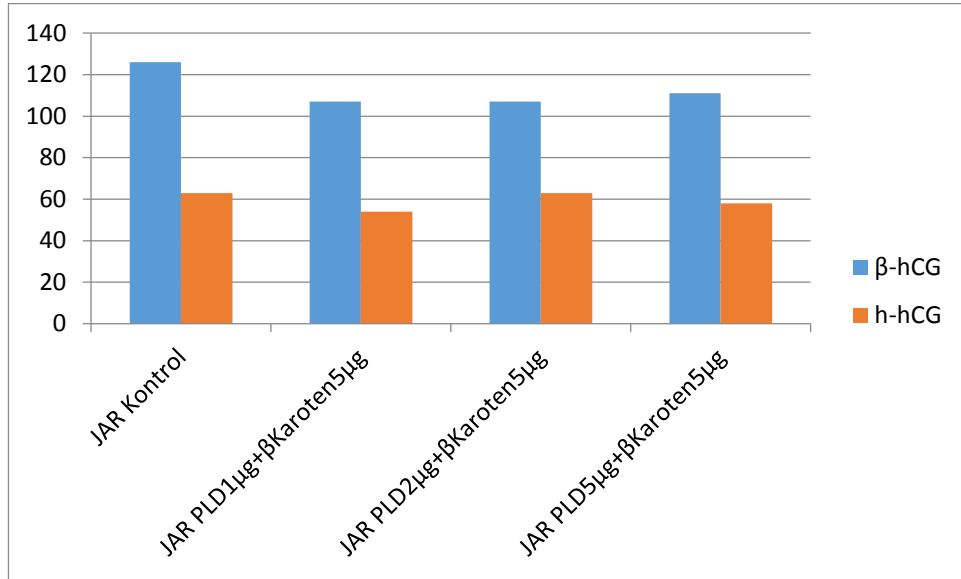
	Median (Min-Max)
JAR Kontrol	0,3 (0,2-0,6)
JAR PLD_1 µg/ml+ β-Karoten_5 µg/ml	0,4 (0,3-0,8)
JAR PLD_2 µg/ml+ β-Karoten_5 µg/ml	1 (0,3-1,6)
JAR PLD_5 µg/ml+ β-Karoten_5 µg/ml	1 (0,4-1,1)

24 saat muamele sonunda 5 µg/ml β-Karoten ile birlikte kullanılan PLD'nin 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %0,4'dir. 2 µg/ml'lik PLD ile birlikte sonucu apoptoz oranı %1, 5 µg/ml'lik PLD ile birlikte sonucu apoptoz oranı %1'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır (p=0,003).

Tablo 6. Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JAR	PLD1 + β -Karoten5/ Kontrol	PLD2 + β -Karoten5/ Kontrol	PLD5 + β -Karoten5/ Kontrol	PLD1 + β -Karoten5 /PLD2 + β - Karoten5	PLD1 + β - Karoten5 /PLD5 + β -Karoten5	PLD2 + β - Karoten5 /PLD5 + β - Karoten5
p	,165	,011	,001	,053	,007	,710

Şekil 20. Karoten ile birlikte LD verildiğinde JAR hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri



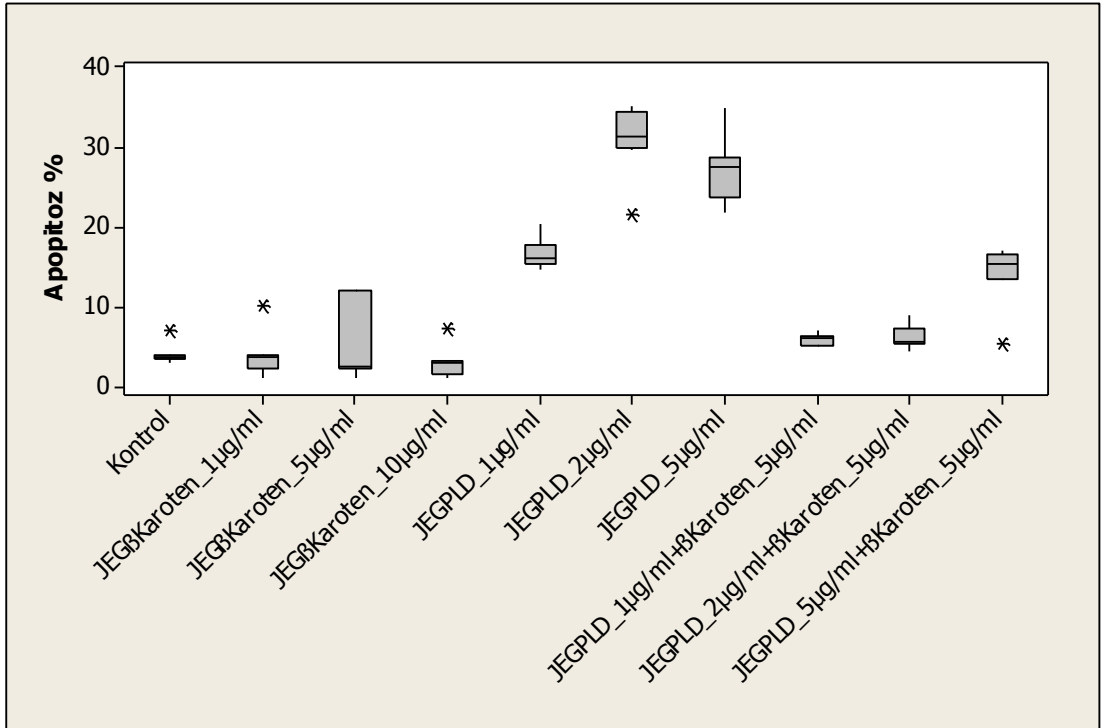
Tablo 7. Karoten ile birlikte LD verildiğinde JAR hücre hattında β -hCG ve h-hCG düzeyleri

	β -hCG	h-hCG
JAR Kontrol	126	63
JAR PLD 1 μ g/ml + β -Karoten 5 μ g/ml	107	54
JAR PLD 2 μ g/ml + β -Karoten 5 μ g/ml	107	63
JAR PLD 5 μ g/ml + β -Karoten 5 μ g/ml	111	58

β -hCG ve h-hCG düzeylerinde de PLD'nin dozu ile orantılı bir düşüş izlenmemiştir.

4.7. Tek Başına ve Karoten ile Birlikte Kullanılan LD'nin JEG Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkilerinin Karşılaştırılması

Şekil 21. Tek başına ve Karoten ile birlikte kullanılan LD'in JEG-3 hücre hattı üzerine apoptotik etkilerinin grafiksel karşılaştırılması

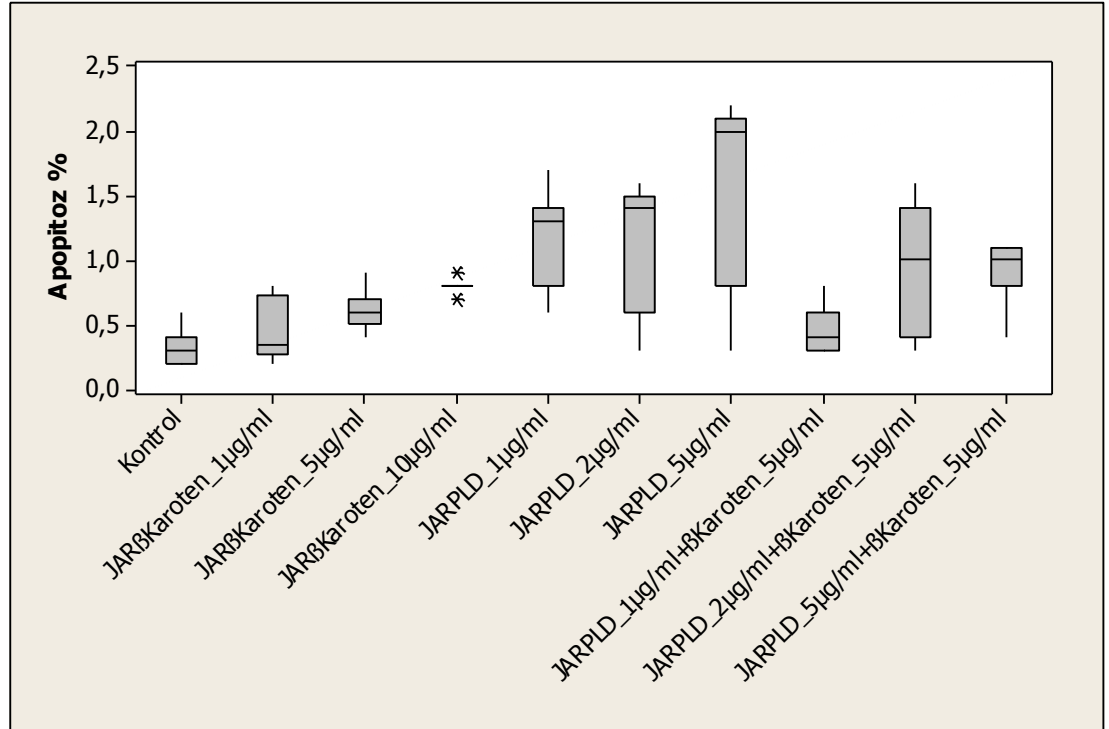


Tablo 20. Tek başına ve Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JEG	PLD1/PLD1+ β -Karoten5	PLD2/PLD2 + β -Karoten5	PLD5/PLD5 + β -Karoten5
p	,002	,535	,128

4.8. Tek Başına ve Karoten ile Birlikte Kullanılan LD'nin JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkilerinin Karşılaştırılması

Şekil 22. Tek başına ve Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin JAR hücre hattı üzerine apoptotik etkilerinin grafiksel karşılaştırılması



Tablo 21. Tek başına ve Karoten ile birlikte kullanılan LD'nin artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JAR	PLD1/PLD1 + β -Karoten5	PLD2/PLD2 + β -Karoten5	PLD5/PLD5 + β -Karoten5
p	,001	<,001	,001

5. TARTIŞMA

Hücre kültürü çalışmaları, özellikle yeni ilaç adaylarının etkilerinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bu sayede ilaç adaylarının bilinen ya da etki etmesi düşünülen moleküler hedefler üzerinde yol açtıkları etkiler tespit edilebilmekte; ilacın hedef dokuda yaratacağı etkiler öngörülebilmektedir. Geliştirilmiş kanser ilaç bileşenlerinin hücre fenotipinde meydana getirdiği değişiklikler nedeni ile yenilenen tümör büyümesi, klinik uygulamalarda beklenmeyen sonuçların alınmasına neden olmaktadır. Klinikte görülen bu sonuçların nedenlerinin tahmin edilebilmesi için insan tek tabakalı kanser hücre hatlarının kullanımı oldukça yaygındır ve önemli bir belirleyicidir (134; 135). Çalışmalar farklı hücre hatları üzerinde yapılmaktadır. Bu durum primer tümörlerde meydana gelen genomik değişimler hakkında geniş veritabanı oluşumuna, hedeflenen inhibitöre yönelik tepkilerin belirlenmesine ve klinik bulguların açıklanabilmesine de olanak sağlamaktadır (136).

Gestasyonel trofoblastik hastalık (GTH)'lar fetal koryondan kaynaklanan ve birbiri ile ilişkili hastalıklar zincirini ifade etmekte olup genellikle spontan rezolüsyon ile sonuçlanan benign HM'dan, hayatı tehdit eden koryokarsinoma kadar değişkenlik gösteren geniş bir spektruma sahiptir (1).

β -karoten, tek değerlikli oksijen radikallerini bağlayan serbest radikal (peroksil radikal) tutucu bir antioksidan olmasının yanı sıra, kimyasal karsinogenezi de önler. Bu etkisini, diğer antioksidanlardan farklı olarak karsinogen ajanlarla çapraz bağlar kurup, DNA çift zincirinin replikasyon sonrası tamir kapasitesini arttırıp, DNA hasarını baskılayarak gerçekleştirir (137). Daha önceki in vitro çalışmalarda β -karoten ve folik asitin değişik hücre tiplerinde proapoptotik ajanların uyardığı apoptozisin geri dönüşümünde ve kardeş kromatid değişiminin azaltılmasında rol aldığı gösterilmiştir (138; 139). ATRA, 9-cis retinoik asit gibi β -karoten yıkım ürünleri olan vitamin A analogları, klinikte birçok dermatolojik, hematopietik ve kanser tedavilerinde kullanılmaktadırlar.

Kemoterapötik ajan olarak kullanılabilen ATRA'nın;

- TGF- β gibi supresör büyüme faktörlerini indükleyerek,
- AP-1 (aktivasyon protein-1) aktivitesini represe edilerek,
- G1 fazına spesifik olan gen ekspresyon düzenlemelerini yaparak, etki ettiği bilinmektedir (140).

Retinoik asitler epitelyal dokularda gelişim ve onarımdan sorumludur. Bazı kanser hücrelerinde de çoğalmayı ve hücre gelişimini engellemektedirler. Retinoik asitler akciğer, lösemi, cilt, göğüs, prostat, over kanseri gibi birçok kanser türünde hem tedavi hem de koruma amaçlı kullanılmaktadır. Ancak retinoik asitlerin kanser hücre büyümesini nasıl inhibe edebildiği tam olarak anlaşılamamıştır. Anti tümör etkilerini retinoik asitler tümör hücrelerinin farklılaşmasını indükleyerek göstermektedirler. Retinoik asit reseptörleri ve retinoid X reseptörleri aracılığı ile ya da sitoplazmada bulunan hücrel retinoik asit bağlayıcı proteinler üzerindeki gen ekspresyonlarına etki ederek nükleustaki farklılaşmayı gerçekleştirmektedirler. Bu sayede metabolizmaları ve hücreye alınimleri değişmektedir (141).

Retinoidlerin etkilediği birçok reseptör ve gen ekspresyon yolları, retinoidlerin birçok hücrel süreçte etkin olarak rol aldığına göstergesidir. MCF-7 (meme kanseri hücre hattı) ve MGC80-3 (mide kanseri hücre hattı) hücre hatlarında β -karoten'in hücrelerin büyümesini inhibe ettiğini Fields ve ark. saptamışlardır. Yine aynı çalışmada ATRA ile muamele edilen hücrelerde apoptoz belirtileri olan, nükleus kondensasyonunun ve kromatin fragmentasyonunun açık olarak görüldüğünü bildirmişlerdir (142). RL92-2 (Endometriyum kanser hücre hattı) ile yapılan çalışmada retinoik asitlerin tirozin fosfatlayıcı proteinleri inhibe ettiğini rapor ettiği bulgularına dayanarak sinyal iletiminden sorumlu tirozin kinazların anti-kanser ilaç gelişiminde hedef olarak alınabileceği rapor etmişlerdir (143).

β -karoten güçlü bir antioksidandır ve süperoksit dismutazın etkisini artırarak serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasını engeller ve böylece oksidatif stres azaltılmış olur (99). Ayrıca oksidatif stresin de HM etiyopatogenezinde önemli bir rola sahip olduğu çeşitli çalışmalarla saptanmıştır (40; 41; 42). Bu çalışmalar GTH etiyopatogenezinde oksidatif stresin önemini göstermektedir. Bu bilgiler ışığında β -karoten'in oksidatif stresi azaltarak GTH üzerinde etki edebileceği düşünülebilir.

Alija ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada oksidatif stres altında rat hepatositlerinde beta-karotenin tek başına kullanıldığı kardeş kromatid değişimi çalışmasında sitotoksik ve genotoksik etki gözlenmezken, beta-karotenin parçalanma ürünlerinin ve apo-8-beta-karotenal'in kullanılması sonucunda genotoksik etkinin olduğu gösterilmiştir. Hipoksi reoksijenasyon tarafından uyarılan oksidatif streste beta-karoten eklenmesinin beta-karoten parçalanma ürünlerini oluşturduğu ve bununla birlikte genotoksitenin arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular, beta-karotenin klinik etkisi ve kanserden korunma çalışmalarında çelişkili sonuçlar vermesini açıklamaya yardımcı sonuçlar sunmaktadır (144; 145).

Gloria ve arkadaşları MCF-7, MDA-231 ve MDA-235 (meme kanseri hücre hattı) hücre hatlarında 0,5, 1, 2,5, 5, 10 µM dozlarında β-karoten kullanımının doz bağımlı olarak apoptozisi ve nekrozu arttırıcı etkilerinin olduğunu saptamışlardır (146).

LD, doksorubisin hidrokloridin pegile lipozomlar içerisine gömülmesiyle oluşturulmuş uzun salınımlı bir formülasyondur. Bu formül artmış kardiyak riskli metastatik meme kanseri hastalarında, platinum bazlı kemoterapinin başarısız olduğu ileri over kanseri olgularında ve kaposi sarkomu ile ilişkili kazanılmış immün yetmezlik sendromlarında kullanılır (147). Doksorubisinin lipozomlar içerisine gömülmesi ilacın farmokinetik ve biyodağılımında değişikliğe, toksik etkilerin azalmasına neden olur (148).

Yang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada MCF-7 meme adenokarsinoma hücrelerinde doksorubisin direnci hücrelerde multipl nükleus oluşumunun ve sitoplazmik morfolojik değişikliklerin gösterilmesiyle saptamıştır (149).

Wang S. ve arkadaşları doksorubisin'in 0,5 µM gibi düşük dozlardan başlayarak PA-1 ovaryen teratokarsinom hücreleri ve MCF-7 hücreleri üzerinde apoptozun başlamasını indüklediğini göstermişlerdir (150).

Osman Abdel-M. ve arkadaşları MCF-7 hücreleri üzerinde doksorubisin'in 0,25 µg/ml'de %78 erken apoptoza, resveratrol'ün 15 µg/ml'de %76 erken apoptoza, kombine doz kullanımında ise %90 erken apoptoza neden olduklarını göstermiştir (151).

Saul ve arkadaşları KB, C6 glioma hücreleri ve E9 korteks hücrelerinde 10 µM dozunda lipozomal doksorubisin kullanarak folik asit reseptörlerinin varlığını göstermişlerdir (152). Benzer şekilde Lee ve arkadaşları HeLa ve WI38 epitelyal kanser

hücrelerinde 10 µM, 20 µM ve 50 µM dozunda LD ve 20 µM folik asit kullanarak folat pegile lipozom komplekslerinin varlığını göstermiş ve bu komplekslerin kanser hücrelerini hedef alma yönünden daha yüksek afiniteye sahip olduklarını saptamışlardır (153).

Çeşitli ilaçların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri nekroz ve apoptoz olmak üzere iki yol üzerinden gerçekleşir. Kanser tedavisinde kullanılan veya kullanılacak ilaçların sitotoksik etkilerinin apoptotik yol üzerinden gerçekleştiğinin gösterilmesi tercih edilen bir özelliktir. Çünkü kanserin ortaya çıkışını tetikleyen önemli mekanizmalardan biri kanserleşmeye doğru yol alan normal bir hücrenin apoptotik mekanizmalarının bozulması ve hücrenin anti-apoptotik sinyal yollarının apoptotik yollar üzerine hakim bir konuma geçmesidir.

EMA-CO protokolüne direnç geliştiren hastalarda geliştirilmiş bir başka standart protokol bulunmamaktadır. Karoten'in ve LD'nin günümüzde koryokarsinom üzerinde klinik kullanımına yönelik literatürde herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, Karoten ve LD'nin kombine kullanımına bağlı olarak gözlenen apoptotik etkinin varlığı, sinerjistik etkinin olup olmadığının araştırılması son derece önemlidir. Bu çalışmada JAR ve JEG-3 hücrelerinde apoptozun derecesi FCM ile belirlendi.

Çalışmamızda 1µg/ml β-Karoten JEG-3 hücrelerinde tek başına kullanıldığında apoptoz oranı %3,7'dir. 5µg/ml'de %2,5, 10µg/ml'de ise %2,9'dur. JAR hücrelerinde bu oranlar 1µg/ml β-Karoten için %0,35, 5µg/ml'de %0,6, 10µg/ml'de ise %0,8'dir.

PLD'nin 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %16,1'dir. 2 µg/ml'de %31,4, 5 µg/ml'de %27,5'dir. PLD'nin JAR hücrelerindeki apoptoz oranı 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %1,3'dür. 2 µg/ml'de %1,4, 5 µg/ml'de %2'dir.

5µg/ml β-Karoten ile birlikte kullanılan PLD'nin 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %6,1'dir. 2 µg/ml'de oran %5,7, 5 µg/ml'de %15,5'dir. Yine 5 µg/ml β-Karoten ile birlikte kullanılan PLD'nin 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu bu kez JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %0,4'dür. 2 µg/ml'de %1, 5 µg/ml'de %1'dir.

Yaptığımız çalışmada β-Karoten'in tek başına artan dozlarla kullanıldığında JAR hücre serileri üzerinde ki apoptotik etkilerinin istatistiksel olarak arttığını ancak JEG-3 hücre serileri üzerinde ki apoptotik etkilerinin istatistiksel olarak artmadığını

gözlemledik. PLD'nin tek başlarına artan dozlarla kullanıldıklarında hem JAR hem JEG-3 hücre serileri üzerinde ki apoptotik etkilerinin de arttığını istatistiksel olarak gözlemledik.

Bu iki ilaç kombine edilip β -Karoten dozu sabit tutulurken PLD'nin dozu arttırıldığında JAR ve JEG-3 hücre serisinde apoptotik etkinin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür.

İnsan Koryokarsinom hücre hattı modelleri olan JAR ve JEG-3 üzerinde β -Karoten ve PLD kombinasyon uygulaması ve immünoenzimatik yöntemle β -hCG ve h-hCG ölçümü her iki hücre hattında birden literatürde ilk kez yapılmıştır. Elde edilen bu sinerjistik apoptotik veriler, β -Karoten ve PLD kombinasyonunun Koryokarsinom tedavisinde karşılaşılan çoklu ilaç direnciyle mücadelede kullanılabilecek seçeneklerden biri olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmada vitamin A türevlerinden olan β -Karoten'in ve PLD'nin, tek başlarına JAR ve JEG-3 hücre hattında doza bağlı olarak etki gösterdikleri saptanmıştır. β -Karoten ve PLD'nin kombinasyonunda JAR ve JEG-3 hücrelerinde doza bağlı olarak apoptoza neden olmuştur.

Sonuçlar PLD'in klasik kemoterapötiklerin başarısız olduğu koşullar için tek başına ve/veya β -Karoten ile oluşturulacak çoklu ilaç kombinasyon tedavisi için iyi bir seçenek olabileceğini desteklemektedir. Ancak ilaçların etkileri ve kombinasyonlarındaki etkilerin in vivo sistemlerde farklı olabileceğinden, veriler ilk olarak hayvan deneyleri ve sonra klinik araştırmalarla da desteklenmelidir.

7. KAYNAKÇA

1. Rustin GJS. Trophoblastic diseases. In: Shaw RW, Soutter WP, Eds. Gynaecology. 2nd Ed., London: Churchill Livingstone; 1997: 605-614.
2. L.A. Cole, S.A. Butler, S.A. Khanlian, A. Giddinbgs, M.J. Seckl, E.I. Kohorn Gestational trophoblastic diseases: 2. Hyperglycosylated hCG as a reliable marker of active neoplasia Gynecol. Oncol., 102 (2006), pp. 150–158.
3. Mazur MT, Kurman RJ. Gestational trophoblastic disease. In: Kurman RJ Eds. Blaustein's Pathology of Female Genital Tract. 4th Ed., New York: Springer-Verlag 1994; 1049-1093.
4. Chytil F. Retinoids in lung development. FASEB J. 1996; 9: 986-92.
5. Singh S, Padmanabhan R, Singh G, Kaur G. Effect of maternal hypervitaminosis A during late gestation on pre- & postnatal lung maturation in rat. Indian J Exp Biol. 1983; 3:103-7.
6. Packer, L. (1990). Methods in Enzymology, "Retinoids" Episode A, Academic Press, San Diego, 13, 16, 43-50.
7. Miller, W.H. (1998) The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. Cancer, 83, 1471-1482.
8. Effect of all-trans retinoic acid on tissue dynamics of choriocarcinoma cell lines: an organotypic model Chiu PM, Feng HC, Benbrook DM, Ngan HY, Khoo US, Xue WC, Tsao SW, Chan KW, Cheung AN. J Clin Pathol. 2006
9. Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease Gilbert S. Omenn, M.D., Ph.D., Gary E. Goodman, M.D., M.S., Mark D. Thornquist, Ph.D. N Engl J Med 1996; 334:1150-1155, May 2, Mayo Clinic

10. Frederick, C.A.; Williams, L.D.; Ughetto, G.; van der Marel, G.A.; van Boom, J.H.; Rich, A.; Wang, A.H. Structural Comparison of Anticancer Drug-DNA Complexes: Adriamycin and Daunomycin. 1990, *Biochemistry*, 29, 2538 – 25497
11. Pigram, W.J.; Fuller, W.; Hamilton, L.D. Stereochemistry of Intercalation: Interaction of Daunomycin with DNA. 1972, *Nature New Biology*, 235, 17 – 19.
12. Payne AS, James WD, Weiss RB. Dermatologic toxicity of chemotherapeutic agents. *Semin Oncol* 2006;33(1):86-97.
13. Lotem M, Hubert A, Lyass O, Goldenhersh MA, Ingber A, Peretz T, et al. Skin toxic effects of polyethylene glycol-coated liposomal doxorubicin. *Arch Dermatol* 2000;136(12):1475- 80
14. Gabizon A, Martin F. Polyethylene glycolcoated (pegylated) liposomal doxorubicin. Rationale for use in solid tumours. *Drugs* 1997;54 (Suppl 4):15-21.
15. Özalp S, Yalçın ÖT, Tanır HM. Hydatidiform mole in Turkey from 1932 to 2000. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 73:257-8.
16. Özalp S, Metintaş S, Arslantaş D, Işıklı B, Kalyoncu C ve ark. Frequency of hydatidiform mole in the rural part of Eskişehir, Turkey. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2003; 24(3-4):315-6.
17. Palmer JR. Advances in the epidemiology of gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 1994;39:155-162 .
18. Semer DA, Macfee MS. Gestational trophoblastic disease: Epidemiology. *Semin Oncol*. 1995;22:109-113.
19. Harma M, Harma M, Yurtseven S, Gungen N. Gestational trophoblastic disease in Sanliurfa, southeast Anatolia, Turkey. *Eur J Gyneacol Oncol* 2005; 26: 306-8.
20. Özalp S, Yalcın OT, Tanir HM. Hydatidiform mole at extreme ages of reproductive life in a developing country from 1932 to 2000. *Eur J Gynecol Oncol*. 2002; 23(4):361-2.

21. Özalp S, Yalçın OT, Elmas E. Elli iki yaşında mol hidatidiform olgusu. Jinekoloji ve Obstetrik Bülteni. 2000;9(1):26-28.
22. Sand PK, Lurain JR, Brewer JI. Repeat gestational trophoblastic disease. Obstet Gynecol. 1984;63:140-5.
23. Oge T, Ozalp SS, Güngör T, Yildirim Y, Sancı M, Dogan A, Ertas IE, Yetimlar H, Dilek S, Celik C. Hydatidiform mole in Turkey: results from six centers. J Reprod Med. 2012 May-Jun;57(5-6):259-61.
24. Özalp S, Yalçın OT, Tanir HM, Etiz E. Recurrent molar pregnancy: report of a case with seven consecutive hydatidiform moles. Gynecol Obstet Invest 2001;52(3):215-6.
25. Kösebay D., Demirkıran F.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda epidemiyoloji, içinde: GTH özel sayısı, Özalp S. (Ed.), Kadın doğum dergisi, 2005; Ek 2:96-105.
26. Bracken MB, Brinton LA, Hayashi K. Epidemiology of hydatidiform mole and choriocarcinoma. Epidemiol Rev. 1984;6:52-75.
27. Grimes DA. Epidemiology of gestational trophoblastic disease. Am J Obstet Gynecol. 1984;150:309.
28. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Yurtseven S, Demir N. Serum levels of folate, vitamin B12 and homocysteine in complete hydatidiform mole. J Reprod Med. 2004 Apr; 49(4):285-8.
29. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Keles H. Serum levels of zinc and copper in hydatidiform mole. Arch Gynecology and Obstetrics. 2005 Apr;271(4):304-6. Epub 2004 Mar 10. .
30. Parazzini F, La Vecchia C, Mangili G, et al. Dietary factors and risk of trophoblastic disease. Am Obstet Gynecol 1988;158:93-99.
31. Berkowitz RS, Cramer DW, Bernstein MR, et al. Risk factors for complete molar pregnancy from a case control study. Am J obstet Gynecol 1985;52:1016-1020.

32. Wolf NG, Lage JM: Genetic analysis of gestational trophoblastic disease: A review. *Semin Oncol*, 22:113, 1995.
33. Özalp S. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları No. 76, Anadolu Üniversitesi Basım Evi, 1989.
34. Vang R, Gupta M, Wu LS, Yemelyanova AV, Kurman RJ, Murphy KM, Descipio C, Ronnett BM. Diagnostic reproducibility of hydatidiform moles: ancillary techniques (p57 immunohistochemistry and molecular genotyping) improve morphologic diagnosis. *s.l. : Am J Surg Pathol* 2012;36:443-453.
35. Weaver DT, Fisher RA, Newlands ES, Paradinas FJ. Amniotic tissue in complete hydatidiform moles can be androgenetic. *J Pathol* 2000; 191:67–70.
36. Öner Ü. Paşaoğlu Ö.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda Patoloji, Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar Özel sayısı, Özalp S.(ed.), Kadın Doğum Dergisi,2005;Ek 2:110-127.
37. Mazur MT, Kurman RJ. Gestational trophoblastic disease and related lesions. In: Kurman RJ.ed. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. 4. Baskı, Newyork: Springer-Verlag, 1994:1055-67.
38. Reedline RW, Abdulkarim FW. Pathology of gestational trophoblastic disease.*Semin Oncol*. 1995;22:96-103.
39. Öner Ü. Komplet ve parsiyel mol hidatidiformda patolojik bulgular. In: Özalp S. ed. *Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar*. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi, 1997:39-58.
40. Harma M, Harma M. Defective placentation and resultant oxidative stress play a similar role in complete hydatidiform mole to that in preeclampsia and early pregnancy loss. *Med Hypotheses* 2006; 66: 100-2.

41. Harma M, Harma MI, Kocyigit A: Comparison of protein carbonyl and total plasma thiol concentrations in patients with complete hydatidiform mole with those in healthy pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004, 83: 857-860.
42. Harma M, Harma MI, Erel O: Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* 2003,133: 563-566.
43. Barut A, Harma M, Arikan I, Harma MI, Barut F: Endothelial nitric oxide synthase expression in gestational trophoblastic diseases. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Apr;20(3):337-40.
44. Harma M, Harma M, Koçyiğit A, Güngen N, Köylü AA, Demir N. Altered arginine metabolism in complete hydatiform mole. *Artemis* 2004; 5: 131-134.
45. Harma M, Harma MI, Kocyigit A, Demir N: Role of plasma nitric oxide in complete hydatidiform mole. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004, 25: 333-335.
46. Harma M, Harma MI, Kocyigit A, Erel O (2005) Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *Mutat Res* 583: 49–54.
47. L.A. Cole Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites *Clin. Chem.*, 43 (1997), pp. 2233–2243.
48. A kinetic comparison of the processing and secretion of the alpha beta dimer and the uncombined alpha and beta subunits of chorionic gonadotropin synthesized by human choriocarcinoma cells *J. Biol. Chem.*, 259 (1984), pp. 15123–15130. B.P. Peters, R.F. Krzesicki, R.J. Hartle, F. Perini, R.W. Ruddon.
49. R.O. Husa Immunologic and physical characterization of human chorionic gonadotropin and its subunits in cultures of human malignant trophoblast *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44 (1977), pp. 1154–1162.
50. L.A. Cole, R.O. Husa The carbohydrate on human chorionic gonadotropin produced by cancer cells *Adv. Exp. Med. Biol.*, 176 (1984), pp. 245–270.

51. L.A. Cole O-glycosylation of proteins in the normal and neoplastic trophoblast *Trophobl. Res.*, 2 (1987), pp. 139–148.
52. S. Imamura, G.A. Armstrong, S. Birken, L.A. Cole, R.E. Canfield Detection of desialylated forms of human chorionic gonadotropin *Clin. Chim. Acta*, 163 (1987), pp. 339–349.
53. Paşaoğlu Ö. Koryokarsinom ve plasental yerleşim bölgesinde gelişen trofoblastik tümörlerde patolojik bulgular. In: Özalp S. ed. *Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar*. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi, 1997:59-75.
54. Güner H. Tanı ve izlemde insan koryonik gonadotropini ve diğer hormonal yöntemler. *Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar*. Özalp S, ed., *Kadın doğum dergisi* 2005; ek 2:128-134.
55. Özalp S.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda izlem. *T Klinikleri Jinekoloji ve obstetri*, 14(3):182-186, 2004.
56. Tyrey L. Human Chorionic Gonadotropin: Properties and assay methods. *Semin Oncol*. 1995;22:121-129.43.
57. Berkowitz RS, Goldstein DP. Gestational trophoblastic neoplasia. *Practical Gynecologic Oncology*. Berek JS, Hacker NF, ed, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2000, s. 615-638.
58. Goldstein DP, Berkowitz RS. Prophylactic chemotherapy of complete molar pregnancy. *Semin Oncol* 1995;22: 157-160.
59. Prevention of postmolar GTN using prophylactic single bolus dose of Actinomycin D in high-risk HM: a simple, effective, secure and low-cost approach without adverse effects on compliance to general follow-up or subsequent treatment. . Uberti EM, Fajardo Mdo C, DA Cunha AG, Rosa MW, Ayub AC, Graudenz Mda S, Schmid H. s.l. : *Gynecol Oncol*. 2009;114: 299-305.
60. Ayhan A, Özalp S. Benign trofoblastik Hastalıklar (Hydatidiform mole) 100 olgunun klinik incelenmesi. *Hacettepe Tıp / Cerrahi Bülteni*. 1982;15(1):56-62.

61. Özalp S, Hassa H, Şener T, Minsin T. Elli dokuz mol hidatidiform olgusunun değerlendirilmesi. Jinekoloji ve Obstetrik Bülteni. 1998;7(2):51-56.
62. Lurain JR, Brewer JI, Torok EE, Halpem B. Natural history of hydatidiform mole after primary evacuation. Am J Obstet Gynecol. 1983;145:591-5.
63. Özalp S., Gestasyonel trofoblastik neoplaziler, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi, Ed.:Çiçek N.,Akyürek C., Çelik Ç., Haberal A. Güneş Kit., Ankara,2006,1261-1271.
64. Kohorn EI. Negotiating a staging and risk factor scoring system for gestational trophoblastic neoplasia: a progress report. J Reprod Med 2002;47:445-450.
65. Kohorn EI. The FIGO 2000 staging and risk factor scoring system for gestational trophoblastic neoplasia. In Hacker RF Eds. 2nd Ed, Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecologic Cancers. Elsevier 2002; 122-145.
66. Gestational Trophoblastic Disease: World Health Organization. Technical Report Series 692, WHO, Geneva, 1983.
67. Soper JT. Surgical therapy for gestational trophoblastic disease. JRM. 1994;39:168-74.
68. Özalp S.: Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Cerrahi yaklaşım. Jinekolojik ve obstetrikal cerrahi. Güneş Kitapevi, Ankara, 2005, 995-1000.
69. Xiang Y, Yang X, Du J, Song H. The role of hysterectomy in the therapy of gestational trophoblastic tumor. Chin Med Sci J. 2000; 15(1):45-8.
70. Tunalı C, Etiz D.:Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda radyoterapinin yeri. Gestasyonel trofoblastik hastalıklar özel sayısı, Özalp S (Ed.), Kadın Doğum Dergisi, 2005; Ek 2: 164-168.
71. Curry SL, Schlaerth JB, Kohorn EI, Boyce JB, Gore H, Twiggs LB, et al. Hormonal contraception and trophoblastic sequale after hydatiform mole (A Gynecologic Oncology Group Study). Am J Obstet Gynecol. 1989;160:805-8.

72. Deicas RE, Miller DS, Rademaker AW, Lurain JR. The role of contraception in the development of postmolar gestational trophoblastic tumor. *Obstet Gynecol.* 1991;78:221-6.
73. Alazzam M, Tidy J, Hancock BW, Osborne R. First line chemotherapy in low risk gestational trophoblastic neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2009 21;(1):CD007102.
74. Homesley HD. Single-agent therapy for nonmetastatic and low-risk gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 1998;43: 69-74.
75. Osborne R, Gerulath A. What is the best regimen for low-risk gestational trophoblastic neoplasia? A review. *J Reprod Med* 2004;49: 602-16.
76. Fleisher M. Antifolate analogs: mechanism of action, analytical methodology, and clinical efficacy. *Ther Drug Monit* 1993;15: 521-6.
77. Treon SP, Chabner BA. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem* 1996;42: 1322-9.
78. Matsui H, Iitsuka Y, Suzuka K, Yamazawa K, Mitsuhashi A, Sekiya S. Salvage chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic tumor. *J Reprod Med* 2004;49: 438-42.
79. Tonanont M, Inthasorn P, Boriboonhirunsarn D, Wongthiraporn W, Suphanit I. Response to initial treatment of low and intermediate risk gestational trophoblastic disease with methotrexate and folinic acid. *J Med Assoc Thai* 2005;88: 1349-54.
80. Gordon AN, Gershenson DM, Copeland LJ. High-risk metastatic gestational trophoblastic disease: further stratification into clinical entities. *Gynecol Oncol* 1989;34: 54-56.
81. Shimizu T, Yaegashi N. Gestational trophoblastic tumors and recent clinical information. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29: 1363-70.

82. Lurain JR. Treatment of gestational trophoblastic tumors. *Curr Treat Options Oncol* 2002;3: 113-24. Lurain JR. Pharmacotherapy of gestational trophoblastic disease. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4: 2005-17.
83. Lu WG, Ye F, Shen YM, Fu YF, Chen HZ, Wan XY, Xie X. EMA-CO chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic neoplasia: a clinical analysis of 54 patients. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18: 357-62.
84. Bower M, Newlands ES, Holden L. EMA-CO for high-risk gestational trophoblastic tumors: results from a cohort of 272 patients. *J Clin Oncol* 1997;15: 2636-2643.
85. Lurain JR, Nejad B. Secondary chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005;97: 618-23.
86. Maestá I et al. Prognostic factors associated with time to hCG remission in patients with low-risk postmolar gestational trophoblastic neoplasia. *Gynecol Oncol*.2013, ; 130:312-6.
87. Rustin GJ, Newlands ES, Lutz JM, et al. Combination but not single-agent methotrexate chemotherapy for gestational trophoblastic tumors increases the incidence of second tumors. *J Clin Oncol* 1996; 14:2769.
88. Schechter NR, Mychalczak B, Jones W, Spriggs D. Prognosis of patients treated with whole-brain radiation therapy for metastatic gestational trophoblastic disease. *Gynecol Oncol* 1998; 68:183.
89. Amikura T, Aoki Y, Banzai C, Yokoo T, Nishikawa N, Sekine M, Suzuki M, Tanaka K. Metastatic choriocarcinoma successfully treated with paclitaxel and carboplatin after interstitial lung disease induced by EMA-CO. *Gynecol Oncol*. 2006 Sep;102(3):573-5. Epub .
90. Jones WB, Schneider J, Shapiro F, Lewis JL Jr. Treatment of resistant gestational choriocarcinoma with taxol: a report of two cases. *Gynecol Oncol*. 1996 Apr;61(1):126-30.
91. Schorge JO, Goldstein DP, Bernstein MR. Recent advances in gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 2000;45: 692-700.

92. Garner EI, Lipson E, Bernstein MR, Goldstein DP, Berkowitz RS. Subsequent pregnancy experience in patients with molar pregnancy and gestational trophoblastic tumor. *J Reprod Med* 2002;47: 380-6.
93. Garner E, Goldstein DP, Berkowitz RS, Wenzel L. Psychosocial and reproductive outcomes of gestational trophoblastic diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17: 959-68.
94. Berkowitz RS, Tuncer ZS, Bernstein MR. Management of gestational trophoblastic diseases: subsequent pregnancy experience. *Semin Oncol* 2000;27: 678-685.
95. Khoo SK. Clinical aspects of gestational trophoblastic disease: a review based partly on 25-year experience of a statewide registry. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2003;43: 280-9.
96. Weiss, Raymond B. "The Anthracyclines: Will We Ever Find a Better Doxorubicin?" *Seminars in Oncology*. Vol. 19, No. 6. December 1992. pp. 670–686.
97. Tan, C.; Tasaka, H.; Kou-Ping, Y.; et al. Daunomycin, An Antitumor Antibiotic, In the Treatment of Neoplastic Disease. Clinical Evaluation with Special Reference to Childhood Leukemia. 1967, *Cancer*, 20, 333 – 353.
98. Fornari, F.A.; Randolph, J.K.; Yalowich, J.C.; Ritke, M.K.; Gewirtz, D.A. Interference by Doxorubicin with DNA Unwinding in MCF-7 Breast Tumor Cells. 1994, *Molecular Pharmacology*, 45, 649 – 656.
99. Momparler, R.L.; Karon, M.; Siegel, S.E.; Avila, F. Effect of Adriamycin on DNA, RNA and Protein Synthesis in Cell-Free Systems and Intact Cells. 1976, *Cancer Research*, 36, 2891 – 2895
100. Doxorubicin (Systemic). Mayo Clinic. Last updated on: June 15, 1999. Retrieved on April 19, 2007.
101. "Doxil Product Information". Ortho Biotech Products, L.P.. Erişim tarihi: 2007-04-19.

102. Clinical application of drug delivery systems in cancer chemotherapy: review of the efficacy and side effects of approved drugs. Iwamoto T.
103. <http://www.mayoclinic.org/drugs-supplements/beta-carotene/background/hrb-20058836>
104. Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease Gilbert S. Omenn, M.D., Ph.D., Gary E. Goodman, M.D., M.S., Mark D. Thornquist, Ph.D. N Engl J Med 1996; 334:1150-1155 May 2, 1996
105. British Cancer Organization Calls for Warning Labels on Beta-Carotene 2000-07-31. Erişim tarihi: 2007-03-15.
106. The Effect of Vitamin E and Beta Carotene on the Incidence of Lung Cancer and Other Cancers in Male Smokers The Alpha-Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group N Engl J Med 1994; 330:1029-1035 April 14, 1994
107. Omenn et al. (1996) Risk Factors for Lung Cancer and for Intervention Effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial Journal of the National Cancer Institute 1996 88(21):1550-1559
108. Bjelakovic et al., Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: Systematic review and meta-analysis, JAMA, 297:842; Feb. 28, 2007
109. Toniolo P, Van Kappel AL, Akhemedkhanov A, Ferrari P, Kato I, Shore RE, et al. Serum carotenoids and breast cancer. Am J Epidemiol. 2001;153(12):1142-1147.
110. SIGMA-ALDRICH,(2013), All trans Retinal
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r2500?lang=en®ion=TR>.
111. Ahlemeyer B., E. Bauerbach, M. Plath, M. Steuber, C. Heers, F. Tegtmeier et al. Retinoic acid reduces apoptosis and oxidative stress by preservation of SOD
112. Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace VM (2011) All trans retinoic acid and cancer. Immunopharmacol Immunotoxicol 33: 241-249.

113. Mandili, G., Marini, C., Carta, F., Zanini, C., Prato, M., Khadjavi, A., Turrini, F. Giribaldi, G.: Identification of phosphoproteins as possible differentiation markers in all-trans-retinoic acid-treated neuroblastoma cells, PLoS One, 6 (2011), p. e18254.
114. Li Z, Hu CY, Mo BQ, Xu JD. Ai Zheng Effect of beta-carotene on gene expression of breast cancer cells 2003; 22 (4):380-384.
115. Burrows, M. T. The cultivation of tissues of the chicken embryo outside the body. (1910) JAMA 55, 2057.
116. Akbaba, G., Sunay, Ç., Hayvan Deneyleri Yararsız ve Acımasız Çalışmalar mı, Sağlığımız İçin Önemli Bir Gereksinim mi? Bilim ve Teknik, Mayıs 2000.
117. Helfrich, M.H., Ralston, S.H., Bone research protocols, Humana Press Inc., Totowa, 2003.
118. Brauner, A., Kaden, P., Human gingival fibroblast cultures for biological intra-oral material testing. Z. Stomatol., 86(8), 533-8., 1989.
119. Topal, Ş.R., Hücre kültür teknikleri-II Uygulamalar, Cemturan Ofset Matbaası, İstanbul, 138-140. 2004.
120. Langdon, S.P., Lawrie, S.S., Hay, F.G., Hawkes, M.M., McDonald, A., Hayward, I.P., Schol, D.J., Hilgers, J., Leonard, R.C., Smyth, J.F. Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines. 1988, Cancer Res., 48: 6166-6172.
121. Bono, J., Tolcher, A. ve Rowinsky, E., (2003), The future of cytotoxic therapy: selective cytotoxicity based on biology is the key, Breast Cancer Research, 5, 154-159.
122. An improved β -lactamase reporter assay: multiplexing with a cytotoxicity readout for enhanced accuracy of hit identification, 2007, Journal of Biomolecular Screening, 12, 635-644. Halis, T.M., Kop, L.A., Gibson, J., Lebakken, S.C., Hancock, M., Kramer, H.K. ve Etienne, T.T.
123. Weyermann, J., Lochmann, D. ve Zimmer, A. (2005), A practical note on the use of cytotoxicity assays, International Journals of Pharmaceutics, 288, 369-376.

124. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *BrJ Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
125. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-259.
126. Mayall, B.H., Casperion, T.O.: selected publications, *Cytometry* 5:314, 1984.
127. Kamensky, L.A., Memaled, M.R.: Spectrophotometric cell sorter *Science* 156:1364, 1967.
128. Kamensky, L.A., Memaled, M.R., Dierman, H.: Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 150:630. 1965.
129. Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. *Modernflow cytometry: a practical approach.* *Clin Lab Med.* 2007; 27(3): 453-68.
130. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48: 1819-27.
131. Meers P and Mealy T: Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan. 1994, *Biochemistry* 33 (19): 5829–37.
132. Morrone S (2007) Annexin V. *Purdue Cytometry CD-ROM Series*, volume 4.
133. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GAM et al. (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis". *Blood* 84 (5): 1415–20.
134. Koechli OR, Schaer GN, Sevin BU, Perras JP, Schenk V, Rodriguez M, Untch M, Steren A, Haller U. In vitro chemosensitivity of paclitaxel and other chemotherapeutic agents in malignant gestational trophoblastic neoplasms. *Anticancer Drugs.* 1995 Feb;6(1):94-10.

135. Marth C, Lang T, Widschwendter M, Müller-Holzner E, Daxenbichler G. Effects of Taxol on choriocarcinoma cells. *Am J Obstet Gynecol.* 1995 Dec;173(6):1835-42. PubMed PMID: 8610772.
136. Gullbo, J., Fryknä, M., Rickardson, L., Darcy, P., Hägg, M., WicPhenotype based drug screening in primary ovarian carcinoma cultures identifies intracellular iron depletion as a promising strategy for cancer treatment, *Biochemical Pharmacology*, 82, 139-47. 2011.
137. Hanukoglu I. : Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells, *Drug Metab Rev.* 2006;38:171-96
138. Yilmaz Z, Karabay G, Oktem M, et al. The apoptotic effects of mitomycin C on human endometrial cell cultures and reversal of its effects by β -carotene and folic acid. *Acta Physiol Hung.* 2006 93(1):41-51
139. Bal F., Sahin F.I., Yirmibes M., et al. The in vitro effect of β -carotene and mitomycin C on SCE frequency in Down's syndrome lymphocyte Cultures *Tohoku J. Exp. Med.* 1998, 184, 295-300
140. Sherman, H., Gutman, R., Chapnik, N., Meylan, J., Coutre, J. ve Froy, O. (2011). All trans retinoic acid modifies the expression of clock and disease marker genes, *Journal of Nutritional Biochemistry*.
141. Um, J.S., Lee, S.Y., Kim, E.J., Han, H.S., Koh, Y.M., Hong, K.J., Sin, H.S. ve Park, J.S. (2001), Antiproliferative mechanism of retinoid derivates in ovarian cancer cells, *Cancer Letters*, 174, 127-134.
142. Fields, A.L., Soprano, D.R. ve Soprano, K.J. (2007), Retinoids in Biological Control and Cancer, *Journal of Cellular Biochemistry*, 102, 886-889.
143. Carter, A.K. ve Bellido, T. (1999), Decrease in protein tyrosine phosphorylation is associated with F-actin reorganization by retinoic acid in human endometrial adenocarcinoma (RL95-2) cells, *Journal of Cellular Physiology*, 178, 320-332.

144. Alija AJ, Bresgen N, Sommerburg O, Langhans CD, Siems W, Eckl PM. Cytotoxic and genotoxic potential of beta-carotene and cleavage products under oxidative stress. *Biofactors* 2005;24(1-4): 159-63
39. Buyukokuroglu ME, Cemek M, Yurumez Y, Yavuz Y
145. İnsan lenfosit hücre kültüründe melatonin ve b-karotenin mitomisin C ile indüklenen kardeş kromatid değişimi sıklığı üzerine in vitro etkileri Yasemin Soysal, Feride İffet Şahin, Sevda Menevşe
146. Lycopene and Beta-Carotene Induce Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Lines Nathalie Fonseca Gloria, Nathalia Soares, Camila Brand, Felipe Leite Oliveira, Radovan Borojevic Anderson Junger Teodoro
147. O'Brien ME, Wigler N, Inbar M et al. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (Caelyx/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 440- 9.
148. Rifkin RM, Gregory SA, Mohrbacher A et al. Pegylated liposomal doxorubicin, vincristine, and dexamethasone provide significant reduction in toxicity compared with doxorubicin, vincristine, and dexamethasone in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a phase III multicenter randomized trial. *Cancer* 2006; 106: 848- 58.
149. J.Y. Yang, S.A. Ha, Y.S. Yang, J.W. Kim, p-Glycoprotein ABCB5 and YB-1 expression plays a role in increased heterogeneity of breast cancer cells: correlations with cell fusion and doxorubicin resistance, *BioMed Central (BMC) Cancer* 10 (2010) 388.
150. Doxorubicin Induces Apoptosis in Normal and Tumor Cells via Distinctly Different Mechanisms Intermediacy of H₂O₂- and p53- Dependent Pathways Suwei Wang, Eugene A. Konorev, Srigiridhar Kotamraju, Joy Joseph, Shasi Kalivendi, B. Kalyanaraman

151. Modulation of doxorubicin cytotoxicity by resveratrol in a human breast cancer cell line Abdel-Moneim M Osman, Hadeel M Bayoumi, Sameer E Al-Harhi, Zoheir A Damanhour and Mohamed F, E Shal

152. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro ab
b Justin M. Saul, Ananth Annapragada, Jayagane

153. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro
Robert J. Lee, Philip S. Low

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Kararı



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı

TOPLANTI TARİHİ : 25/03/2014
TOPLANTI NO : 2014/06

KARARLAR :

12-B.E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet İbrahim HARMA'nın sorumluluğunda yürütülecek olan 2014-68-25/03 Protokol no'lu "JAR ve JEG-3 Koryokarsinom İnsan Hücre Kültüründe Lipozomal Doksuobisin ve Karoten Etkisinin İncelenmesi" konulu çalışmanın Etik Kurul İlkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

A S L I G İ B İ D İ R

Doç. Dr. Günnur ÖZBAKİŞ DENGİZ
B.E.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı