

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

**JAR VE JEG-3 KORYOKARSİNOM İNSAN HÜCRE**  
**KÜLTÜRÜNDE TOPOTEKAN VE FOLİK ASİT ETKİSİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**Dr. Raşan EYÜP**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Aykut BARUT**

**Zonguldak 2016**

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

**JAR VE JEG-3 KORYOKARSİNOM İNSAN HÜCRE**  
**KÜLTÜRÜNDE TOPOTEKAN VE FOLİK ASİT ETKİSİNİN**  
**İNCELENMESİ**

**Dr. Raşan EYÜP**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**Doç. Dr. Aykut BARUT**

**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 Topotekan ve Folik Asit Etkisinin İncelenmesi

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Raşan EYÜP

Tez Savunma Tarihi : 16/08/2016

Tez Danışmanı : Doç.Dr. Aykut BARUT

Prof.Dr. Mehmet İbrahim HARMA  
Jüri Başkanı

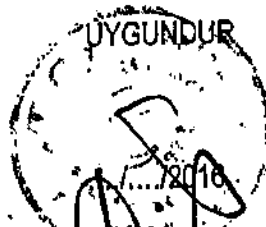


Prof.Dr. H. Alper TANRIVERDİ



Doç.Dr. Aykut BARUT

UYGUNDUR



Prof. Dr. AYKUT BARUT  
Dekan

## ÖN SÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca tababet sanatını öğrendiğim, bilgi birikimlerini ve tecrübelerini bizimle paylaşan, öğreten değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet İbrahim HARMA'ya, bir anne şefkatiyle her an yanımızda olduğunu hissettiren, hekimliğin bilgi ve sevgiyle yapılması gereken bir sanat olduğunu bizlere öğreten değerli hocam Sayın Prof. Dr. Müge HARMA'ya, hem klinik tecrübelerini hem de cerrahi tecrübelerini bizimle paylaşan, hekimlik mesleği dışında insan olma anlamında da bize ilham veren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ülkü ÖZMEN'e, bu zor, meşakkatli ve stresli yolda öğrencilik yıllarımda dahil olmak üzere işime dört elle sarılma enerjisini aldığım, tüm streslerden uzak işimi gülümseyerek ve gülümseterek yapmayı öğrendiğim, tezimin oluşum sürecinde yönlendirmeleriyle tezimin şekillenmesini ve son haline gelmesini sağlayan ve her konuda desteğini gördüğüm tez hocam Sayın Doç. Dr. Aykut BARUT'a, hekimliğin gözü kapalı yapılacak bir iş olmadığını, sürekli tetikte ve kontrollü yapılması gerektiğini öğrendiğim hocam Sayın Doç. Dr. İnan İlker ARIKAN'a, kısa bir süre olsa da kendisi ile çalışma imkanı bulabildiğim için mutlu olduğum hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Abdül Hamid GÜLER'e;

İmmünoloji kliniğinin tüm imkanlarıyla tezimin laboratuvar aşamasının gerçekleşmesini sağlayan Sayın Doç. Dr. İshak Özel TEKİN'e

Tezimin istatistik aşamasında çalışmama yaptığı özverili katkılarından dolayı Öğr. Gör. Mustafa Çağatay BÜYÜKUYSAL'a;

Birlikte geçirdiğimiz zaman boyunca yardımlarını benden esirgemeyen ve kendileriyle çalışmaktan büyük mutluluk ve gurur duyduğum tüm araştırma görevlisi, hemşire ve diğer sağlık çalışanı arkadaşlarıma;

Bugün bulunduğum bu pozisyona gelmemi sağlayan ve hayatımın her anında tüm zorlukları beraber göğüslediğim canım anneme, babama, ablama ve biricik kardeşime tüm kalbimle teşekkür ederim.

**Dr. Raşan EYÜP**  
**Zonguldak 2016**

## ÖZET

**Raşan EYÜP, JAR ve JEG-3 Koryokarsinom İnsan Hücre Kültüründe Topotekan ve Folik Asit Etkisinin İncelenmesi, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tezi, Zonguldak 2016.**

**Amaç:** Plasentanın trofoblast hücrelerinden köken alan gestasyonel trofoblastik hastalıklar, trofoblastın anormal proliferasyonu ile karakteristik özellik gösteren bir hastalık grubudur. Bu hastalık grubu, epidemiyolojisi, patolojik özellikleri ve genetik bileşenleri ile geniş spektrum göstermektedir. Koryokarsinoma ise gestasyonel trofoblastik hastalıkların en malign türüdür. Etyolojisinde genetik faktörlerden etnik kökene hatta diyetsel faktörlere kadar birçok sebep bulunmaktadır.

Doğal bir antioksidan olan ve vücuttaki tek karbon metabolizmasında görev yapan folik asit, pürin sentezi ile fosfolipidler, proteinler, deoksiribonükleik asit ve nörotransmitterleri içeren önemli biyolojik maddelerin metilasyonu için gerekli tek karbon metabolizmasını oluşturmaktadır. Özellikle hücre bölünmesinin hızla arttığı gebeliğin ilk trimesterinde folik asit eksikliğinin görülmesi konjenital anomalilerin açıklanmasına yardım eder. Topotekan ise over ve küçük hücreli akciğer kanserleri tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan topoizomerazın inhibitörüdür. Topoizomeraz I, deoksiribonükleik asitte reversibel tek sarmal kırılımlarını indükleyerek deoksiribonükleik asitin eksenini etrafındaki gerilimi ortadan kaldırır.

Bu çalışmanın amacı, koryokarsinom tedavisine yeni bir bakış açısı sunarak daha efektif tedavi yöntemleri geliştirebilmek amacıyla topotekan ve folik asitin, JAR ve JEG-3 hücre kültüründe geliştirilen koryokarsinom modelleri oluşturulmuş hücre kültürleri üzerindeki etkilerini ve tedavi etkinliklerini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** İnsan koryokarsinom benzeri JAR ve JEG-3 hücrelerin Roswell Park Memorial Institute -1640 ortamında % 10 fetal dana serumu, penisilin-streptomisin varlığında 37°C, % 95 hava, % 5 CO<sub>2</sub> içeren atmosferde çoğaltıldı. Topotekan ve folik asitin uygulama grupları aşağıdaki gibi belirlendi;

Topotekan, Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 1, 5, 10, ve 50 µg/ml'lik dozlar halinde hazırlanmıştır.

Folik asit, dimetil sülfoksit içerisinde çözülerek 1, 5 ve 10 µg/ml'lik dozlar halinde hazırlanmıştır. Maddeler hücrelere aynı anda verilmiştir.

**Bulgular:** Yaptığımız çalışmada topotekanın tek başına artan dozlarda kullanıldığında JAR hücre serileri üzerindeki apoptotik etkilerinin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür. Folik asitin tek başına artan dozda apoptozisi azalttığı, bu iki ilacın kombine edilip artan dozlarda kullanıldıklarında JAR hücre serisi üzerinde apoptotik etkilerinin istatistiksel olarak daha da arttığı görülmüştür.

**Sonuç:** İnsan Koryokarsinom hücre hattı modellerinden biri olan JAR üzerinde topotekanın folik asit ile tek ajan ve kombine kullanımları ayrıca immünoenzimatik yöntemle beta human koryonik gonadotropin ve hiperglikolize human koryonik gonadotropin ölçümü, literatürde ilk kez her iki hücre hattında birden yapılmıştır. Elde edilen sinerjistik apoptotik veriler topotekan ve folik asitin Koryokarsinom tedavisinde karşılaşılan çoklu ilaç direnciyle mücadelede kullanılacak 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:** Gestasyonel trofoblastik hastalık, folik asit, topotekan, koryokarsinom.

## ABSTRACT

**Rasan EYUP, The examination of the effects of Topotecan and Folic Acid on JAR and JEG-3 Choriocarcinoma Human Cell Culture, Thesis of the Bulent Ecevit University Medical School, Gynecology and Obstetrics Department; Zonguldak 2016.**

**Aim:** Gestational trophoblastic diseases, which are of the trophoblastic origin of placenta, are a group of disease which is characterized by the abnormal proliferation of the trophoblasts. This group of disease has a wide spectrum in terms of their epidemiology, pathologic features and genetic compounds. Choriocarcinoma is the most malignant type of these diseases. The etiology of the disease have many factors including genetic factors, ethnicity, even nutritional habits. Folic acid, which is a natural antioxidant, constitutes the odd-carbon metabolism which required for the methylation of the important biological substances such phospholipids, proteins, deoxyribonucleic acid and neurotransmitters by the way of purine synthesis. Existence of the folic acid deficiency in the first trimester, which is characterized by the increased cytokinesis, aids to explain congenital abnormalities on first trimester. Topotecan is an inhibitor of the topoisomerase, which is a chemotherapeutic agent used in the treatment of ovarian cancer and small cell carcinoma of the lung. Topoisomerase I induces the reversible breakdown of the single helices of deoxyribonucleic acid and annihilates the tension covering the axis of the deoxyribonucleic acid.

The purpose of this study is to search the effects and treatment efficacies of topotecan and folic acid on the choriocarcinoma cultures generated in JAR and JEG-3 cellular cultures.

**Materials and Method:** Human choriocarcinoma-like JAR and JEG-3 cells are augmented in the 10% fetal bovis serum and Roswell Park Memorial Institute -1640 media, 95% air at 37°C with the existence of penicillin and streptomycin. Groups to apply topotecan or folic acid are identified as below:

Topotecan dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO) and prepared as separate doses of 1, 5, 10 and 50 µg/ml. Substances are given to cells simultaneously.

**Conclusion:** In this study, the apoptotic effect of the use of topotecan only, in residual doses on JAR cell series is statistically significant. The use of folic acid only, in residual doses has found to decrease the apoptosis. In the combination of these two drugs in residual doses, the apoptotic effect of this drug is even more increased, and statistically significant.

**Results:** This is the first study which use the topotecan and folic acid separately and combined on JAR, a human choriocarcinoma cell line model, and evaluation of beta human chorionic gonadotropin and hyperglycolysis human chorionic gonadotropin by the means of immunoenzymatic method on the both two cell lines. Synergistic and apoptotic data gathered indicates that topotecan and folic acid can be one of the treatment options in order to struggle multi-drug resistance which is an enormous obstacle on treatment. However, the efficacy of drugs and effects of combination therapies might be disparate in vivo; therefore data must be supported by animal experiments and after that by clinical evaluations.

**Key words:** Gestational trophoblastic disease, folic acid, topotecan, choriocarcinoma.



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ .....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Plasenta Gelişimi .....	4
2.2. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar .....	5
2.3. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Epidemiyoloji .....	9
2.4. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıkların Genetik Özellikleri.....	9
2.5. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Risk Faktörleri .....	10
2.6. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Moleküler Patogenez ve Patoloji .....	10
2.7. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Sentez Aktivitesi .....	11
2.8. Klinik Özellikler .....	12
2.9. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Tedavi .....	12
2.9.1. Tedavide boşaltım sonrası profilaktik kemoterapi.....	15
2.9.2. Kemoterapi ve radyoterapi.....	15
2.10. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Tedavi Sonrası .....	17
2.11. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar ve Gebelikler.....	17
2.12. Folik Asit .....	17
2.13. Topotekan .....	18
2.14. Hücre Kültürü .....	19
2.15. Sitotoksiste.....	19
2.16. Apoptoz .....	20
2.17. Flowsitometri (Akan Hücre Ölçer).....	20

3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	22
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler .....	22
3.3. Kullanılan Aletler .....	23
3.4. JAR ve JEG-3 Hücre Kültürleri .....	24
3.5. Topotekan ve Folik Asit Dozlarının Hazırlanması .....	25
3.5.1. Topotekan dozunun hazırlanması .....	25
3.5.2. Folik Asit dozunun hazırlanması .....	25
3.6. Yöntem .....	25
3.6.1. Hücre hatlarının kültüre edilmesi .....	25
3.6.2. Kemoterapötiklerin testler için hazırlanması, $\beta$ -HCG ve h-HCG ölçümü ....	25
3.6.3. Annexin V yöntemi ile apopitoz tespiti ve istatistiksel analiz .....	26
4. BULGULAR .....	28
4.1. Topotekan'ın JAR Hücre Hattı Üzerine Apopitotik Etkileri .....	28
4.2. Folik Asitin JAR Hücre Hattı Üzerine Apopitotik Etkileri .....	31
4.3. Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apopitotik Etkileri .....	34
4.4. Topotekan ve Folik Asit'in Ayrı Ayrı ve Birlikte Kullanılan Kombinasyonlarının JAR Hücre Hattı Üzerine Apopitotik Etkilerinin Karşılaştırılması .....	36
5. TARTIŞMA .....	38
6. SONUÇ .....	42
7. KAYNAKÇA .....	43
8. EKLER .....	55
Ek 1: Etik Kurul Kararı .....	55

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AIDS</b>	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu
<b>ATRA</b>	: All-trans retinoik asit
<b>β</b>	: Beta
<b>BT</b>	: Bilgisayarlı Tomografi
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
<b>EMA-CO</b>	: Etoposid, Metotreksat, Aktinomisin-D, Siklofosamid, Vinkristin
<b>FA</b>	: Folik Asit
<b>FCM</b>	: Flow Sitometri
<b>FDA</b>	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
<b>FIGO</b>	: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu
<b>GTH</b>	: Gestasyonel Trofoblastik Hastalık
<b>GTN</b>	: Gestasyonel Trofoblastik Neoplazi
<b>hCG</b>	: Human Koryonik Gonadotropin
<b>h-hCG</b>	: Hiperglikolize Human Koryonik Gonadotropin
<b>HM</b>	: Hidatidiform Mol
<b>HPL</b>	: Human Plasental Laktojen
<b>KT</b>	: Kemoterapi
<b>MRG</b>	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>MTX</b>	: Metotreksat
<b>PYBGTT</b>	: Plasental Yerleşim Bölgesinden Gelişen Trofoblastik Tümör
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RPM</b>	: Dakikadaki Devir Sayısı
<b>RPMI</b>	: Roswell Park Memorial Institute
<b>SPSS</b>	: Statistical Package for the Social Sciences
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü

## TABLO LİSTESİ

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Tablo 1. 2000 FIGO Evrelendirmesi.....	14
Tablo 2. GTH için WHO/FIGO prognostik skorlama sistemi .....	14
Tablo 3. Topotekan’ın artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranları.....	28
Tablo 4. Topotekan verildiğinde JAR hücre hattında $\beta$ -hCG ve h-hCG düzeyleri ...	30
Tablo 5. Folik Asit’in artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranları .....	31
Tablo 6. Folik Asit’in artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$ .....	32
Tablo 7. Folik Asit verildiğinde JEG-3 hücre hattında $\beta$ -hCG ve h-hCG düzeyleri ..	33
Tablo 8. Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit’in JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranları.....	34
Tablo 9. Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit’in JAR hücre hattında h-hCG ve $\beta$ -hCG düzeyleri .....	36

## ŞEKİL LİSTESİ

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 1. Topoizomeraz'ın formülü.....	18
Şekil 2. JAR ve JEG-3 hücre kültürlerini içeren flasklar ve hücre kültür plakları .....	22
Şekil 3. Flowsitometri .....	23
Şekil 4. Nüve CO <sup>2</sup> inkübatörü.....	23
Şekil 5. JAR hücre kültürü mikroskopik görünümü.....	24
Şekil 6. Topotekan'ın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	28
Şekil 7. Topotekan verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	29
Şekil 8. Topotekan verildiğinde JAR hücre hattında $\beta$ -hCG düzeyleri.....	30
Şekil 9. Folik Asit'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	31
Şekil 10. Folik Asit verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	32
Şekil 11. Folik Asit verildiğinde JAR hücre hattında $\beta$ -hCG düzeyleri.....	33
Şekil 12. Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	34
Şekil 13. Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	35
Şekil 14. Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR hücre hattında $\beta$ -hCG düzeyleri.....	35
Şekil 15. Topotekan ve Folik Asit'in Ayrı Ayrı ve Birlikte Kullanılan Kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apoptotik grafiksel etkilerinin karşılaştırılması.....	36
Şekil 16. Topotekan ve Folik Asit'in Ayrı Ayrı ve Birlikte Kullanılan Kombinasyonlarının JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	37
Şekil 17. Topotekan ve Folik Asit'in Ayrı Ayrı ve Birlikte Kullanılan Kombinasyonlarının JAR hücre hattında $\beta$ -hCG düzeyleri.....	37

## 1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ile kendini gösteren, önce vücudun belli bir organını daha sonra ise vücudun tamamını etkilemeye başlayan kompleks bir hastalıktır.

Epidemiyolojisi ve patolojik özellikleri ile heterojen bir hastalık grubunu oluşturan Gestasyonel Trofoblastik Hastalık (GTH) ise, plasentanın trofoblast hücrelerinden köken alan trofoblastın anormal proliferasyonu ile karakterizedir (1). GTH; geniş bir spektrum göstermesine karşın tedavi olasılığı oldukça yüksek benign mol hidatidiformdan (HM), ölümcül risk taşıyan koryokarsinoma kadar çok değişik formlarda kendini gösteren tümörlerden oluşmaktadır. Esasında plasentadan köken alan GTH'ler, gestasyonel trofoblastik neoplazi (GTN) ve gestasyonel trofoblastik tümör (GTT) olarak da tanımlanmaktadır (2). GTH'nin temelinde anormal gametogenezis, fertilizasyon ve trofoblastik dokunun malign transformasyonunun etkili olduğu ifade edilmiş olsa da etyolojisi kesin olarak bilinmemektedir (1,2).

GTH, histopatolojik olarak; hidatiform (komplet ve parsiyel), invaziv mol, koryokarsinom ve plasental yerleşim bölgesinden köken alan trofoblastik tümörler (PYBGTT) olmak üzere dört gruba ayrılırlar (PYBGTT'ler son yıllarda bu gruba dahil edilmiştir.) (3). GTH'lerin % 90'ını oluşturan komplet mol ve parsiyel mol invazyon göstermeyip premalign özellik taşıyan anormal plasental histolojisi göstermektedirler. Geriye kalan % 10'luk bölümü ise invaziv mol, koryokarsinom, plasental bölge trofoblastik tümörler oluşturup bu hastalıklar önceden belirlenemeyen malign potansiyele sahiptirler (4). Özellikle metastatik GTN'ler içerisinde yüksek metastaz potansiyeline koryokarsinomalar sahiptir. Mesela molar gebeliği olan kadınlar koryokarsinom riskinin en fazla olduğu hastalardır. Bu hastalarda plasental dokunun transformasyona uğramış olması koryokarsinom riskini artırmaktadır (2). Fakat erken ve kesin tanı ile uygun tedaviyi yerinde alan bireylerin tamamında iyileşme mümkün olabilmektedir. GTN'ler, HM sonrası, terapötik veya spontan abortus, ektopik ya da term gebeliğin ardından gelişebilmektedirler (5).

Plasentadan çeşitli hormonlar salgılanmaktadır. Bu hormonlardan biri olan human koryonik gonadotropin (hCG), fertilizasyon ile birlikte salgılanmaya başlar ve gebelikte oldukça yüksek olarak seyreder (6). Beta ( $\beta$ ) hCG subünitinin hassas olarak

ölçülebilmesi ve tümör belirteci olarak kullanılmasından dolayı GTN'lerin hastalığın ilerleyen aşamalarında tedavi edilebilmesinin nedenini oluşturmaktadır ve bundan dolayı da kemoterapi de etkili olmaktadır (7).

B grubu vitaminlerinden biri olan folik asit, suda erime özelliğine sahip olup, ilk olarak 1943 yılında doğal gıdalardan ayrıştırılarak literatüre girmiştir. Pürin sentezi ile fosfolipidler, proteinler, DNA ve nörotransmitterleri içeren folik asit, önemli biyolojik maddelerin metilasyonu için gerekli tek karbon metabolizmasını oluşturmaktadır. Folik asit yardımcı enzimi nükleik asit yapımı ile ilgili tepkimelere girdiğinde hücre çoğalması ve kan hücrelerinin yapımı için gereklidir (8). Sonuç olarak, nükleik asitlerin oluşum metabolizmasında aminoasitlerin dönüşümüne kadar birçok biyokimyasal olayın oluşması sağlanmaktadır (9). Emilim aktif taşıma ile gerçekleşir fakat yüksek düzeyde alındığında pasif taşımayla da emilimi sağlanır (10). Folik asit, vücut homeostazisinin korunmasında önemli bir yere sahip olup, homosisteinin metiyonine dönüşümünde vitamin B12 ile birlikte remetilasyon basamağında görev almaktadır. Folik asit ve vitamin B12 eksikliğinde ise homosistein düzeylerinin yükselmesi neticesinde vasküler patolojiler ve son yıllarda önemle üzerinde durulan doğumsal nörolojik bozukluklar (nöral tüp defekti) meydana gelmektedir. Özellikle hücre bölünmesinin hızla arttığı gebeliğin ilk trimesterinde folik asit eksikliğinin görülmesi konjenital anomalilerin açıklanmasına yardım eder. Gebelikte kırmızı kan hücrelerinin tam olgunlaşmadığı megaloblastik (makrositik) anemi, kolon, mide, uterus kanserleri, kalp-damar hastalıklarına da neden olmaktadır (11).

Besinlerde çoğunlukla monoglutamat formda bulunan folat 5-metiltetrahidrofolik asit, 5-formiltetrahidrofolik asit yani folik asitin monoglutamat formunda emilmektedir (8,11). Gebelikte serum ve eritrositlerdeki folat konsantrasyonu azalır. Bazı gebe kadınlarda hamileliğin son evrelerinde kısmi megaloblastik değişiklikler meydana gelir.

Normal gebelikte ikinci trimesterden sonra folik asit düzeyinde düşme görülür. Bu düşme lohusalıkta normale döner. Folik asit eksikliği pek çok gebelikte birinci trimesterde bulunur. Folat konsantrasyonlarının düşük olması gebelik prognozunu olumsuz yönde etkilemektedir (8). Bebeklerdeki düşük doğum ağırlığı, premature riski, ölü doğumların nedeninin düşük folat alımı olduğu belirtilirken aynı

zamanda gebelerde preeklampsi, hipertansiyon ve plasenta ayrılması ile ilişkili olarak da maternal ölümlere neden olduğu bilinmektedir (12).

Topotekan, over ve küçük hücreli akciğer kanserleri tedavisinde kullanılan kemoterapötik bir ilaç olan topoizomeraz I'in inhibitörüdür. Topotekan hidroklorür kamptotesinin semisentetik bir türevidir ve topoizomeraz I inhibitör aktivitesi olan antitümör bir ilaçtır. Topoizomeraz I, DNA'da reversible tek sarmal kırılımlarını indükleyerek DNA'nın eksenini etrafındaki gerilimi ortadan kaldırarak DNA kompleksine bağlanır ve tek sarmal kırılımlarını engeller (13).

Bu çalışmanın amacı, koryokarsinom tedavisinde yeni bakış açısı sunarak daha efektif tedavi yöntemleri geliştirebilmek amacıyla topotekan ve folik asitin JAR ve JEG 3 hücre kültüründe geliştirilen koryokarsinom modelleri oluşturulmuş hücre kültürleri üzerindeki etkilerini ve tedavi etkinliklerini araştırmaktır.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1. Plasenta Gelişimi

Plasenta, fetüsün metabolik ve enerji ihtiyacını karşılayarak anne ile fetüs arasındaki fizyolojik ihtiyaçları karşılayan aktif bir organdır. Plasentanın oluşum ve gelişimi anneye ve fetusa ait pek çok multifaktöriyel olayların bileşimi ile oluşur. Özellikle nitrik oksit, anjiyojenik büyüme faktörleri (fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), plasental büyüme faktörü (PGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi) gibi hormonların yanısıra sitokinler, ekstrasellüler matriks metalloproteinazları, hormonlar, adhezyon molekülleri ve transkripsiyon faktörlerinin bir araya gelmesiyle plasenta gelişimi tamamlanmış olur (14).

Blastokist, morulanın konsepsiyon sonrası 4. günde uterin kaviteye ulaşmasıyla meydana gelir. Blastokist; embriyoblast olarak adlandırılan iç hücre kütlesi ve trofoblast adı verilen dış hücre tabakası olmak üzere iki tabakadan meydana gelir. Konsepsiyonun 7. gününe gelindiğinde trofoblastlar blastokisti çevreleyerek sitotrofoblasta dönüşür. Bu çekirdekli sitotrofoblastların bir tabakası sinsityotrofoblasta çevrilerek, mitoz ve hücre duvarının kaybı ile gebelik boyunca çekirdeksiz sinsityotrofoblastlara dönüşürler. Sinsityotrofoblastlar protein ve steroid hormonlarını üretirler. Konsepsiyonun 13. gününe ulaşıldığında sitotrofoblast tabakası invazif ve noninvazif sitotrofoblastlara farklılaşır. İnvazif sitotrofoblastlar (ekstravillöz trofoblast) hücre kümeleri oluşturarak uterus epiteline invaze olur ve plasenta ile fetüs arasında kan akımını sağlar.

İnvazif trofoblastlar sinsityotrofoblastların içerisinden geçerken laküner boşlukları oluştururlar. Bu laküner boşluklar bir araya gelerek trabekülleri oluştururlar. Trabeküllerin dallanması ile ortalama 13. günde plasental villus yapısı oluşumunu başlatarak primer (kök), sekonder veya tersiyer villuslar olmak üzere yapılarındaki vaskülarizasyon seviyelerine göre üç gruba ayrılmış olurlar. (15).

Plasenta üzerinde yapılan son araştırmalarda, sinsityotrofoblastların serbest yüzeylerinde anne ve fetüsün damarları arasındaki besin ve gaz değişim yüzeyini artırabilmek için her bir plasenta  $cm^2$ 'de 1 milyardan fazla mikrovillus olduğu ifade edilmiştir (16).

Gebeliğin ikinci trimesterinin sonlarına kadar plasental bariyer çeşitli tabakalardan oluşur. Bunlar sırası ile; sinsityotrofoblast tabaka, sitotrofoblastlar, koryon villusların bağ dokusu ve fetal kapiller damar endoteli olmak üzere dört tabakadan meydana gelir.

Son trimestere gelindiğinde ise villuslarda hacimli histolojik değişiklikler meydana gelirken villusların büyük bölümündeki sitotrofoblastlar incilir, bir süre sonra tamamen ortadan kalkar ve en son sadece ince sinsityotrofoblast tabakası kalmış olur (17).

Plasentanın ağırlık ve kalınlığı gibi morfolojik özellikler gebelik haftasının evrelerine göre farklılıklar gösterir. Nihai büyüklüğüne 36. haftada ulaşarak 10- 38 kadar kotiledona sahip olmuş olur (18). Kotiledonların sayısı gebelik boyunca sabit kalırken her bir kotiledon umbilikal ven ve arterin bir dalı tarafından beslenir.

## **2.2. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar**

Gestasyonel trofoblastik hastalıklar (GTH); klinik, patolojik ve genetik olarak çok çeşitlilik ve geniş bir dağılım göstermesine rağmen tedavi edilebilen nadir hastalıklardan biridir (4). Hipokrat; MÖ. 400 yılında bu hastalığı 'uterus'un damlamsı yapısı şeklinde tarif ederken 1700'lü yıllarda Smellie ilk defa 'mol' ve 'hidatiform' kelimelerini kullanmıştır (1). Son yüzyılda ise bir grup bilim insanı tarafında hastalığın histopatolojisi araştırılmış ve bunun sonucunda pato-klinik sınıflamalar yapılabilmıştır (19).

Bu hastalığın teşhis ve takibinde en yaygın kullanılan klinik değer biyokimyasal parametre olan serum  $\beta$ -hCG'dir. Hastalığın seyri ve davranışı açısından tedavi süresi ve sonrasında seri halde düzenli olarak  $\beta$ - hCG takibi yapılmalıdır. Çünkü; GTH'nin özgün histolojik özellikleri ve genetik yapısı nedeni ile yapılan yeni histolojik çalışmalar, doğru teşhis ve tedavi modalitesinin seçiminde yol gösterici olabilmektedir (20).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu (FIGO) gestasyonel trofoblastik hastalıkları (21);

1- Hidatiform mol

2- İnvazif mol

3- Koryokarsinoma

4- Plasental bölge tümörü

olmak üzere dört gruba ayırmıştır.

**Hidatiform Mol:** Mol hidatiform risk faktörleri tam olarak tespit edilebilmiştir. Epidemiyolojik ve genetik özellikler mol hidatiform üzerine etki etmektedir ve birincil risk faktörleri; Asya kökenli olmak, ileri maternal yaş, düşük sosyoekonomik koşullar (demografik özellikler) ve önceki molar gebelik öyküsüdür (22). Histolojik ve morfolojik olarak mol hidatiform; komplet ve parsiyel olmak üzere iki grupta incelenir (18).

**Komplet mol hidatiform:** Komplet mol hidatiformda embriyogenezis sözcüğü konusu olmadığı için fetusa ait parçalar bulunmaz. Genetik yapı sadece paternal orjinlidir ve diploid yapıdadır. Koryonik villuslar, ikinci ve üçüncü trimesterde, veziküllere dönüşür (23). Makroskopik olarak ise normalden büyük uterus ile uterus içerisinde üzüm salkımı görüntüsü oluşur ve bu molün en karakteristik özelliği doku ile ilişkili fetüs izlenmemesidir. Koryonik villuslar, yaygın hidropik dejenerasyon ve diffüz trofoblastik hiperplazi gösterir. Hidropik villuslar avaskülerdir ve değişen derecelerde proliferasyon gösterirler. Koryon epitelinde, hem sinsityotrofoblast hem de sitotrofoblastlarda proliferasyon her zaman vardır (18).

Biyokimyasal olarak komplet molde maternal hCG seviyesi yüksektir ve fetal kalp sesleri duyulmaz. Komplet mollerin % 10'u invazif mole, % 2-3'ü ise koryokarsinoma dönüşür (20, 24).

Klinik olarak ise; hastaların % 84'ünde görülen yoğun vajinal kanamadan dolayı bu hastaların yaklaşık % 25'inde anemi görülür. Yine bu hastalarda endometrial kavite hem koryonik dokularla hem de retansiyona uğramış kanla dolduğu için anormal şekilde uterus büyüklüğü görülür. hCG seviyeleri yüksektir (18, 24). Aneminin yanı sıra hastaların % 27'sinde preeklampsi de gözlemlenebilir. Eğer gebeliğin erken dönemlerinde preeklampsi gelişirse mol hidatiform akla gelmelidir.

Komplet molde embriyonik ve fetal dokular olmadığı için klinikte uterus yumuşak olarak görülebilir.

Yukarıda belirtilen iki hastalığın dışında hiperemesis gravidarum (aşırı bulantı ve kusma), hipertiroidizm (komplet molar gebelikli hastaların % 7'sinde), trofoblastik embolizasyon ve overin teka lutein kistleri gibi hastalıklar komplet mollü hastaların yaklaşık % 50'sinde gelişebilme potansiyeline sahiptirler (24). Trofoblastik embolizasyon; komplet molün yaklaşık % 2'sinde görülürken overin teka lutein kistleri; komplet mollü hastaların yaklaşık yarısında (6 cm çapında) gelişir (22). Teka lutein kistlerinin bu kadar fazla oranda görülmesinin nedeni ovaryen hiperstimülasyona neden olan yüksek hCG değerleridir (24) .

**Parsiyel Mol Hidatiform:** Komplet mol hidatiformdan farklı olarak parsiyel molde fetusa ait yapılar bulunur. Genetik yapı hem maternal hem de paternal orjinlidir. Az da olsa normal koryon villusu içerir. Hidropik villuslar vaskülerdir ve embriyonik ve fetal dokular mevcuttur. Vasküler villuslar fetal plasental dolaşımı sağlar. Fetus canlı ise villus damarlarında kan elemanları mevcuttur. Parsiyel mol hidatiform sonrası koryokarsinom riski azdır (25). Parsiyel molü olan hastalarda komplet molar gebeliğin belirgin bulguları görülmez. Bu hastalar genellikle inkomplet veya missed abortus bulgu ve semptomları ile hastaneye başvururlar (18, 21).

Klinik olarak; parsiyel mollü hastalarda vajinal kanama, anormal uterus büyüklüğü, preeklampsi görülür. Bebeğe ait parçalar muayene sırasında fark edilir. Laboratuvar bulgusu olarak ise hCG seviyeleri yüksektir (20, 21).

**İnvazif Mol:** İnvazif mol, komplet ya da parsiyel molün myometriumu invaze ettikleri tablodur. Molar doku, uzun sütunlar ve plaklar şeklinde myometriuma ilerler ve kan damarlarını invazyona uğratarak bölgesel kanamaya neden olurlar. Myometrial damarlanmalara invazyon sonrası, vajina, akciğer ve merkezi sinir sistemi gibi uzak organlara villus metastazı gerçekleşebilir. Molar doku bazen myometriyumun tamamını içine alacak şekilde ilerler ve uterusun seroza tabakasını aşarak uterusun rüptüre olmasına neden olur (1).

İnvazif mol; akreata, inkreata ve perkreata olmak üzere üçe ayrılır. Akreata tipte myometrial invazyon yüzeyelken inkreata tipte derin myometrial invazyon söz konusudur. İnkreata tipte invazyon çoğunlukla dilate olmuş venöz kanallar yoluyla gerçekleşirken direkt myometrial kas invazyonu kısıtlıdır. Perkreata tipte ise molar

villuslar uterusu baştan başa invaze eder ve perforasyona neden olarak çevre dokulara yayılıma neden olur (1).

**Koryokarsinoma:** Koryokarsinoma; makroskopik olarak sınırları belirli, 0.5-5 cm çapında, kabarık görünüm şeklinde kendini gösteren GTH türüdür. Gebeliğin erken evrelerinde trofoblastik hücrelerin sütunlar halinde miyometriuma doğru ilerlemesi sonucu meydana gelen koryokarsinoma da villuslu yapı gözlenmez ve hücrelerde önemli düzeyde sitolojik atipi bulunur. Koryokarsinoma, yeni oluşmuş lezyonlarda homojen koyu kırmızı, daha eski lezyonlar sarı-kahverenkli, hemorajik görünümlü ve pıhtı kıvamında bir tümördür. Tümör genellikle uterusun bir kısmında primer nodül veya nodüller endometrial kavitede izlenebilir ya da myometriuma uzanım gösterebilir. Buradaki anahtar nokta koryokarsinoma tümörünün genellikle uterus duvarında gelişmesidir. Mikroskopik olarak, malign trofoblastların çoğu primer nodülün periferinde yer alır çünkü tümör damar yapısına sahip olmadığı için koryokarsinom dokusu normal plasenta gibi davranış göstermektedir (1).

Özetle; koryokarsinoma, ileri derecede saldırgan bir tümör olup koryon epitelinin kaynaklanan koryonik epitelin karsinomu olup trofoblastik tümörlerin en malign türüdür. Hemoraji ve nekroz tümörün belirgin özelliği olup hidatiform ve invazif molün tersine villüs gelişimi koryokarsinomada bulunmaz (26).

**Plasental yerleşim bölgesinden gelişen trofoblastik tümör (PYBGTT):** Plasentanın implantasyon bölgesinde yer alan intermediyer sitotrofoblastlarından köken alan ve invazyon paterni normal plasental infiltrasyonu taklit eden bir tümör çeşididir.

Mikroskopik incelemede çoğu hücre tek çekirdekli olup mitotik aktivitesi oldukça yüksektir. Uterusun damarlanma eğilimi düşük olduğu için uzun süre uterusu sınırlı kalır ve tümör yayılım gösterdiğinde, koryokarsinomdan farklı olarak öncelikle çevre dokuların (parametrium, over, mesane, rektum ve bölgesel lenf nodları) tutulumu izlenir. PYBGTT'nin bir çeşidi olan epitelioid trofoblastik tümör (ETT)'ler intermediyer trofoblastlardan değil, koryonik tip intermediyer trofoblastlardan köken alır ve bu nedenle p63 ekspresyonu ile human plasental laktojen (HPL) ekspresyon yokluğu göstererek diğer PYBGTT'lerden ayrılır (27). İmmunohistokimyasal ayraçta PYBGTT'de sitokeratin ve human plasental laktojen boyaması yaygın olarak diffuze olurken, hCG boyaması fokal olarak görünür (28).

### **2.3. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Epidemiyoloji**

Demografik bölgeler baz alınarak yapılan araştırmalarda GTH'nin dünyanın değişik bölgelerinde belirgin olarak farklılık gösterdiği, risk faktörlerinin genetik, beslenme ve sosyoekonomik duruma göre değişebildiği görülmüştür (29). Irk ve sosyal özelliklerin hastalığa yakalanma riski üzerinde en az genetik faktörler kadar önemli olduğu bilinmektedir (30). Örneğin Asya kökenli olmak, ileri maternal yaş, düşük sosyoekonomik koşullar ve önceki molar gebelik yaşantısı risk faktörleri arasında yer almaktadır. Örneğin molar gebelik insidansı Japonya'da 1000 gebelikte 2, Avrupa ve Kuzey Amerika'da ise 1000 gebelikte 0.6 ile 1.1 arasında değişmektedir (31).

Hidatiform mol'ün (HM) insidansı oldukça farklılık göstermektedir. Örneğin Amerika Birleşik Devletleri'nde 1200 gebelikte 1'den 2500 gebelikte 1 görülme aralığına kadar değişiklik göstermektedir. Ülkemizde ise HM insidansı 1000 doğumda 1'e, 1000 gebelik için ise 0.3 ile 18 arasında değişkenlik göstermektedir (32).

Komplet mol ile parsiyel molün risk faktörlerini belirlemede molar gebelik insidansı diyetSEL ve sosyoekonomik faktörlere bağlanmıştır. İtalya ve Amerika'daki çalışmalarda beslenme ile alınan yetersiz karotenin komplet molar gebelik insidansı ile ilişkili olabildiği iddia edilmiştir. Çünkü molar gebelik insidansının yüksek olduğu bölgelerde A vitamini yetersizliğinin de yüksek olduğu görülmüştür (23).

### **2.4. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıkların Genetik Özellikleri**

Komplet mol hidatiformda koryonik epitel hücreleri diploid olarak kendini gösterir. % 85 oranında 46 XX, % 10 kadarı ise 46XY şeklindedir (18, 33). Parsiyel molarin % 90- 93 triploiddir (69 XXY). Parsiyel molde ise triploid karyotipe sahiplik söz konusu olduğu için normal ovum iki spermatozoa tarafından fertilize edilir (34). 69XXY, 69XYY, 69XXX gibi tipleri görülebilir.

## 2.5. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Risk Faktörleri

**Yaş:** Başvuru esnasında yirmi yaş altında minimal insidans riski görülürken, 35 yaş üzeri gebeliklerde bu artış belirgin hale gelmektedir (35). 40 yaşından daha yukarıda ise GTH'ye yakalanma riski 7,5 kat artmaktadır (36).

**Molar Gebelik Öyküsü:** Molar gebelik öyküsü olan kadınların bir sonraki gebeliğinde mol gelişme olasılığı % 1 olarak saptanmıştır. Bu kadınlarda hastalığın tekrarlama riski yaklaşık olarak 10 kat artmıştır (1).

**Spontan Abortus Öyküsü:** Öyküsü olmayan kadınlara göre risk 2-3 kat daha fazladır (36).

**Genetik:** Kromozom 19q13.4 ilgili NLRP7 geninde mutasyonun ailesel hidatidiform mole neden olduğu tespit edilmiştir (37).

**Etnik Köken:** Daha çok Asya ve Afrika kökenli kadınlarda görülmektedir. Özellikle koryokarsinoma riski daha fazladır. (38).

**Diyet:** Molar gebelik ve A vitamini ilişkisi ile folik asit, Beta karotenroten ve hayvansal gıdalar arasında ters ilişki vardır.

**Diğer sebepler:** Kürtaj, kan grubu, paternal yaş, sigara ve alkol tüketimi.

## 2.6. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Moleküler Patogenez ve Patoloji

Trofoblast gelişimini kontrol eden genlerin lokalizasyonu tam olarak bilinmese de sebep olan genlerin 7, 11 ve 19'uncu kromozomlar üzerinde olduğu düşünülmektedir (39, 40). 19q13.4 1.1Mb zonundaki mutasyonun ailesel olarak komplet mol ve bu molün persistan mole progresyon göstermesi ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir (40,41). NALP7 proteini 19q13.4 1.1Mb bölgesinden kodlanmakta olup patojen kaynaklı inflamasyon ve apoptozdan sorumludur. Bu durum, mutasyonun görüldüğü hasta grubunda hastalığın persistan kliniği ile uyum göstermektedir Ayrıca tam mol vakalarında maternal kromozomal DNA yapısı da izlenebilmektedir (42). Aslında komplet mol patogenezini genelde heterojendir ve nadiren de olsa maternal DNA kaybolmasa bile tam mol oluşabileceğini göstermektedir. "Imprinting" mekanizmasının bu duruma sebep olduğu bildirilmektedir (43).

Parsiyel mollerin büyük çoğunluğunu triploid nadiren de tetraploiddir. Parsiyel mollerde anaploid popülasyonlar da bulunmaktadır (44).

İnvazif molün patogenezi tam olarak bilinmemektedir. Sadece uterus içinde kalma süresi ile metastaz oluşumu arasında ilişki olabileceği ifade edilmektedir (45).

Koryokarsinoma'nın görülme sıklığı diğer GTH'lere kıyasla az olduğu için sitogenetik çalışmalar da oldukça kısıtlıdır. Son yıllarda koryokarsinom olgularında farklı ploidler ve kromozomal bozukluklar tespit edilmiştir (46). Ayrıca onkogen ve büyüme faktörleri koryokarsinomda diğerlerine oranla daha sıklıkla tespit edilmektedir. Özellikle c-fms, c-fos, cmyc ve c-ras onkogen ve protoonkogenlerinin dokuda eksprese olduğu tespit edilmiştir (47).

Hidatiform mol, plasental trofoblastlardan kaynaklanmaktadır. Komplet molde koryonik villuslar vesiküller şeklindedir. Villus ödemi diffüz olup damar yokluğu ve proliferasyon ile bu villuslar tespit edilir. Koryon epitelinde, hem sinsityotrofoblast hem de sitotrofoblastlarda proliferasyon her zaman vardır. Ancak hiperplazi çok çarpıcıdır. Maternal hCG seviyesi yüksektir (23). Parsiyel molde çok az dokuda trofoblast fazlalığı olduğu için patolojik olarak tanı koymak zordur. Bu molde fetus ile embriyonik membranlar bulunur ve mozaik şeklinde bir görünüm mevcuttur. Parsiyel molün en karakteristik özelliği fetal damarların, bazen de fetal eritrositlerin bulunabilmesidir (26).

İnvaziv mol histolojik olarak komplet mol ile aynıdır tek farkı myometriuma invaze olmasıdır. Molar doku kolonlar veya plaklar şeklinde myometriuma ilerler ve kan damarlarını invazyona uğratarak lokal kanamaya neden olur (48). Koryokarsinom ise trofoblastik hücreler kolonlar halinde kas tabakasına doğru ilerlemesiyle histolojik olarak ayırt edilir. Villöz yapı gözlenmez ve hücrelerde önemli düzeyde sitolojik atipi bulunur. Koryokarsinom'un en karakteristik özelliği ise tümörde hemoraji ve nekroz alanlarının olmasıdır (26).

## **2.7. Gestasyonel Trafablastik Hastalıklarda Sentez Aktivitesi**

GTH takibinde en uygun belirteç hCG seviyesidir. hCG değerinin serumda 100000 mIU/ml üzerine çıkması trofoblastik hastalığın erken döneminde beklenen bir sonuçtur.  $\beta$ -hCG miktarının serum veya idrardaki değeri ise canlı tümör hücrelerinin



sayısı ile paralellik göstermektedir. Bu sayede GTH'lerin takip ve tedavisinde hCG önemli bir tümör belirteci olarak rol almaktadır. Hastalığın tedavisi ile  $\beta$ -hCG miktarı azalmakta, rekürrenslerde ise değeri artmaktadır (49).

hCG'nin protein yapısı özellikle koryokarsinomada farklılık göstermektedir (50, 51). Çünkü koryokarsinomada üretilen hCG normal gebelikte sentezlenen hCG'ye göre daha büyük oligosakkarid yan zincirine sahiptir. Bundan dolayı da hiperglikolize hCG (h-hCG) olarak adlandırılır (52, 53).

## 2.8. Klinik Özellikler

**Vajinal kanama:** Özellikle komplet mollü hastalarda görülür. Bu hastaların yaklaşık % 84'ünde vajinal kanama ve kanamaya bağlı olarak da % 5'inde anemi mevcuttur (4).

**Anormal vajen büyüklüğü:** Endometrial kavite; hem koryonik dokularla hem de retansiyona uğramış kanla genişlediği için hastaların yaklaşık % 50'sinde gebelik yaşına oranla aşırı uterus büyüklüğü görülür (4, 54).

**Gebelik Toksemisi:** Genellikle preeklampsi şeklinde kendini gösterir. Hastaların yaklaşık % 27'sinde görülen bir semptomdur. Gebeliğin erken döneminde toksemi bulgularının saptanması durumunda komplet mol düşünülmelidir (4,55).

**Hipertiroidi:** Komplet HM gebeliklerinin % 2-7'sinde hipertiroidi belirtileri görülür. Bu hastalarda serbest tiroksin (T4) ve triiodotiroksin (T3) düzeyleri yüksektir (56).

**Teka Lutein Over Kistleri:** Olguların yaklaşık yarısında 5 cm büyüklüğün üzerinde teka lutein kistleri saptanmaktadır (55, 56).

**Diğer özellikler:** Hiperemezis gravidarum HM'de normal gebeliklerden daha sık görülür ve daha şiddetlidir. Olguların yaklaşık % 2'sinde trofoblastik embolizasyona bağlı respiratuar distres gelişebilir (4, 55, 56).

## 2.9. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Tedavi

### Mol Hidatiform tedavi

**Vakum küretaj:** Bu yöntem, uterusun büyüklüğünden bağımsız olarak tercih edilen molar gebelik sonlandırılması yöntemidir.

**Histerektomi:** Fertilizasyon isteği olmayan hastalarda, uterus ileri derecede

büyük ise fazla kanamaya yol açmadan kısa sürede boşaltılmak isteniyor ise bu yol tercih edilebilir.

Hasta molar küretajdan sonra,  $\beta$ -hCG normal seviyeye gelene kadar  $\beta$ -hCG takibine alınmalıdır. Sonrasında 6 ay boyunca rutin kontrol yapılmalıdır. Genellikle ilk normal  $\beta$ -hCG değerinin görüldüğü zaman, küretajdan sonraki 9. haftadır. B-hCG takibi esnasında hasta gebe kalmamalıdır. Bu nedenle hastaya bir doğum kontrol yöntemi önerilmeli ve öncelikli öneri, oral kontraseptifler veya bariyer yöntemleri olmalıdır. Uterin perforasyon riskinden dolayı  $\beta$ -hCG değeri normale dönmeden rahim içi araç takılmamalıdır (47).

### **Gestasyonel Trofoblastik Neoplazi (GTN)**

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. Tedavi temel olarak FIGO evrelemesi (Tablo 1) ve WHO prognostik skorlama sistemine göre yapılır (Tablo 2).

Koryokarsinomun histolojik tanısı tedaviyi kesinleştirirse de ilk tedavide yapılması gerekenleri değiştirmez. Hasta histolojik bulgular sonucu koryokarsinom tanısı aldı ise ve klinik ya da radyolojik olarak ektrauterin metastaz bulgusunda görülüyor ise hasta metastatik GTN kategorisine dahil edilir.

**Düşük Riskli GTN:** Düşük riskli GTN'ler; FIGO'nun 1, 2, ve 3. evreleri ile WHO'nun 0 – 6 olan skorlarını içermektedir. Hastalık takibinde; seviye normale gelene kadar haftalık  $\beta$ -hCG takibi sonrasında, bir yıl boyunca her ay normal değerlerde izlenen  $\beta$ -hCG takibi yapılmalıdır. Bütün bu takip süresince hasta etkin bir şekilde gebelikten korunmalıdır (47). Düşük riskli hastalara tek ajan kemoterapisi uygulanmalıdır (57).

**Yüksek Riskli GTN:** Bu vaka grubu; FIGO Evre 4 ve WHO'ya göre skoru  $\geq 7$  olan grubu kapsamaktadır (58). Yüksek riskli hastalara ilk olarak kombine kemoterapi uygulaması yapılır (57). Eğer metastaz var ise ancak o zaman cerrahi müdahale düşünülmelidir (4). Fakat metastaz vajinal bölgede ve bununla birlikte kanama görülüyor ise, vajinal tampon ya da geniş lokal eksizyon uygulanması söz konusu olabilir. Takipte, ardı ardına 3 hafta boyunca normal değer görülene kadar

haftalık  $\beta$ -hCG takibi sonrasında, bir yıl boyunca her ay normal değerlerde izlenen  $\beta$ -hCG ile takip edilmelidir. Daha sonrasında ise, geç rekürrens riskinden dolayı hasta 6 ayda bir serum  $\beta$ -hCG ile takibe devam etmelidir (47).

**Tablo 1.** 2000 FIGO Evrelendirmesi

<b>Evre I Hastalık uterusu sınırlı</b>
Evre Ia: Risk faktörü yok
Evre Ib: Bir risk faktörü var
Evre Ic: İki risk faktörü var
<b>Evre II Tümör uterus dışında ancak genital organlarda sınırlı (adneks, vajen, geniş bağ)</b>
Evre IIa: Risk faktörü yok
Evre IIb: Bir risk faktörü var
Evre IIc: İki risk faktörü var
<b>Evre III Tümör akciğerlerde; genital organ metastazı var veya yok</b>
Evre IIIa: Risk faktörü yok
Evre IIIb: Bir risk faktörü var
Evre IIIc: İki risk faktörü var
<b>Evre IV Tümör diğer tüm metastaz sahalarında</b>
Evre IVa: Risk faktörü yok
Evre IVb: Bir risk faktörü var
Evre IVc: İki risk faktörü var
<b>Risk faktörleri:</b>
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.

**Tablo 2.** GTH için WHO/FIGO prognostik skorlama 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 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup>	>10 <sup>5</sup>
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

### **2.9.1. Tedavide boşaltım sonrası profilaktik kemoterapi**

GTH'nin izleminde hCG ile takip edilebildikleri için profilaktik kemoterapi (KT) genellikle uygulanmamaktadır. Profilaktik KT ile metastatik hastalık riski ortadan kalkmakta ve nonmetastatik hastalık riskini de önemli oranda azalmaktadır. Lokal invazyon gösteren tüm vakalarda uygulanan ek KT kürü sonrasında, vakaların tümünde remisyon izlenmiştir. Bundan dolayı, profilaktik KT'nin hem metastazı önlediği, hem de lokal uterin invazyona bağlı insidans ve morbiditeyi düşürdüğü sonucuna varılmıştır (59).

1987-2006 yılları arasında 265 hasta ile yapılan retrospektif bir çalışmada, profilaktik KT uygulanan yüksek riskli hastalarda, KT almayanlara göre anlamlı bir şekilde daha düşük oranda postmolar neoplazi gelişimi izlenmiştir (3). HM olgularının % 80'inde spontan remisyon gerçekleştiği için profilaktik KT verilmesi ile olguların % 80'i KT'nin yan etkilerine maruz bırakılmıştır. Bir diğer tedavi rejimi de nonmetastatik ve metastatik hastalık gelişimi yönünden yüksek risk altında olan olgulara tedavi verilmesidir. Bu tedavi rejimi özellikle hCG ile izlemin mümkün olmadığı ve yahut güvenilir olmadığı durumlarda geçerli olabilir. Yüksek risk kriterleri, yüksek hCG değerleri, aşırı uterin büyüklük, teka lutein kistlerinin olması, rekürrent HM ve yaşı 18'in altında veya 35'in üzerinde olmasıdır (53).

### **2.9.2. Kemoterapi ve radyoterapi**

KT GTN'de tek ajan veya kombine olarak uygulanır. Tek ajan KT'sinde hem metastatik olmayan hem de düşük riskli metastatik GTH'da, Aktinomisin-D (Act-D) ve metotreksat (MTX) ile yüksek başarı sağlanmaktadır. Bu iki ajan için de farklı protokoller mevcuttur (60, 61, 62).

Act-D iki haftada bir 5 gün veya pulsatil olarak verilebilir. MTX da 5 günlük protokol ile veya haftada bir pulsatil olarak verilebilir. MTX'in sistemik toksisitesini istenilen seviyenin altında tutabilmek için beraberinde Folinik asit (FA) de verilmelidir (63, 64). MTX-FA tedavisi ile trombositopeni, granülositopeni, mukozit ve hepatotoksisite gelişmekte ve bu oranlar yaklaşık olarak sırasıyla % 2.9, % 5.8, % 6.4 ve % 10.2 bulunmuştur (65, 66). Tedavinin başından itibaren  $\beta$ -hCG seviyesi

sürekli bir düşüş göstermesi durumunda ek KT uygulanmaz ve standart aralıklı ek tek ajan KT protokolü yoktur. Tedaviden sonraki 18 gün içerisinde  $\beta$ -hCG'deki 1 log (% 10) düşüş tedavideki başarıyı göstermektedir.  $\beta$ -hCG 3 hafta art arda 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 (66).

Günümüzde kombine KT'de kabul gören kombinasyon; Etoposid, MTX, Act-D, siklofosamid ve vinkristinden (EMA-CO) oluşmaktadır ve yapılan çalışmalarda bu rejimin, yüksek riskli GTN grubunda % 76-94 arasında değişen oranlarda remisyon sağladığı gösterilmiştir (67, 68). Bu nedenle EMA-CO rejimi, prognostik skoru yüksek riskli olan hastalarda ve metastazı olan hastalarda öncelikli tedavi seçeneğidir (69, 70). EMA-CO KT protokolüne 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 (71, 72). Kombine KT'ye, toksisite izin verdiği sürece, 3 kez art arda normal serum  $\beta$ -hCG görülene kadar devam edilmelidir. Normal değerlere ulaşıldıktan sonra, relaps riskini azaltmak amacıyla iki ek KT kürü uygulanmalıdır (67).

Kemoterapi rezistansı ile ilişkili faktörler(73):

- Koryokarsinom patolojik tanısı
- Önceki gebeliğin mol olmaması
- Yüksek hCG seviyeleri
- Metastatik hastalık varlığı
- Yüksek FIGO skoru
- Artan yaş

Kombine KT protokolleri uygulanmasına bağlı olarak; bulantı, kusma, mukozit, alopesi, nöropati, myelosupresyon, enfeksiyon, karaciğer, böbrek disfonksiyonu, over fonksiyon kaybı, lösemi, meme, kolon gibi ikincil kanser gelişim riski, tek ajan tedavilerine göre artmıştır (74).

Beyin metastazı olan hastalara 10 gün boyunca 3000 cGY tüm beyin, Karaciğer metastazlarında ise 10 gün boyunca 2000 cGY tüm karaciğer RT uygulanır (75). Refrakter hastalıkta, KT'nin ciddi yan etkilere yol açtığı durumlarda Paklitaksel yalnız başına ya da ifosfamid, carboplatin, cisplatin veya etoposid ile kombine kullanılabilir (76, 77).

## **2.10. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Tedavi Sonrası**

Gestasyonel Trofoblastik Hastalıkların tekrarlama ihtimali molar gebelikten sonra yaklaşık % 1 civarındadır (78). KT sonrası kür sağlanmış GTN'li hastalar normal fertilitesine kavuşabilirler (79). Bu hastalarda infertilite riskinin artmadığı tespit edilmiştir. Kullanılan kemoterapötik ilaçların teratojenik ve mutajenik etkileri elbette olacaktır fakat bu oran büyük ve küçük malformasyonların oranı % 2.5 ile normal sınırlarda tespit edilmiştir (80).

## **2.11. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar ve Gebelikler**

Yapılan araştırmalara göre GTH tedavi edildikten sonra infertilite insidansında değişiklik olmadığı belirtilmektedir. Bunun yanı sıra ayrıca abortus insidansı, prematür doğum oranları, sezaryen oranları ve fetal anomali oranının normal popülasyonla aynı olduğu saptanmıştır. Kemoterapinin söz konusu olduğu hastalarda ise obstetrik komplikasyonların artmadığı ifade edilmiş kemoterapötik ajanların teratojenik ve mutajenik özellikleri bilinmesine rağmen GTN nedeniyle kemoterapi uygulanan hastalarda daha sonra gebe kaldıklarında fetal anomali riskinin artmadığı rapor edilmiştir (81, 82).

## **2.12. Folik Asit**

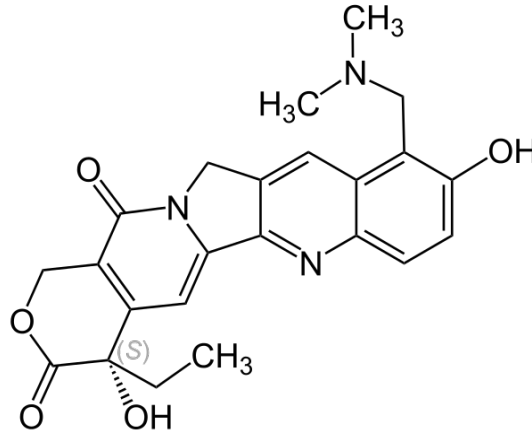
Hamilelikte folik asit konsantrasyonu azaldığı için homosistein düzeyleri yükselmiş olarak tespit edilen tromboz öyküsü olmayan hastalara gebelik öncesinde uygun dozlarda folik asit takviyesi yapılmalıdır. Folik asit, homosisteinin metiyonine dönüşümünde B12 vitamini ile birlikte remetilasyon basamağında görev alan 5-metiltetrahidrofolik asit şeklinde iken hücre içine taşındığında birçok enzimatik reaksiyonda rolü bulunan aktif bir bileşiktir. Normal gebelikte ikinci trimesterden sonra folik asit düzeyinde düşme görülür (83). Bu düşme lohusalıkta normale döner.

Folik asit eksikliği pek çok gebelikte birinci trimesterde bulunur. Maternal eritropoez ve fetusun büyümesi nedeniyle normal gebelikte folik asit ihtiyacı 100-150 µg/gün'den, 200-450 µg/gün'e çıkar. İlk trimesterde embriyo bu miktarı yeterli

miktarda alamaması sonucu NTD meydana gelmektedir. Folik asit, aktif transport ile plasentadan fetusa geçer (83). Folik asit eksikliğinde vücuttaki homosistein seviyesinde artış meydana gelirse vasküler patolojiler ve doğumsal nörolojik bozukluklar (nöral tüp defekti) meydana gelmektedir (85). Folik asit, birçok besinde özellikle yeşil yapraklı sebzelerde bulunmaktadır. Jejunumun proksimalinden emililerek, aktif taşıma ile hücre içine alınır ve enterohepatik sirkülasyona katılır (8).

### 2.13. Topotekan

Topotekan, 1996 yılında FDA tarafından onaylanan kemoterapi ilacı olup ‘kanser ağacı’ndan elde edilir. Özellikle over ve küçük hücreli akciğer kanserleri tedavisinde kullanılan topotekan kemoterapötik bir ilaç olan topoizomerazın inhibitörüdür. Topotekan hidroklorür kamptotesinin semisentetik türevi olup topoizomeraz I inhibitör aktivitesi olan antitümör bir ilaçtır. Topoizomeraz I, DNA’da reversible tek sarmal kırılımlarını indükleyerek DNA’nın ekseni etrafındaki gerilimi ortadan kaldırır. Topotekan, Topoizomeraz I DNA kompleksine bağlanır ve tek sarmal kırılımlarını engeller (Şekil 1).



Şekil 1: Topoizomeraz’ın formülü (13)

Topotekan; DNA sentezi esnasında, topoizomeraz I ve tersiyer kompleks ile replikasyon enzimleri etkileştiğinde topoizomeraz sitotoksitesi meydana gelmektedir. Bundan dolayı memeliler, bu çift sarmal kırılımlarını yeterli şekilde tamir edememektedirler. Topotekan 2-3 saat olan terminal yarı-ömrü ile multieksponansiyel farmakokinetik gösterir (13).

## 2.14. Hücre Kültürü

Hücre kültürü ökaryot hayvan hücrelerinden elde edilen hücrelerin laboratuvar koşulunda kontrol altında üretilmesi sürecidir.

20. yy'ın başlarından itibaren modern tıbbın gelişmesinde önemli bir yapı taşı olan hücre kültürü çalışmaları 1885'te Wilhelm Roux'un tavuk embriyosunun nöral plağından doku kültüre etmesiyle başlamıştır (49). Hücre kültürü; moleküler biyolojik çalışmalardan, kanser araştırmalarına, doku ve deri mühendisliğinden biyokimyasal çalışmalara, hastalıkların tanı ve araştırılmasında, kök hücre çalışmalarda, farmasötik proteinlerin üretimine kadar pekçok alanda kullanılmaktadır (85).

**Primer Kültürler:** Primer hücre kültürleri esas dokudan alınarak laboratuvar ortamında kültüre edilen hücre gruplarıdır. Bu hücreler, genotipik ve fenotipik açıdan köken aldıkları ile aynı özellikleri içerir. Primer hücre kültürleri belirlenen zaman içinde sadece in vitro koşullarda saklanabilirler. (86).

**Sürekli Kültürler:** Sürekli kültürler, bir seri hücrenin hedef kültüre 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 olarsa, bu tip hücre toplulukları farklı ve uzun süre saklanma yöntemlerini içeren bir sistem ile saklanmalıdır (87).

## 2.15. Sitotoksikite

Teknolojinin gelişmesine paralel olarak eczacılık ve medikal sektör gelişiyor olsa bile üretilen ilaçların % 90'ının piyasadan kaldırılmasının ve geliştirilen ilaçların 3'te birinin klinik faz denemelerde başarısızlığa uğramasının altında yatan neden toksisitedir. Toksik etkinin anlaşılmasına kadar geçen süre hem insanın hayatını tehlikeye atmakta hemde ciddi maddi kayıplar getirmektedir. Bunun önüne geçilmesi için yapılacak en iyi çözüm klinik denemelere geçmeden önce ilaçların toksik olmadığını kesinleştirilmesidir.

Hücre kültürü çalışmaları ile yapılacak invitro araştırmalar, test edilecek kimyasalların sitotoksik etkilerinin anlaşılmasına temel hazırlayacaktır (88). Şöyle ki; hücre hatları kullanılarak yapılan sitotoksikite çalışmalarda ilaç bileşenlerinin hücre



içerisine hangi miktarda hangi koşullarda alınacağını hücrenin diğer elemanları ile nasıl bir etkileşim gösterdiğinin ayrıntılı analizi yapılabilmektedir. Böylece bileşenin hedef proteine bağlanmasını tetikleyen ya da engelleyen mekanizmalar gözlemlenebilmekte ve buna alternatif seçeneklerle çalışmaya yön verilebilmektedir (89).

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 (46).

## **2.16. Apoptoz**

Canlı hücreler iki temel mekanizma ile ölümler; bunlardan biri nekroz diğeri apoptozdur. Nekroz hücrenin dışından gelen travmatik hücre ölümü iken; apoptoz yaşlanmış, genişlemiş, fonksiyonunu yitirmiş ya da hasarlı hücrelerin genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (90). Hücre ölümü yüzyıllardır bilinmesine karşın 'apoptoz' kelimesi ilk defa 1972'de J. F. K. Kerr tarafından kullanılmıştır. Apoptoz, rejenerasyon ve tamir olaylarında hücresel homeostazisin sağlanmasında ve organ büyüklüğünün korunmasında çok önemlidir. Nörodejeneratif hastalıklarda apoptoz oranının arttığı, otoimmün hastalıklarda ise apoptoz oranının azaldığı görülmüştür (91).

## **2.17. Flowsitometri (Akan Hücre Ölçer)**

Kantitatif apoptoz belirleme yöntemi olan Flow sitometri (FSM), akışkan içinde tek sıra halinde geçen hücrelerin farklı fiziksel özelliklerini yüksek hızda ölçmeye yarayan bir tekniktir. Onkolojinin vazgeçilmez tekniği arasına giren FSM; prognozu ve proliferasyon DNA indeksini belirlemenin yanı sıra immün yetmezlik hastalıkları, otoimmün hastalıklar, solid organ ve kemik iliği transplantasyonu vakalarında özellikle de hematolojik malignitelerde diagnostik olarak kullanılmaktadır (92).

FSM'nin en önemli avantajı çok hızlı ve çoklu değişkenin analizini yapma imkanı sağladığı için yaklaşık 100 kat kadar fazla sayıda hücrenin incelenmesinin yapılabilmesidir. FSM'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 (96, 94).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ile 2.0 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 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 (etilendiamin tetraasetik asit) karışımı 100ml (İnterlab), DMSO 50 ml (Dateks), Topotekan (topotecan hydrochloride Sigma 10 mg) (1, 5, 10, ve 50 µg/ml) ve folik asit (folic acid sigma 10 g) (1, 5 ve 10 µg/ml).

#### 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 cm<sup>2</sup>'lik ve 75 cm<sup>2</sup>'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 2. JAR ve JEG-3 hücre kültürlerini içeren flasklar ve hücre kültür plakları



**Şekil 3.** Flowsitometri

### **3.3. Kullanılan Aletler**

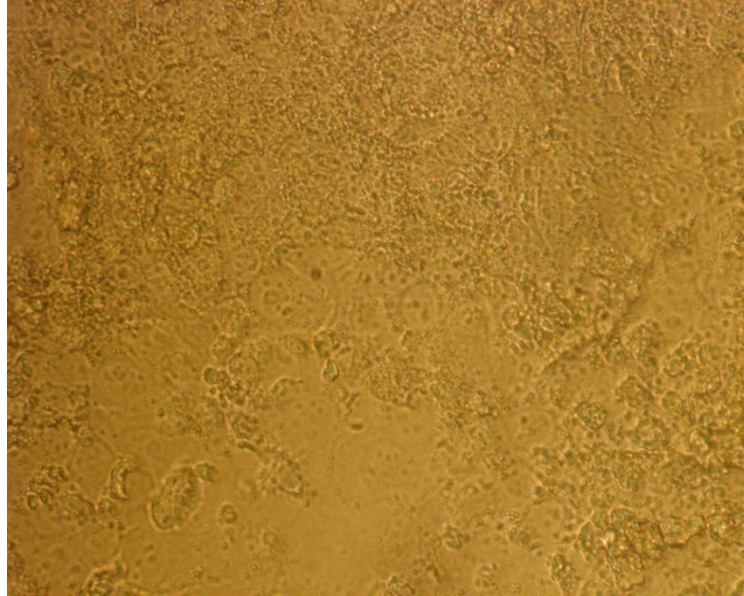
Soğutmalı santrifüj (Juan marka), Derin dondurucu (Juan marka -86), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO<sup>2</sup> inkübatörü (Nüve EC 160), Steril kabin (Nüve), otomatik pipetler, inverted Mikroskop (Leica).



**Şekil 4.** Nüve CO<sup>2</sup> inkübatörü

### 3.4. JAR ve JEG-3 Hücre Kültürleri

JAR ve JEG-3 hücreleri Bülent Ecevit Üniversitesinin 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 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda % 95'lik hava, % 5'lik CO<sup>2</sup> ortamı ve % 98 nem ortamında, 37<sup>0</sup>C'deki Nüve CO<sup>2</sup> 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 (dakikadaki devir sayısı)'de gerçekleştirilmiştir. Hücreler Neubauer lamında sayılıp, kuyucuk başına 1x10<sup>5</sup> hücre düşecek şekilde 12 ve 24 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. 2 gün inkübasyondan sonra besi ortamı tazelenerek topotekan ve folik asit hücrelerin üzerine eklenmiştir.



**Şekil 5.** JAR hücre kültürü mikroskopik görünümü

### **3.5. Topotekan ve Folik Asit Dozlarının Hazırlanması**

#### **3.5.1. Topotekan dozunun hazırlanması**

Topotekan Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 1, 5, 10, ve 50 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. Folik Asit dozunun hazırlanması**

Folik asit, 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 cm<sup>2</sup>'lik flaslara yetiştirilmiş ve % 95 hava ve % 5 CO<sup>2</sup>'li gaz ortamında ve 37<sup>0</sup> C'deki CO<sup>2</sup> inkübatöründe kültüre edilmiştir.

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

Topotekan belirlenen dozları hazırlanmıştır, çözücü olarak Dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmıştır. DMSO oranı % 1'i geçmeyecek şekilde ve son konsantrasyonları; 1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml olması sağlanarak hazırlanmıştır.

Folik asit, 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.

Topotekan ve folik asit kombinasyonunda; topotekanın 1µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 50µg/ml'lik dozları ile folik asitin 10µg/ml'lik dozu kullanılmıştır. Maddeler hücrelere aynı anda verilmiştir.

İlaç uygulamalarını izleyen 48. saatte hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılıp, apoptoz çalışmasına alınmıştır. Altı set içinde tripsin öncesi süpernatant toplanıp,  $\beta$ -hCG ve h-hCG (hiperglikolize human koryonik gonadotropin) ölçümü için derin dondurucuda saklanmıştır. İmmünoenzimatik yöntemle  $\beta$ -hCG ve h-hCG düzeyleri (Sunred Elisa Kit) DXI 600 cihazında (Beckman Coulter, CA, USA) çalışılmıştır.

### **3.6.3. Annexin V yöntemi ile apoptoz 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 apoptoza 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. Apoptoz 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 (21).

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 (22). 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 (23). Çalışmamızdaki apoptozis oranlarına erken apoptozis oranları, geç apoptozis oranları ve nekrotik hücre oranları dahil edilmiştir.

Deney setleri, kontrol grubu da dahil olmak üzere her biri ilacın tüm dozları için ayrı ayrı 6 kez kültüre edilmiştir. Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programında yapılmıştır.

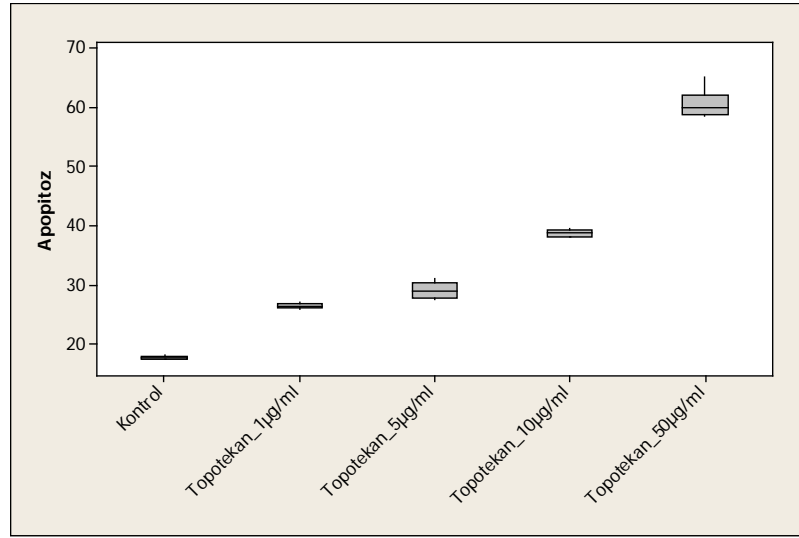
Çalışmada yer alan sürekli değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler medyan, minimum ve maksimum değerleriyle verilmiştir. Dozların 3 ve daha fazla grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis test, dozlar arası 2'li alt grup karşılaştırmalarda Bonferonni düzeltmeli Mann Whitney U testleri kullanılmıştır. Karşılaştırma sonuçlarının grafiksel gösteriminde kutu-çizgi grafiği kullanılmıştır. Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde p değeri 0,05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



## 4. BULGULAR

JEG-3 hücre kültüründe tüm kondüsyonlar sağlandığı halde üremeye rastlanılmadığı için çalışmaya JAG hücre kültüründe devam edilmiştir.

### 4.1. Topotekan'ın JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri



Şekil 6. Topotekan'ın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 3. Topotekan'ın artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranları

	Median (Min-Max)
JAR Kontrol	17,7 (17,5-18,2)
JAR Topotekan_1 µg/ml	26,4 (26,0-27,1)
JAR Topotekan_5 µg/ml	29,0 (27,6-31,0)
JAR Topotekan_10 µg/ml	38,7 (38,0-39,4)
JAR Topotekan_50 µg/ml	60,5 (58,6-65,0)

48 saatlik muamele sonunda topotekan 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz median oranı 26,4'tür. 5 µg/ml'lik muamele sonucu apoptoz median oranı 29,0'dır. 10 µg/ml'lik muamelesi sonucu apoptoz median oranı 38,7'dir. 50 µg/ml'lik muamelesi sonucu apoptoz median oranı 60,5'tir.

İstatistiksel olarak apopitoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır ( $p < 0,001$ ).

Anlamlılık değeri  $p < 0,001$  alındığında;

Topotekan\_1  $\mu\text{g/ml}$  ile kontrol arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ).

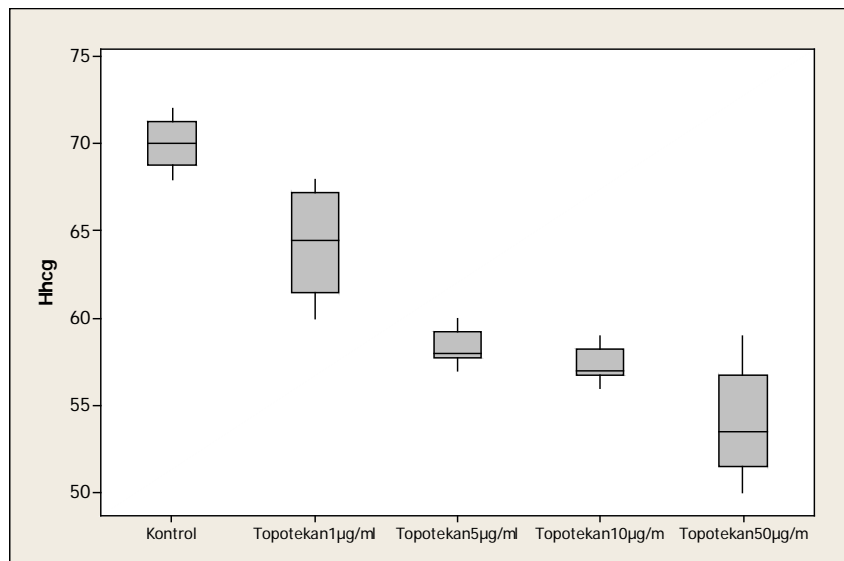
Topotekan\_5  $\mu\text{g/ml}$  ile kontrol arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ).

Topotekan\_10  $\mu\text{g/ml}$  ile kontrol arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ).

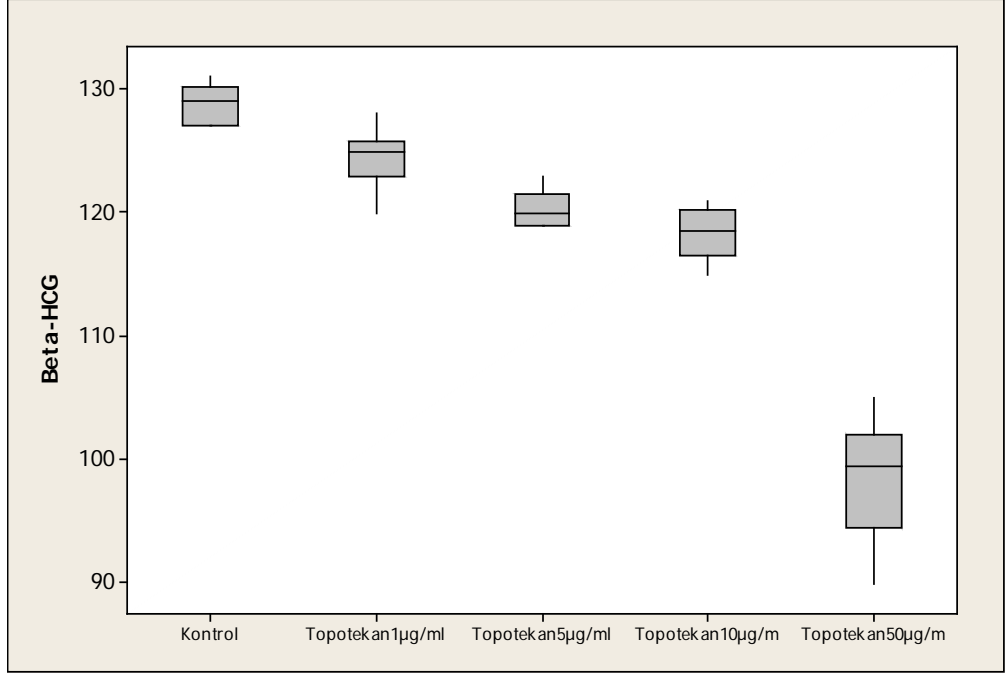
Topotekan\_50  $\mu\text{g/ml}$  ile kontrol arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ).

Topotekan\_1  $\mu\text{g/ml}$  ile Topotekan\_5  $\mu\text{g/ml}$  arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ). Topotekan\_1  $\mu\text{g/ml}$  ile Topotekan\_10  $\mu\text{g/ml}$  arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ). Topotekan\_1  $\mu\text{g/ml}$  ile Topotekan\_50  $\mu\text{g/ml}$  arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ).

Topotekan\_5  $\mu\text{g/ml}$  ile Topotekan\_10  $\mu\text{g/ml}$  arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ). Topotekan\_5  $\mu\text{g/ml}$  ile Topotekan\_50  $\mu\text{g/ml}$  arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ). Topotekan\_10  $\mu\text{g/ml}$  ile Topotekan\_10  $\mu\text{g/ml}$  arasında apopitotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p = 0,002$ ).



Şekil 7. Topotekan verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri



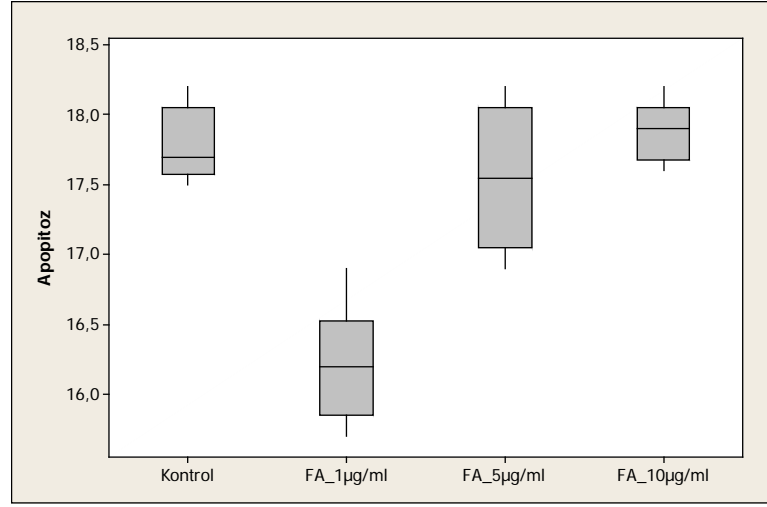
**Şekil 8.** Topotekan verildiğinde JAR hücre hattında  $\beta$ -hCG düzeyleri

**Tablo 4.** Topotekan verildiğinde JAR hücre hattında  $\beta$ -hCG ve h-hCG düzeyleri

	h-hCG	$\beta$ -hCG
<b>JAR Kontrol</b>	70	128
<b>JAR Topotekan_1 µg/ml</b>	64	124
<b>JAR Topotekan_5 µg/ml</b>	58	120
<b>JAR Topotekan_10 µg/ml</b>	57	118
<b>JAR Topotekan_50 µg/ml</b>	54	98

Topotekan dozunun artırılması ile  $\beta$ -hCG ve h-hCG düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0,001$ ).

## 4.2. Folik Asitin JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri



**Şekil 9.** Folik Asit'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

**Tablo 5.** Folik Asit'in artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranları

	Median (Min-Max)
JAR Kontrol	17,7 (18,2-17,5)
JAR Folik Asit_1 µg/ml	16,2 (15,7-16,9)
JAR Folik Asit_5 µg/ml	17,5 (16,9-18,2)
JAR Folik Asit_10 µg/ml	17,9 (17,6-18,2)

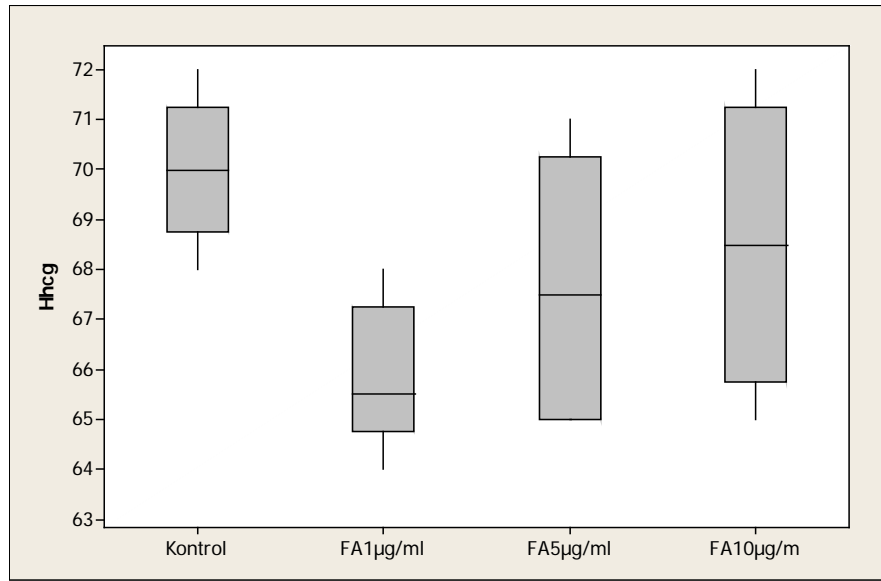
48 saatlik muamele sonunda Folik Asit'in 1 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz median oranı 16,2'dir. 5 µg/ml'lik muamele sonucu apoptoz median oranı 17,5'dir. 10 µg/ml'lik muamelesi sonucu apoptozis median oranı ise 17,9 olarak bulunmuştur.

**Tablo 6.** Folik Asit'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

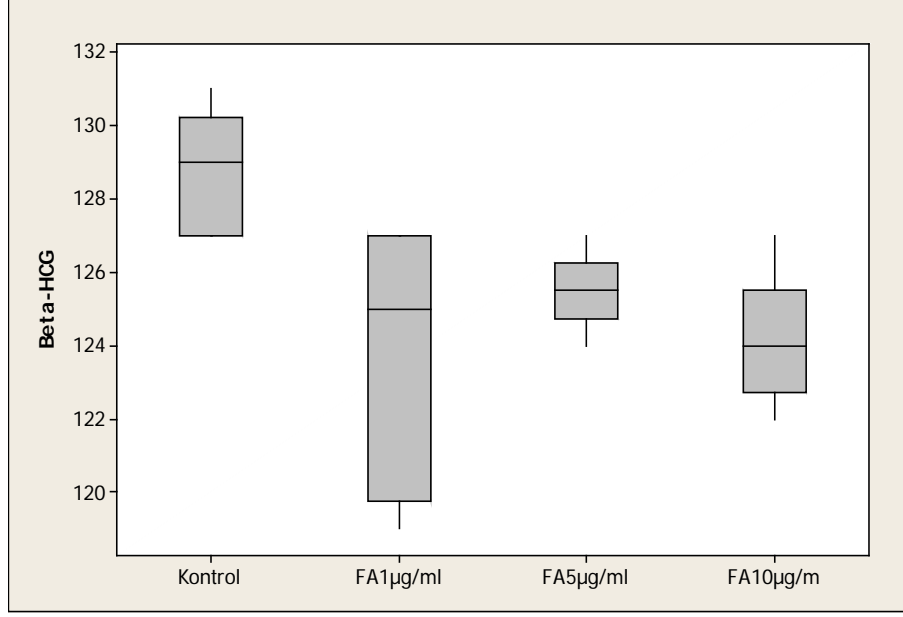
JAR	Folik asit 1 µg/ml / Kontrol	Folik asit 5 µg/ml / Kontrol	Folik asit 10 µg/ml Kontrol	Folik asit 1 µg/ml / Folik asit 5 µg/ml	Folik asit 1 µg/ml / Folik asit 10 µg/ml	Folik asit 5 µg/ml / Folik asit 10 µg/ml
P	<b>,002</b>	,394	,485	<b>,002</b>	<b>,002</b>	,240

Anlamlılık değeri  $p < 0,001$  alındığında;

Kontrol grubu ile Folik Asit\_1 µg/ml, Folik Asit\_1 µg/ml- Folik Asit\_5 µg/ml, Folik Asit\_1 µg/ml- Folik Asit\_10 µg/ml, arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var.



**Şekil 10.** Folik Asit verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri



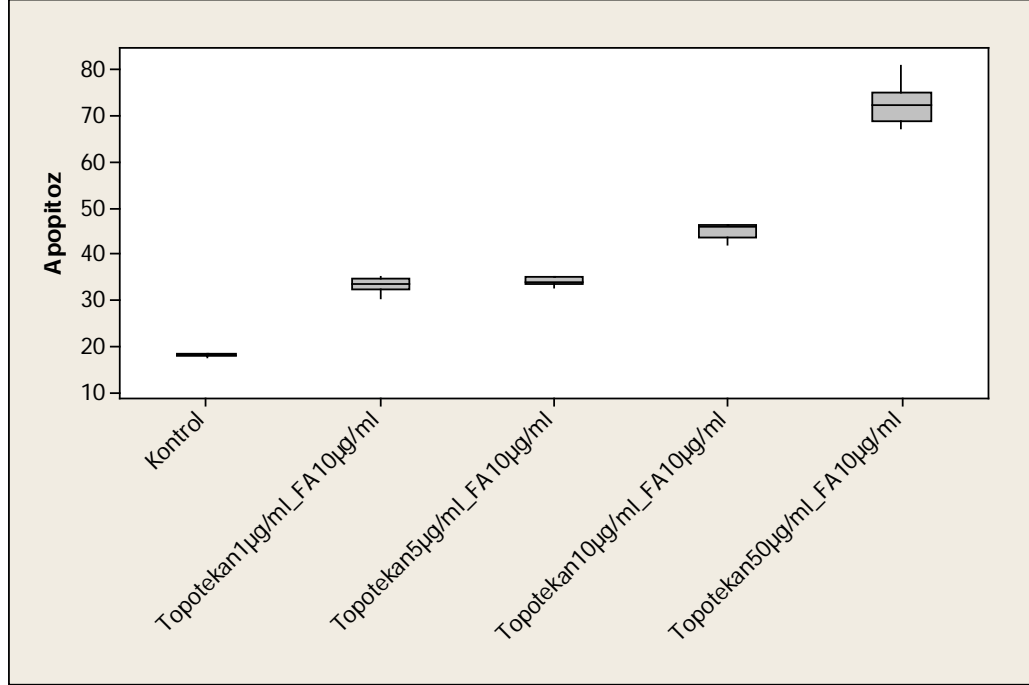
**Şekil 11.** Folik Asit verildiğinde JAR hücre hattında  $\beta$ -hCG düzeyleri

**Tablo 7.** Folik Asit verildiğinde JEG-3 hücre hattında  $\beta$ -hCG ve h-hCG düzeyleri

	h-hCG	$\beta$ -hCG
<b>JAR Kontrol</b>	70	128
<b>JAR Folik Asit_1 µg/ml</b>	65	123
<b>JAR Folik Asit_5 µg/ml</b>	67	125
<b>JAR Folik Asit_10 µg/ml</b>	68	124

$\beta$ -hCG ve h-hCG düzeylerinde Folik Asit'nin dozu ile orantılı bir değişiklik izlenmemiştir.

### 4.3. Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri



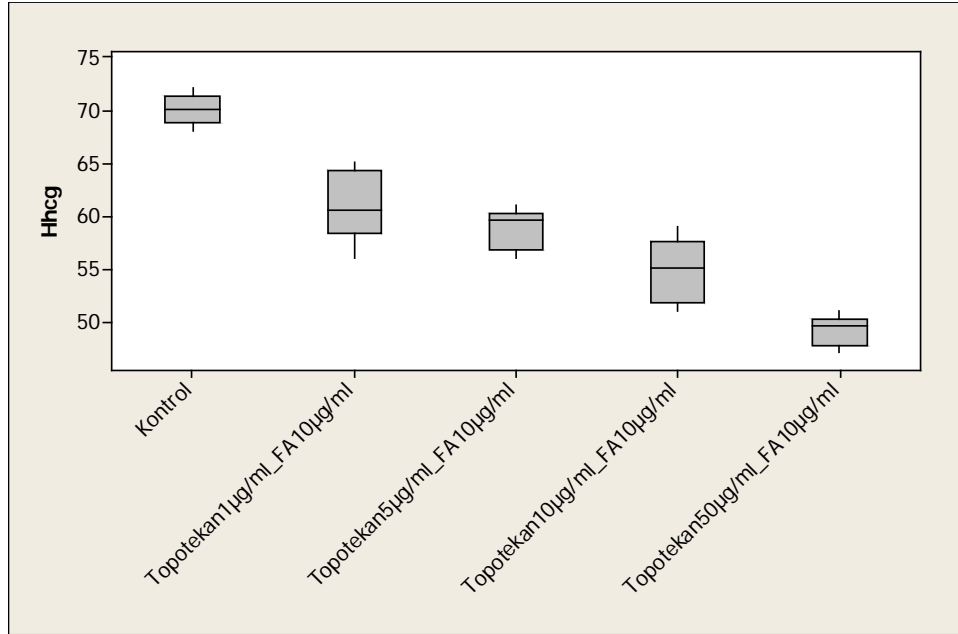
Şekil 12. Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 8. Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranları

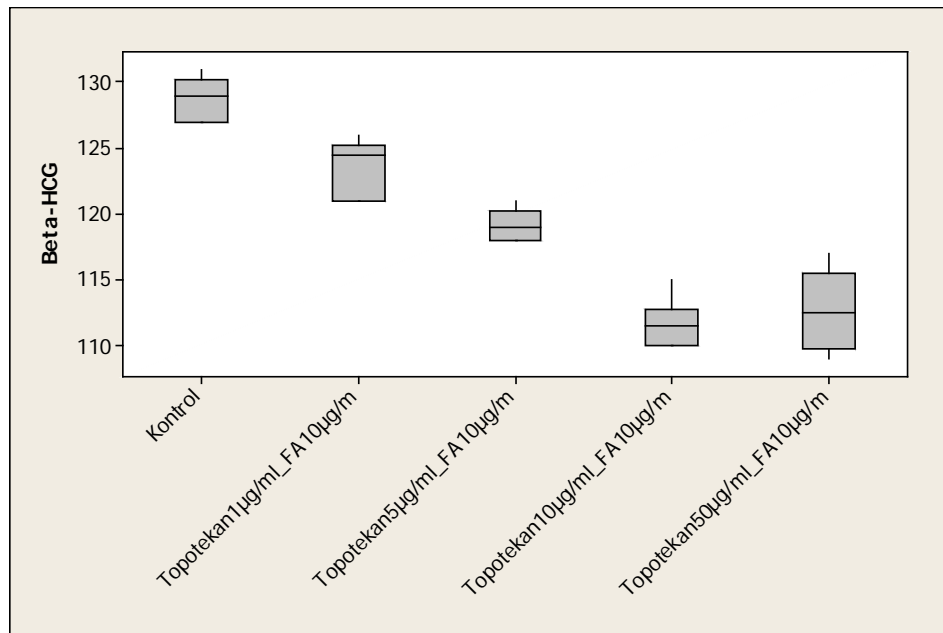
	Median (Min-Max)
JAR Kontrol	17,7 (17,5-18,2)
JAR Topotekan_1 µg/ml+ Folik Asit_10 µg/ml	33,1 (30,3-35,0)
JAR Topotekan_5 µg/ml+ Folik Asit_10 µg/ml	33,8 (32,5-35,0)
JAR Topotekan_10 µg/ml+ Folik Asit_10 µg/ml	44,9 (42,0-46,1)
JAR Topotekan_50 µg/ml+ Folik Asit_10 µg/ml	72,4 (67,2-81,0)

48 saatlik muamele sonunda 1 µg/ml Topotekan ile birlikte kullanılan Folik Asit'in 10µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz median oranı 33,1'dir. 5µg/ml Topotekan ile birlikte kullanılan Folik Asit'in 10µg/ml'lik doz uygulaması sonucu apoptoz median oranı 33,8'dir. 10µg/ml Topotekan ile birlikte kullanılan Folik Asit'in 10µg/ml'lik doz uygulaması sonucu apoptoz

median oranı 44,9'dur. 50µg/ml Topotekan ile birlikte kullanılan Folik Asit'in 10µg/ml'lik doz uygulaması sonucu apoptoz median oranı 72,4'tür. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır (p=0,002).



**Şekil 13.** Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri



**Şekil 14.** Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR hücre hattında  $\beta$ -hCG düzeyleri

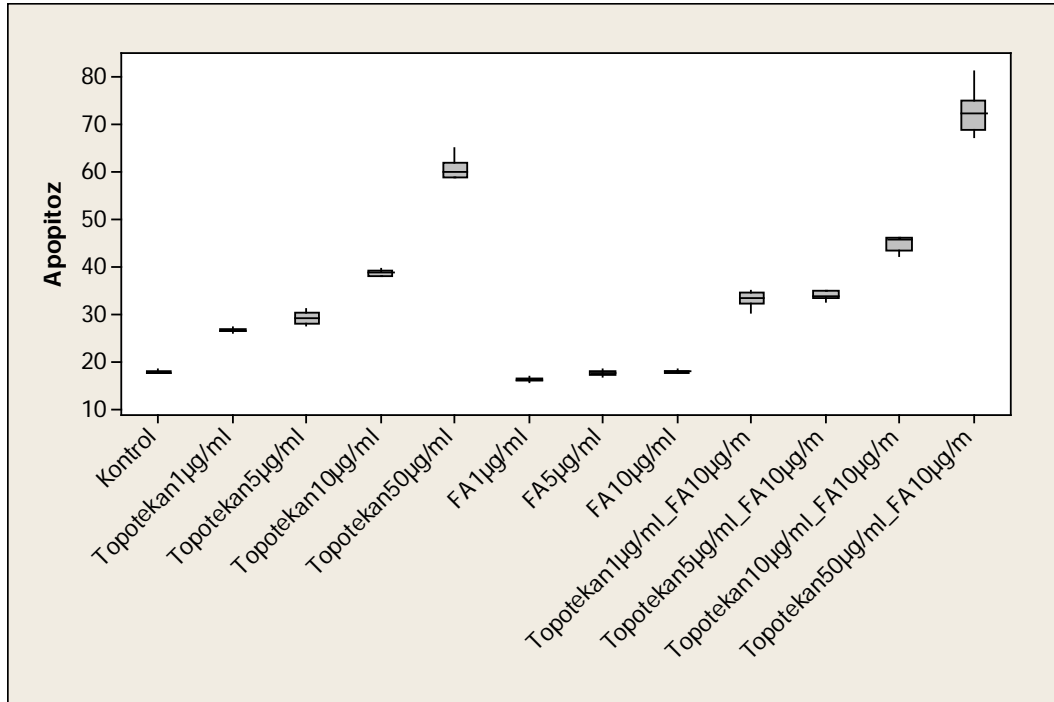


**Tablo 9.** Topotekan ile Birlikte Kullanılan Folik Asit'in JAR hücre hattında h-hCG ve  $\beta$ -hCG düzeyleri

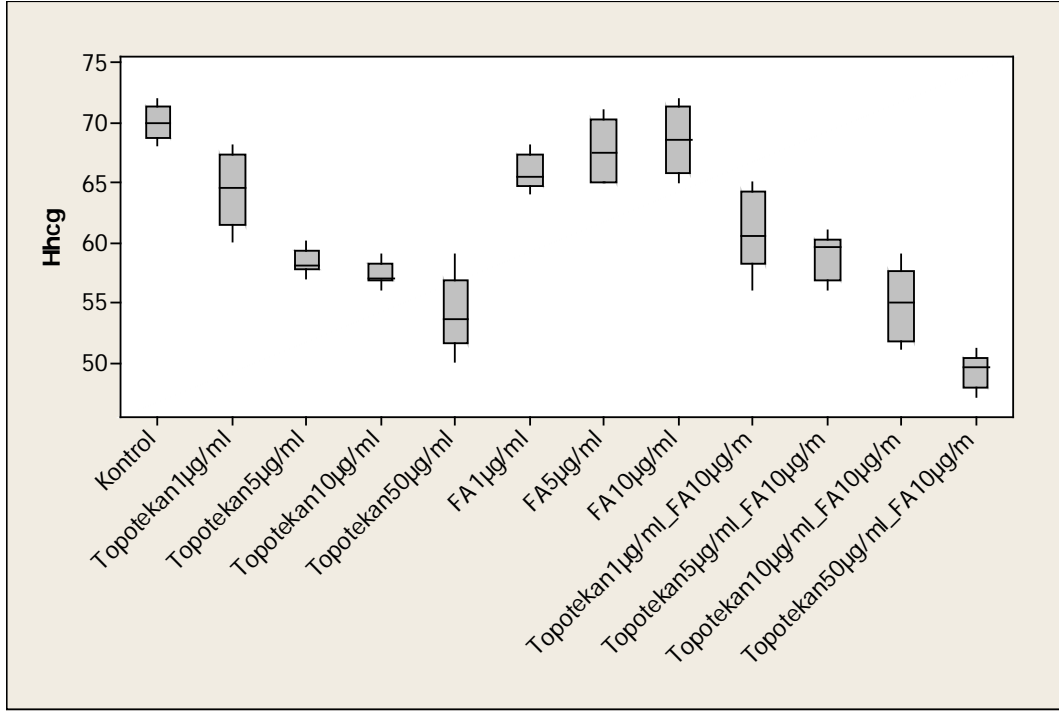
	h-hCG	$\beta$ -hCG
JAR Kontrol	70	128
JAR Topotekan_1 $\mu$ g/ml+ Folik Asit_10 $\mu$ g/ml	60	123
JAR Topotekan_5 $\mu$ g/ml+ Folik Asit_10 $\mu$ g/ml	58	119
JAR Topotekan_10 $\mu$ g/ml+ Folik Asit_10 $\mu$ g/ml	54	111
JAR Topotekan_50 $\mu$ g/ml+ Folik Asit_10 $\mu$ g/ml	49	112

Folik Asit ile birlikte kullanılan Topotekan dozunun artırılmasıyla  $\beta$ -hCG ve h-hCG düzeylerinde orantılı bir düşüş izlenmemiştir.

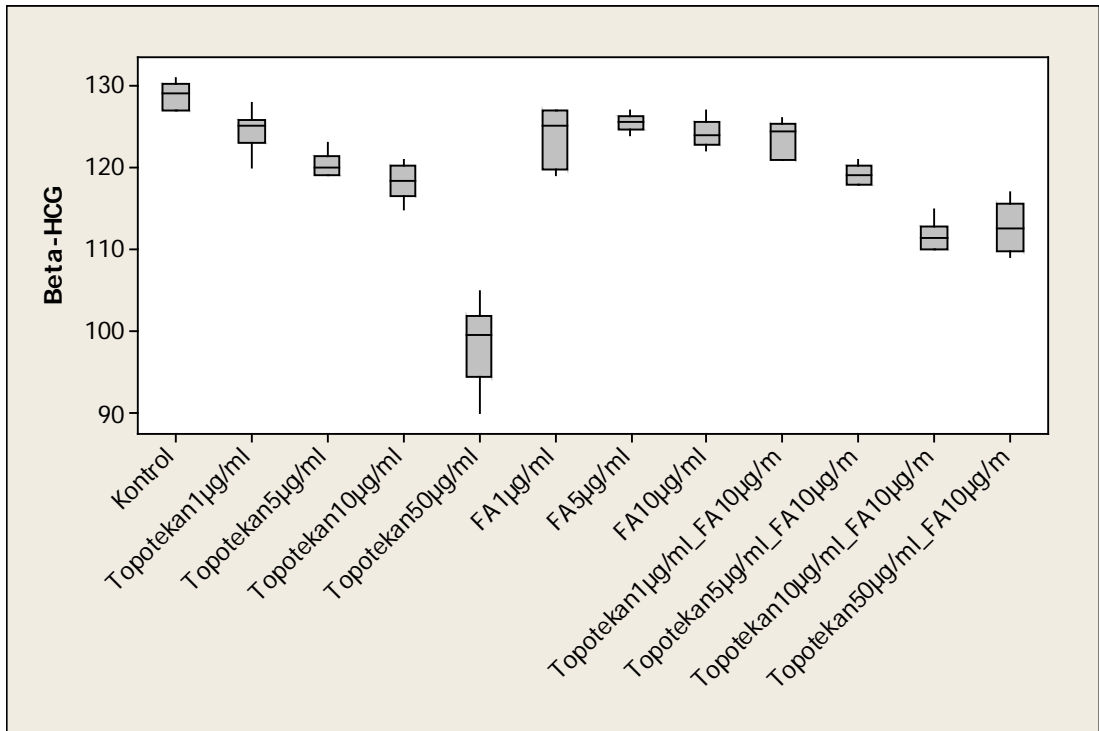
#### 4.4. Topotekan ve Folik Asit'in Ayrı Ayrı ve Birlikte Kullanılan Kombinasyonlarının JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkilerinin Karşılaştırılması



**Şekil 15.** Topotekan ve Folik Asit'in Ayrı Ayrı ve Birlikte Kullanılan Kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apoptotik grafiksel etkilerinin karşılaştırılması



**Şekil 16.** Topotekan ve Folik Asit'in Ayrı Ayrı ve Birlikte Kullanılan Kombinasyonlarının JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri



**Şekil 17.** Topotekan ve Folik Asit'in Ayrı Ayrı ve Birlikte Kullanılan Kombinasyonlarının JAR hücre hattında  $\beta$  -hCG düzeyleri

## 5. TARTIŞMA

Gestasyonel trofoblastik hastalıklar (GTH); multifaktöriyel etyolojiye sahip, patogenezi tam aydınlatılamamış, spontan rezolüsyon ile sonuçlanan benign hidatiformdan, ölümcül seyreden metastatik gestasyonel trofoblastik neoplaziye kadar değişken spektrum gösteren trofoblastların anormal proliferasyonu ile karakterize bir hastalık grubudur (95). Malign GTH molar gebelikten gelişebileceği gibi ektopik gebelik, abortus, preterm veya term gebelik sonrasında da gelişebilir. Trofoblastik dokunun malign transformasyonu kısmen de olsa, onkojenlerin aktivasyonu veya tümör süpresör genlerin inaktivasyonu ile ilişkili olabilir. Biz çalışmamızda JAR ve JEG-3 koryokarsinom insan hücre kültüründe topotekan ve folik asit etkisini araştırmayı amaçladık.

Erken teşhis ve tedavide uygun prosedürlerin uygulanması halinde hastaların tamamında potansiyel olarak tam iyileşme mümkün olmaktadır. Hastalığın gelişimi ve progresyonu multifaktöriyel olup çeşitli genetik ve çevresel faktörlerin rol oynadığı varsayılmaktadır. Yaş (25-35), molar gebelik öyküsü, spontan abortus öyküsü, genetik faktör, etnik köken, diyet gibi risk faktörlerinin yanısıra hCG seviyesi, tümörün çapı, metastaz yeri ve sayısı, kemoterapi öyküsü gibi sebepler GTH'nin nedeni olabilmektedir. GTH'nin özellikle plasentanın trofoblastik epitelinden kaynaklanan birbiriyle ilişkili, heterojenik yapıda olmasından dolayı GTH'nin tüm formları  $\beta$ -hCG artışı ile karakterizedir ve patogenezinden gestasyonel doku sorumludur. Bu sebeplerden dolayı çalışmamız folik asit ve topotekanın etkisi  $\beta$ -hCG ve h-hCG parametreleri ile apoptoz üzerinden yapılmıştır.

Son yıllarda hastalıkların tedavisinde ve yeni ilaçların geliştirilmesinde tekrardan doğal ürünlere odaklanılmıştır. Bu doğal ürünlerin antikanser aktiviteleri, kanser hücrelerinde apoptozisi tetiklemektedir. Artık ilaçların yan etkilerinin doku üzerinde oluşturduğu etki tespit edilmekte ve hedef doku da yaratacağı değişiklikler öngörülmektedir. Klinikte meydana gelme ihtimali olan bu sonuçların nedenlerinin tahmin edilebilmesi için insan tek tabakalı kanser hücre hatlarının kullanımı oldukça yaygındır. Bizim çalışmamız ise JAR ve JEG hatlarında yapılmış olup JEG-3 hücre kültüründe tüm kondüsyonlar sağlandığı halde üremeye rastlanmadığı için çalışmaya JAG hücre kültüründe devam edilmiştir.

Topotekan; Kamptotesinden sonra klinik denemeler için Amerika’da Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanan ilk topoizomeraz I inhibitörüdür (96). DNA hücre içinde “supercoiled” olarak adlandırılan paket şekilde bulunur. Supercoil yapı açılarak DNA; transkripsiyon, replikasyonu mitoz gibi aktiviteleri yerine getirir. İşte topoizomeraz enzimleri bu süreçten sorumlu enzimlerdir. Topoizomeraz I DNA’nın relaksasyonunu sağlar. Özellikle refrakter over kanseri ve refrakter küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde kullanılan topotekan topoizomeraz I enzim blokeridir (97). Çalışmamızda topotekan, apoptozda artış gösterirken h-hCG ve  $\beta$ -hCG arasında ters orantı olduğu görüldü. Kurtan ve ark. (2014)’nın rat overleri üzerinde yaptıkları çalışmada 5 gün boyunca i.p. 1,5-2 mg/kg doz topotekan uygulaması ile sadece bir hücre hattında % 75’ten fazla tümör inhibisyonu gözlemlendiğini ifade etmişlerdir (98). Lorusa ve ark. (2010) ise; topotekanın, Sisplatin ile birlikte serviks kanserinin tedavisinde ve diğer tedavi yöntemlerine cevap vermeyen metastatik over kanserli hastaların tedavisinde tek ajan olarak kullanılabilceğini ifade etmişlerdir (99). Biz ise topotekanın folik asit ile birlikte kullanılması halinde kanser tedavisine yardımcı olabileceği sonucuna vardık.

Kanser tedavisinde tümöre özgü spesifik bir ilaç dağıtım ajanı olarak kullanılan folik asit; tümörlü hücrelerin yüzeyindeki folat reseptörüne bağlanır. Bu kompleks endositoz yolu ile hücre içine alınarak kanser ilacı gibi çalışmaktadır. Eksojen bir antioksidan olan folik asit, metabolizmada oksidanları tutarak serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önleyici rol oynamaktadır. Fizyolojik olarak antioksidans sistem ile radikaller bir denge halindedir. Bu dengenin serbest radikaller tarafına kayması sonucu organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısı bozulur, hücre içi enzimler inaktifleşir, DNA hasarı oluşur, mitokondrilerdeki aerobik solunum bozulur, litik enzimler aktive olur, trombosit agregasyonu ve dokulara fagositlerin göçü artar. Oksidatif stres olarak adlandırılan bu olay hipertansiyondan osteoporoza kadar birçok hastalığa temel oluşturmaktadır ve başta da kanser ve ateroskleroz yer almaktadır. Ayrıca son zamanlarda gebelik gibi fizyolojik durumlarda da oksidatif stresin arttığı bildirilmiştir. Gebelik özellikle meme, uterus ve over kanserlerine karşı koruyucu rol oynamaktadır. Bizim çalışmamızda folik asit tek başına apoptozu artırırken h-hCG ve  $\beta$ -hCG oranları ile arasında herhangi bir ilişki saptanmamıştır. Disimone ve ark.(2004), insan plasentasının homosistein için

bir hedef olduğunu ve trofoblastların apoptoza uğrayarak fonksiyonlarını inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacıların folik asitin trofoblastlar üzerindeki etkilerini araştırdıkları başka bir çalışmada DNA fragmentasyonunun önemli ölçüde azaldığını ve h-hCG sekresyonunun azaldığını ifade etmişlerdir (100). Folik asit sitotrofoblast apoptozunu inhibe etmekte ve insan trofoblastı ile ilgili homosisteini önleyici etki göstermektedir. Yani folik asit homosistein mekanizmasını dengede tutmaktadır. Yapılan bir çalışmada folik asit ile  $\beta$ -hCG arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olduğu (101) belirtilmiş olmasına rağmen biz tek başına folik asit ile  $\beta$ -hCG arasında herhangi bir istatistiksel anlam bulamadık.

Medikal ilaçlar; hücreler üzerinde iki şekilde sitotoksik olarak etki eder. Bunlardan biri apoptoz, diğeri nekroz şeklindedir. Antikanser ilacı olarak kullanılacak ilaçların sitotoksik etkileri apoptotik yol üzerinden gerçekleşir. 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 üzerinde hakim bir konuma geçmesidir. Folik asitin oksidatif stres üzerindeki etkileri çokça araştırılmış olsa bile GTH üzerinde etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Topotekan ise literatürde akciğer tümörlerinde kullanılmış fakat koryokarsinoma üzerindeki etkisi bilinmemektedir. Bu çalışmada JAR ve JEG-3 hücrelerinde apoptozun derecesi FCM ile belirlenmiştir.

Çalışmamızda topotekanın 1  $\mu\text{g/ml}$ 'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz median oranı 26,4'tür. 5  $\mu\text{g/ml}$ 'lik muamele sonucu apoptoz median oranı 29,0'dır. 10  $\mu\text{g/ml}$ 'lik muamelesi sonucu apoptoz median oranı 38,7'dir. 50  $\mu\text{g/ml}$ 'lik muamelesi sonucu apoptoz median oranı 60,5'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır ( $p < 0,001$ ). Topotekan dozunun artırılmasıyla bakılan  $\beta$ -hCG ve h-hCG oranlarının ilaç dozunun artırılmasıyla anlamlı olarak azaldığı istatistiksel olarak görülmüştür.

Folik asitin 1  $\mu\text{g/ml}$ 'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz median oranı 16,2'dir. 5  $\mu\text{g/ml}$ 'lik muamele sonucu apoptoz median oranı 17,5'dir. 10  $\mu\text{g/ml}$ 'lik muamelesi sonucu apoptozis median oranı ise 17,9 olarak bulunmuştur. Folik asitin doza bağlı olarak kullandığımız en düşük doz olan 1  $\mu\text{g/ml}$ 'lik uygulama sonrası apoptozisi azalttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu halde, doz miktarları artırıldığı zaman dozlar arasında apoptozis oranları açısından istatistiksel

olarak anlamlılık bulunmamıştır. Folik asit dozunun artırılmasıyla bakılan  $\beta$ -hCG ve h-hCG oranları arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Topotekan ile birlikte kullanılan folik asitin 10 $\mu$ g/ml'lik doz uygulaması sonucu apopitoz median oranı 44,9'dur. 50 $\mu$ g/ml Topotekan ile birlikte kullanılan folik asitin 10 $\mu$ g/ml'lik doz uygulaması sonucu apopitoz median oranı 72,4'tür. İstatistiksel olarak apopitoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır (p=0,002). Topotekan ve folik asit kombinasyonunun dozunun artırılmasıyla bakılan  $\beta$ -hCG ve h-hCG oranlarının ilaç dozunun artırılmasıyla anlamlı olarak azaldığı istatistiksel olarak görülmüştür.

Yaptığımız çalışmada topotekanın tek başına artan dozlarla kullanıldığında JAR hücre serileri üzerindeki apopitotik etkilerinin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür. Folik asit sabit tutulup topotekan'ın dozu arttırıldığında JAR hücre serisinde apopitotik etkinin istatistiksel olarak daha da arttığı görülmüştür.

İnsan Koryokarsinom hücre hattı modelleri olan JAR üzerinde topotekan ve folik asit kombinasyon uygulaması ve immünoenzimatik yöntemle  $\beta$ -hCG ve h-hCG ölçümü her iki hücre hattında birden literatürde ilk kez yapılmıştır. Bu çalışma, her ne kadar JEG hücre serilerinde sonuç alınamamış olsa bile koryokarsinom tedavisinde doğal bir antioksidan olan folik asit ile topotekanın tümör tedavisinde kullanılabileceklerini göstermektedir.

## 6. SONUÇ

Yaptığımız bu çalışmada topotekanın JAR hücre hattında doza bağlı olarak apopitozis oranlarının arttığına dair istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür. Folik asit tek başına verildiği zaman doza bağlı olarak apopitozis oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma izlenmiştir. Hem topotekan hem de folik asitin birlikte verilmesi sonucunda da apopitozis oranlarının daha da arttığı görülmüştür. JEG-3 hücre kültüründe tüm kondüsyonlar sağlandığı halde üremeye rastlanmadığı için çalışmaya JAG hücre kültüründe devam edilmiştir.

Sonuçlar; topotekanın tek başına kemoterapötik olarak kullanılabilceği gibi folik asit ile birlikte de çoklu kombinasyon tedavisi için iyi bir seçenek olabileceğini desteklemektedir. Daha sonra yapılacak çalışmalar için gerek in vitro gerekse in vivo olarak araştırmalar tekrarlanarak yeni tedavi yöntemleri geliştirileceğini düşünmekteyiz.

## 7. KAYNAKÇA

1. Barışçıl A. Gestasyonel trofoblastik hastalıklar (gth): 5 yıllık klinik deneyimimiz. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıpta Uzmanlık Tezi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı. Diyarbakır, 2008.
2. Davis JR, Surwit EA, Garay JP, Fortier KJ. Sex assignment in gestational trophoblastic neoplasia. Am J Obstet Gynecol 29 (5): 148- 722, 1984.
3. Cole LA, Butler SA, Khanlian SA, Giddinbgs A, Seckl MJ, Kohorn EI. Gestational trophoblastic diseases: 2. Hyperglycosylated hCG as a reliable marker of active neoplasia. Gynecol Oncol 102 (10): 150–158, 2006.
4. Berkowitz RS, Goldstein DP. Chorionic tumors. The New England Journal of Medicine. 335 (8): 1740-1749, 1996.
5. Kurt RK, Hakverdi AU, Karapınar OS, Karateke A, Özçil MD. Gestasyonel Trofoblastik Hastalık: Üçüncü Basamak Deneyimi Gestational Trophoblastic Disease: Tertiary Center Experience. Tıp Araştırmaları Dergisi 12 (2): 59-62, 2014.
6. John R. Lurain, MD. Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. 2016. www.AJOG.org
7. Cole LA, Stephen A, Butler Sarah A, Khanlian Almareena Giddings Carolyn Y. Muller Michael J. Seckl Ernest I. Kohorn. Gestational trophoblastic diseases: 2. Hyperglycosylated hCG as a reliable marker of active neoplasia. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2005:12.045>.
8. Demir MB. Gebelikte Folik Asit Kullanımı ve Nöral Tüp Defekti İlişkisi Farkındalığının Demografik Özellikleri Uzmanlık Tezi. Samsun, 2008.



9. Budak N. Folik asitin kadın ve çocuk sağlığında önemi. Erciyes Tıp Dergisi Erciyes Medical Journal 24 ( 4): 209-214, 2002.
10. Aksoy M. Tip II diyabetik hastalarda Diyetle Alınan folat, Vitamin B12 düzeyi ve beslenme durumu ile plazma folik asit ve vitamin B12 Düzeyi arasındaki ilişkinin araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Yüksek Lisans Tezi. Ankara, 2010.
11. Benoist B. Impact of Folate Deficiency on Health. World Health Organization (Facsimile) 1998.
12. Aksu H, Sevil Ü, Yurtsever E, Güvendiren G. Nöral Tüp Defektleri ve Folik Asit. Maltepe Üniversitesi Hemşirelik Bilim ve Sanatı Dergisi 2 (3): 12-21, 2010.
13. Topoizmeraz ve Topotekan. www. kanser.org. Erişim tarihi: 23.10.2016.
14. Galan HL, Hobbins JC. Intrauterine growth restriction. In: Scott JR, Ed. Danforth's Obstetrics and Gynecology. 9th Ed., Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2003: 203-204.
15. Elvin JA, Crum CP, Genest DR. Complications of early pregnancy, including trophoblastic neoplasia. In: Crum CP, Lee KR, Eds. Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology. Philadelphia: Elsevier Saunders, 1015-1039, 2006.
16. Moore K, Persaud T.V.N. İnsan Embriyolojisi. 1. Baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2002; 139- 30
17. Green CL, Angtuaco TL, Shah HR, Parmley TH. Gestational trophoblastic disease: a spectrum of radiologic diagnosis. Radiographics 16 (6): 1371-84, 1996.
18. Çiçek MN, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A. Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi. 1.Baskı Ankara: Güneş kitabevi 491- 87 , 155-4, 153-49, 2004.

19. Paradinas FJ, Elston CW. Gestational trophoblastic diseases. In: Haines M, Taylor CW, Fox H, Wells M, Eds. Haines & Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone 1359-1430, 2003.
20. Lage JM, Minamiguchi S, Richardson MS. Gestational trophoblastic diseases: update on new immunohistochemical findings. Current Diagnostic Pathology (9): 1-10, 2003.
21. Beksaç S, Demir N, Koç A, Yüksel A. Maternal- Fetal Tıp & Perinatoloji. 1. Baskı İstanbul: Nobel tıp kitapevi, 60-58, 2001.
22. Elvin JA, Crum CP, Genest DR. Complications of early pregnancy, including trophoblastic neoplasia. In: Crum CP, Lee KR, Eds. Diagnostic Gynecologic and Obstetric Pathology. Philadelphia: Elsevier Saunders, 1015-1039, 2006.
23. Boylu T. Normal ve gestasyonel trofoblastik hasta plasentalarının ve bunların içerdikleri hormonların histolojik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi. Aydın, 2008.
24. Umar V, Cotran R, Robins S. Temal patoloji. 7. Baskı İstanbul: Nobel tıp kitabevi, 2003: 703- 1. Çeviri ed. Prof. Dr. Uğur Çevikbaş.
25. Seki K, Matsui H, Sekiya S. Advances in the clinical laboratory detection of gestational trophoblastic disease. Elsevier, Clinica Chimica Acta 349 (9): 1-13, 2004.
26. Özcan HÇ. Gestasyonel trofoblastik Hastalık Saptanan hastalarda serum sialik asit Seviyesinin araştırılması Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi. Gaziantep, 2010.
27. Yang A, Schweitzer R, Sun D, et al. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. Nature 398 (7): 714-718, 1999.

28. Huang X, Wang H, Zhao X, Xu X, Chen Q. Gestational trophoblastic disease following in vitro fertilization. *Arch Gynecol Obstet* 275 (9): 291-293, 2007.
29. Çetin M, Ö. Balta, B. Duran, T. Güvenal, O.Yanar. Kliniğimize Başvuran Mol Gebelik Olgularının Retrospektif İncelenmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 26 (1): 18 – 22, 2004.
30. Semer DA, Macfee MS. Gestational trophoblastic disease: Epidemiology. *Semin Oncol* 22 (4): 109-113, 1995.
31. Jeffers MD, O'Dwyer P, Curran B, Leader M, Gillan JE. Partial hydatiform mole: a common but underdiagnosed condition. *Int J Gynecol Pathol* 12 (9): 315-323, 1993.
32. Özalp S, Yalçın ÖT, Tanır HM. Hydatidiform mole in Turkey from 1932 to 2000. *Int J Gynaecol Obstet* 73 (8): 257-278, 2001.
33. Creasy RK, Resnik R. *Maternal- Fetal Medicine*. 4. Baskı Philadelphia, Pennsylvania: W. B. Saunders, 1140-35, 1999.
34. Atrash A. Gestational trophoblastic Disease. Moderator: M Mudely. School of Clinical Medicine Discipline of Anaesthesiology and Critical Care. 04 July 2014 No. 18.
35. Matsura J, Chiu D, Jacobs PA, Shulman AE. Complete hydatidiform mole in Hawaii: An epidemiological study. *Genet Epidemiol* 1 (1): 271-84, 1984.
36. Lurain JR. Gestational trophoblastic disease I: epidemiology, pathology, clinical presentation and diagnosis of gestational trophoblastic disease, and management of hydatidiform mole. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 203 (6) :531-539, 2010.

37. Wang CM, Dixon PH, Decordova S, et al. Identification of 13 novel NLRP7 mutations in 20 families with recurrent hydatidiform mole; missense mutations cluster in the leucine-rich region. *J Med Genet* 46 (4): 569-75, 2009.
38. American Cancer society. Gestational Trophoblastic Disease. Special issue. 2012.
39. Walsh C, Miller SJ, Flam F, Fisher RA, Ohlsson R. Paternally derived H19 is differentially expressed in malignant and nonmalignant trophoblast. *Cancer Research* 55 (3): 1111-1116, 1995.
40. Matsuda T, Sasaki M, Kato H, Yamada H, Cohen M, Barrett JC, Oshimura M, Wake N. Human chromosome 7 carries a putative tumor suppressor gene(s) involved in choriocarcinoma. *Oncogene* 15 (6): 2773-2781, 1997.
41. Panichkul PC, Al-Hussaini TK, Sierra R, Kashork CD, Popek EJ, Stockton DW, Van den Veyver IB. Recurrent biparental hydatiform mole: additional evidence for a 1.1-Mb locus in 19q13.4 and candidate gene analysis. *J Soc Gynecol Investig* 12 (8): 376-383, 2005.
42. Slim R, Mehio A. The genetics of hydatiform moles: new lights on an ancient disease. *Clin Genet* 71(18): 25-34, 2007.
43. Paradinas FJ, Elston CW. Gestational trophoblastic diseases. In: Haines M, Taylor CW, Fox H, Wells M, Eds. *Haines & Taylor Obstetrical and Gynaecological Pathology*. Edinburgh, New York: Churchill Livingstone 1359-1430, 2003.
44. Koennig C, Demopoulos RI, Vamvakos EC. Flow cytometric DNA ploidy and quantitative histopathology in partial moles. *International Journal of Gynecological Pathology* 12 (32): 235- 240, 1993.

45. Paradinas FJ, Browne P, Fisher RA, Foskett M, Badshawe KD, Newlands E. A clinical, histopathological and flow cytometric study of 149 complete moles, 146 partial moles and 107 non-molar hydropic abortions. *Histopathology* 28 (7): 101-109, 1996.
46. Apps R, Murphy SP, Fernando R, Gardner L, Ahad T, Moffett A. Human Leucocyte antigen (HLA) expression of primary trophoblast cells and placental cell lines, determined using single antigen beads to characterize allotype specificities of anti-HLA antibodies. *Immunology* 127 (21): 26-39, 2009.
47. Dülger BÖ. Gestasyonel trofoblastik hastalık oluşumu ve Prognozu bakımından mdm2 gen ekspresyonu, P53, c-erb-2 ve ki-67 ekspresyonu ile klinik Parametrelerinin değerlendirilmesi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilimdalı Uzmanlık Tezi. Adana, 2009.
48. Öner Ü. Komplet ve parsiyel mol hidatidiformda patolojik bulgular. In: Özalp S. ed. *Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar*. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi, 39-58, 1997.
49. Erol SA. JAR VE JEG-3 koryokarsinom insan hücre kültüründe lipozomal doksorubisin ve karoten etkisinin incelenmesi. Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi. Zonguldak, 2016.
50. Peters BP, Krzesicki RF, Hartle RJ, Perini F, Ruddon RW. 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: 15123–15130, 1984.
51. Husa R.O. Immunologic and physical characterization of human chorionic gonadotropin and its subunits in cultures of human malignant trophoblast *J. Clin. Endocrinol. Metab* 44 (11): 1154–1162, 1977.

52. Güner H. Tanı ve izlemde insan koryonik gonadotropini ve diğer hormonal yöntemler. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar. Özalp S, ed., Kadın doğum dergisi ek 2: 128-134, 2005.
53. Özalp S.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda izlem. T Klinikleri Jinekoloji ve Obstetri 14 (3): 182-186, 2004.
54. Altıntaş A. Mol hidatidiformda tanı, yaklaşım ve profilaktik kemoterapi. In Özalp S, ed. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi 119-135, 1997.
55. Özalp S, Hassa H, Şener T, Minsin T. Elli dokuz mol hidatidiform olgusunun değerlendirilmesi. Jinekoloji ve Obstetrik Bülteni 7 (2): 51-56, 1998.
56. Özgenoğlu M. Gestasyonel Trfoblastik Hastalıklarda Tiroid Fonksiyonlarının Değerlendirilmesi. Troid Fonksiyonlarının Takibi. Uzmanlık Tezi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi İç Hastalıkları AD. Van, 2011.
57. Morgan JM, Lurain JR. Gestational trophoblastic neoplasia: an update. Curr Oncol Rep 10 (5): 497-504, 2008.
58. 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 122-145, 2002.
59. Goldstein DP, Berkowitz RS. Prophylactic chemotherapy of complete molar pregnancy. Semin Oncol 1995; 22: 157-160.
60. 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.
61. Homesley HD. Single-agent therapy for nonmetastatic and low-risk gestational trophoblastic disease. J Reprod Med 1998; 43: 69-74.

62. Osborne R, Gerulath A. What is the best regimen for low-risk gestational trophoblastic neoplasia? A review. *J Reprod Med* 2004; 49: 602-16.
63. Fleisher M. Antifolate analogs: mechanism of action, analytical methodology, and clinical efficacy. *Ther Drug Monit* 1993;15: 521-6.
64. Treon SP, Chabner BA. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem* 1996; 42: 1322-9.
65. 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.
66. 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.
67. Gordon AN, Gershenson DM, Copeland LJ. High-risk metastatic gestational trophoblastic disease: further stratification into clinical entities. *Gynecol Oncol* 1989; 34: 54-56.
68. Shimizu T, Yaegashi N. Gestational trophoblastic tumors and recent clinical information. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002; 29: 1363-70.
69. 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.
70. 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.

71. 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.
72. Lurain JR, Nejad B. Secondary chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 618-23.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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 .
77. 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.
78. Schorge JO, Goldstein DP, Bernstein MR. Recent advances in gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 45 (34): 692-700, 2000.



79. 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* 47 (5): 380-396, 2002.
80. Garner E, Goldstein DP, Berkowitz RS, Wenzel L. Psychosocial and reproductive outcomes of gestational trophoblastic diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 17 (45): 959-68, 2003.
81. Tuncer ZS. Trofoblastik hastalıklarda kontrasepsiyon ve tedavi sonrası üreme fonksiyonu, *Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar*, Özalp S ed, Anadolu Üniversitesi Basımevi 183-191, 1997.
82. Berkowitz RS, Tuncer ZS, Bernstein MR ve ark. Management of gestational trophoblastic diseases: subsequent pregnancy experience. *Semin Oncol* (6): 678-85, 2000.
83. Ashfield-Watt PAL, Moat SJ, Doshi SN, McDowell IFW. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. What is the link? *Biomed Pharmacoter* 55(67): 425-433, 2001.
84. Wilson RD, Davies G, Desilets V, Reid GJ, Summers A, Wyatt P, Young D. Genetics Committee and Executive and Council of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada. The use of folic acid for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can* 25 (19): 959-73, 2003.
85. Akbaba G, Sunay Ç, Hayvan Deneyleri Yararsız ve Acımasız Çalışmalar mı, Sağlığımız İçin Önemli Bir Gereksinim mi? *Bilim ve Teknik*, Mayıs, 2000.
86. <http://www.biyologlar.com/primer-hucre-kulturleri?page=1>. Erişim tarihi: 04.11.2016.

87. Topal, Ş.R., Hücre kültür teknikleri-II Uygulamalar, Cemturan Ofset Matbaası, İstanbul,138-140. 2004.
88. Bono, J., Tolcher, A. ve Rowinsky, E., The future of cytotoxic therapy: selective cytotoxicity based on biology is the key, *Breast Cancer Research* 5 (9): 154-159,2003.
89. Halis, T.M., Kop, L.A., Gibson, J., Lebakken, S.C., Hancock, M., Kramer, H.K. ve Etienne, T.T.bAn improved  $\beta$ -lactamase reporter assay: multiplexing with a cytotoxicity readout for enhanced accuracy of hit identification, *Journal of Biomolecular Screening* 12 (76): 635-644, 2007.
90. Makowska K, Estañ MC, Gañán-Gómez I, Boyano-Adánez MC, García-Pérez AI, Sancho P. Changes in mitochondrial function induced by dequalinium precede oxidative stress and apoptosis in the human prostate cancer cell line PC-3. *Mol Biol (Mosk)*. 48 (2): 416-28, 2014.
91. He B, Tao H, Liu S. Effect of carboxymethylated chitosan on apoptosis and expression of brain derived neurotrophic factor and glial cell line derived neurotrophic factor in oxidative stress induced Schwann cells in vitro.; 28(5): 1530-5. 2014.
92. Aydın A, Özerol H. Lösemi ve Lenfomaların İrdelenmesi ve Teşhisinde Flow Sitometrik İmmün Tip Tayini. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 3 (2):53-78, 1996
93. Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Modernflow cytometry: a practical approach. *Clin Lab Med* 27 (3): 453-68, 2007.
94. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flowcytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 48 (27): 1819-1821, 2002.

95. Rustin GJS. Trophoblastic diseases. In: Shaw RW, Soutter WP, Eds. Gynaecology. 2nd Ed., London: Churchill Livingstone; 605-14, 1997.
96. Venditto VJ, Simanek EE. Cancer therapies utilizing the camptothecins: A review of the in vivo literature. *Mol Pharmaceut* 7 (9): 307-49, 2010.
97. Demir G. Akciğer Kanserlerinde Kemoterapi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri 8 (8): 175-178, 2001.
98. Kurtan M, Kurtoğlu M, Melikoğlu M Gülay. Kamptotesin. *Marmara Pharmaceutical Journal* 18 (45): 85-100, 2014.
99. Lorusso D, Pietragalla A, Mainenti S, Masciullo V, Vagno GV, Scambia G. Review role of topotecan in gynaecological cancers: Current indications and perspectives. *Crit Rev Oncol Hemat* 74 (34): 163–74, 2010.
100. Di Simone N, Riccardi P, Maggiano N, et al. Effect of folic acid on homocysteine-induced trophoblast apoptosis. *Mol Hum Reprod* 10(56):665-669. 2004.
101. Aytan H, Çalıklan AÇ, Demirtürk A, Aysal T, Hısım Y. The Relation Between First Trimester Screening Markers and Maternal Folic Acid and Vitamin B12 Levels. *Nobel Med* 7(2): 55-60, 2011.

## 8. EKLER

### Ek 1: Etik Kurul Kararı



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


**TOPLANTI TARİHİ** : 15/07/2014  
**TOPLANTI NO** : 2014/14

#### **KARARLAR :**

11-B.E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2014-132-15/07 Protokol no'lu "JAR ve JEG-3 Koryokarsinom İnsan Hücre Kültüründe Topotekan ve Folik Asit Etkisinin İncelenmesi" konulu çalışmanın Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

**A S L I G İ B İ D İ R**

  
**Doç. Dr. Hıral AYOĞLU**  
**B.E.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkan V.**