

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

**METOTREKSAT VE PAKLİTAKSEL KEMOTERAPİLERİNİN FARKLI  
KORYOKARSİNOM HÜCRE KÜLTÜR MODELLERİNDEKİ  
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Özgür ÖZER**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

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

**Zonguldak 2014**

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

**METOTREKSAT VE PAKLİTAKSEL KEMOTERAPİLERİNİN FARKLI**  
**KORYOKARSİNOM HÜCRE KÜLTÜR MODELLERİ ÜZERİNDEKİ**  
**ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Özgür ÖZER**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

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

**Zonguldak 2014**

## TEZ ONAY TUTANAĞI

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

Tez Başlığı : Metotreksat ve Paklitaksel kemoterapilerinin farklı koryokarsinom hücre kültür modelleri üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Özgür ÖZER

Tez Savunma Tarihi: 10/11/2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Aykut BARUT

Prof. Dr. Mehmet İbrahim HARMA  
Jüri Başkanı  
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
Prof. Dr. Mehmet İbrahim HARMA  
Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.  
Dipl. No: 2501 52363  
Uzm. No: 40959 54363

Prof. Dr. Hasan KAFALI

Üye  
Prof. Dr. Hasan KAFALI  
T.C. GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM  
Dip. No: 940711076

Doç. Dr. Aykut BARUT  
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
Doç. Dr. Aykut BARUT  
Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.  
Dipl. No: 86-AA-063  
Uzm. No: 31087-41332

UYGUNDUR



## ÖNSÖZ

*Uzmanlık eğitimim boyunca bir hazine değerinde olduğunu düşündüğüm bilgi birikimlerini ve tecrübelerini benimle paylaşarak yolumu aydınlatan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet İbrahim HARMA'ya, bir anne çşkatiyle ben dahil tüm öğrencilerinin üzerine titreyen ve hekimliğin bilgi kadar sevgiyle de yapılması gereken bir iş olduğunu bizlere anlatarak öğreten değerli hocam Sayın Prof. Dr. Müge HARMA'ya, ister ameliyat masasında olsun ister yaşamın içerisinde ııığıyla hepimize ilham veren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ülkü ÖZMEN'e, işimi severek, gülümseyerek ve gülümseterek yapmayı öğreten, tezimin oluşum sürecinde yönlendirmeleriyle tezimin çkillenmesini ve son haline gelmesini sağlayan ve her konuda desteğini gördüğüm, tez hocam Sayın Doç. Dr. Aykut BARUT'a, hekimlikte ve hayatta gittiğim yola bakmadan adım atmamayı ve doğru yolda kalmayı öğrendiğim hocam Sayın Doç. Dr. İnan İker ARIKAN'a, kısa bir süre olsada kendileri ile çalışma imkanı bulabildiğim için mutlu olduğum hocalarım Sayın Yrd.Doç.Dr. Ahmet İAHBAZ, Yrd.Doç.Dr. Hatice İİİK ve Yrd.Doç.Dr. Öner AYNIOĞLU'na;*

*İmmünoloji kliniğinin tüm imkanları ve çok büyük emeklerle tezimin laboratuvar aşamasının gerçekleştirilmesini sağlayan Sayın Doç. Dr. İhak Özel TEKİN'e*

*Tezimin istatistik aşamasında çalışmaya yaptığı katkılarından dolayı Öğr. Gör. Mustafa Çağatay BÜYÜKUYSAL'a;*

*Araştırma için gerekli maddi olanakları sağlayan BEÜ Bilimsel Araçlırmalar Birimine;*

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

*Bugün bulunduğum noktaya gelmemi sağlayan ve hayatımın her anında yanımda olan canım anneme, babama ve kardeşime, en zorlu anlarda yola devam etmemi sağlayan gücü bulduğum sevgili eşim Dr. Özlem ÖZER'e tüm kalbimle teşekkür ederim.*

**Dr. Özgür ÖZER**  
**ZONGULDAK, 2014**

## ÖZET

**Özgür Özer, Metotreksat ve Paklitaksel Kemoterapilerinin Farklı Koryokarsinom Hücre Kültür Modelleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Tezi, Zonguldak 2014.**

**Amaç:** Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar, insanda plasentadan gelişen bir grup hastalıktır ve koryokarsinom bunların malign formudur. Hastalığın medikal tedavisinde, hastalığın evresine göre, tek başlarına veya kombine kemoterapötik ajanlarla uygulanan pek çok tedavi rejimi bulunmaktadır.

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

**Gereç ve Yöntem:** İnsan koryokarsinom benzeri JAR ve JEG-3 hücrelerin RPMI-1640 ortamında %10 fetal dana serumu, penisilin-streptomisin varlığında 37°C, %95 hava, %5 CO<sub>2</sub> içeren atmosferde çoğaltıldı. Metotreksat (MTX) ve Paklitaksel'in uygulama grupları aşağıdaki gibi belirlendi;

Tek ilaç uygulaması için MTX'in 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml; PTX'in 10ng/ml'lik, 50ng/ml'lik, 100ng/ml'lik, 200ng/ml'lik, 400ng/ml'lik, 800ng/ml'lik ve 1600ng/ml'lik dozları kullanılmıştır.

PTX ve MTX kombinasyonunda; PTX'in 10ng/ml'lik, 50ng/ml'lik, 100ng/ml'lik, 200ng/ml'lik, 400ng/ml'lik, 800ng/ml'lik ve 1600ng/ml'lik dozları ile MTX'in 4 µg/ml'lik dozu kullanılmıştır.

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

**Bulgular:** Yaptığımız çalışmada MTX ve PTX'in tek başlarına artan dozlarla kullanıldıklarında hem JAR hem JEG-3 hücre serileri üzerinde ki apoptotik

etkilerinin de arttığını istatistiksel olarak gözlemledik. Bu iki ilaç kombine edilip MTX dozu sabit tutulurken PTX'in dozu arttırıldığında JAR hücre serisinde apoptotik etki artarken JEG-3 hücre serisi üzerinde bu etki 400 ng/ml'a kadar artmış bu doz ve üzerinde ise apoptotik etkinin istatistiksel olarak artmadığı görülmüştür.

**Sonuç:** İnsan Koryokarsinom hücre hattı modelleri olan JAR ve JEG-3 üzerinde PTX ve MTX'in kombine kullanımlarına ilişkin her iki hücre hattında birden literatürde çok az sayıda çalışma yapılmıştır. Elde edilen bu sinerjistik apoptotik veriler PTX ve MTX kombinasyonunun 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:** Metotreksat, paklitaksel, koryokarsinom, kemoterapi, hücre kültürü, apoptoz

## ABSTRACT

**Özgür Özer, The comparison of Methotrexate and paclitaxel chemotherapy effects on the different choriocarcinoma cell culture models, Bülent Ecevit University Faculty of Medicine Obstetrics and Gynecology Department of the Thesis. Zonguldak 2014.**

**Aim:** Gestational trophoblastic diseases are the group of diseases that originates from human placenta and choriocarcinoma which is the malignant form. There are many medical treatment methods with single or combined chemotherapeutic agents, depend on stage of the disease.

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

**Materials and Methods:** Human choriocarcinoma like JAR and JEG-3 cells were cultured at conditions 37°C, O<sub>2</sub> 95%, CO<sub>2</sub> 5% in RPMI-1640 environment that include 10% fetal bovine serum, penicillin-streptomycin. MTX and PTX trial groups are determined as shown below;

For single drug trial; MTX 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml; dosages were maintained.

For the combination of PTX and MTX; PTX 10ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 200ng/ml, 400ng/ml, 800ng/ml and 1600ng/ml dosages were maintained with MTX 4 µg/ml dosage.

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

**Findings:** We observed that in our study MTX and PTX's single or combined application with the increasing dosages cause to statistically significant increase of apoptosis ratios on the JAR and JEG-3 cell lines. We showed that there's been increase of apoptosis ratios on the both of JAR and JEG-3 cell lines when we apply the fixed dose

of MTX with the increasing dosages of PTX. But this effect hasn't found statistically significant on JEG-3 cell lines with 400ng/ml PTX and upper dosages.

**Result:** There are very slightly number of resarches has been made in the literature about the application of PTX and MTX on the both of JAR and JEG-3, human choriocarcinoma cell line models. The obtained synergistic apoptotic data indicated that; the combination of PTX and MTX could be used as one of the options in the struggle against multi-drug resistance encountered in the treatment of choriocarcinoma. However, the effect of the drugs with single application and with combination methods may be different in vivo systems, therefore the data should be supported initially by animal experiments and then clinical trials.

**Key words:** Methotrexate, paclitaxel, choriocarcinoma, chemotherapy, cell culture, apoptosis



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ .....	iii
ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
İÇİNDEKİLER .....	viii
KISALTMALAR LİSTESİ .....	x
TABLO LİSTESİ .....	xi
ŞEKİL LİSTESİ .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. GTH'larda Epidemiyoloji .....	3
2.2. GTH'larda Genetik Özellikler .....	4
2.3. GTH'larda Patolojik Bulgular ve Etiyopatogenez .....	5
2.4. GTH'larda Hormonal aktivite .....	6
2.5. Tedavide Boşaltım Sonrası Profilaktik Kemoterapi .....	7
2.6. Boşaltım Sonrası İzlem .....	7
2.7. GTH'larda Sınıflama ve Evrelendirme .....	8
2.8. Gestasyonel Trofoblastik Neoplazilerde Tedavi .....	10
2.8.1. Kemoterapi ve Radyoterapi .....	12
2.9. Tedavi Sonrası .....	14
2.10. Paklitaksel .....	14
2.11. MTX .....	16
2.12. Hücre Kültürü .....	17
2.12.1 Başlıca Hücre Kültür Tipleri .....	18
2.12.1.1 Primer Kültürler .....	18
2.12.1.2 Sürekli Kültürler .....	19
2.13. Sitotoksosite .....	19
2.14. Apoptoz .....	20
2.15. Flowsitometri .....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	22
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....	22
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler .....	22

3.3. Kullanılan Aletler .....	24
3.4. JAR ve JEG-3 Hücre Kültürleri .....	24
3.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması.....	26
3.5.1. Paclitaxel dozunun hazırlanması .....	26
3.5.2. MTX dozunun hazırlanması .....	26
3.6. Yöntem .....	26
3.6.1. Hücre hatlarının kültüre edilmesi .....	26
3.6.2. Kemoterapötiklerin testler için hazırlanması ve h-HCG ölçümü.....	26
3.6.3. Annexin V yöntemi ile apoptoz tespiti ve istatistiksel analiz .....	27
4. BULGULAR .....	29
4.1. MTX'in JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri .....	29
4.2. MTX'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri .....	31
4.3. PTX'in JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri .....	33
4.4. PTX'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri.....	35
4.5. MTX ile Birlikte Kullanılan PTX'in JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri.....	37
4.6. MTX ile Birlikte Kullanılan PTX'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri.....	39
4.7. Tek Başına ve MTX ile Birlikte Kullanılan PTX'in JEG Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkilerinin Karşılaştırılması .....	42
4.8. Tek Başına ve MTX ile Birlikte Kullanılan PTX'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkilerinin Karşılaştırılması .....	43
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ .....	47
7. KAYNAKÇA .....	48
8. EKLER .....	61
Ek 1: Etik kurul kararı.....	61

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>APL</b>	: Akut Promiyelosit Lösemi
<b>B</b>	: Beta
<b>BT</b>	: Bilgisayarlı Tomografi
<b>DHFR</b>	: Dihidrofolat Redüktaz
<b>DMSO</b>	: Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>EMA-CO</b>	: Etoposid, Metotreksat, Aktinomisin-D, Siklofosfamid, Vinkristin
<b>FA</b>	: Folinik Asit
<b>FCM</b>	: Flow Sitometri
<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>hhCG</b>	: Hiperglikolize Human Koryonik Gonadotropin
<b>HIV</b>	: İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü
<b>hPL</b>	: Human Plasental Laktojen
<b>HM</b>	: Hidatidiform Mol
<b>KT</b>	: Kemoterapi
<b>MRG</b>	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
<b>MTX</b>	: Metotreksat
<b>PTX</b>	: Paklitaksel
<b>PS</b>	: Fosfatidilserin
<b>PYBGTT</b>	: Plasental Yerleşim Bölgesinden Gelişen Trofoblastik Tümör
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RPMI</b>	: Roswell Park Memorial Institute
<b>RT</b>	: Radyoterapi
<b>SPSS</b>	: Statistical Package for the Social Sciences

## TABLO LİSTESİ

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Tablo 1. 2000 FIGO Evrelendirmesi .....	8
Tablo 2. DSÖ Histolojik Sınıflama Sistemi .....	9
Tablo 3. GTH için DSÖ/FIGO prognostik skorlama sistemi.....	9
Tablo 4. MTX'in artan dozlarda JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı.....	29
Tablo 5. MTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	30
Tablo 6. MTX'in artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı.....	31
Tablo 7. MTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	32
Tablo 8. PTX'in artan dozlarda JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı.....	33
Tablo 9. PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$ .....	34
Tablo 10. PTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	34
Tablo 11. PTX'in artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı.....	35
Tablo 12. PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$ .....	36
Tablo 13. PTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	36
Tablo 14. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı .....	37
Tablo 15. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$ .....	38
Tablo 16. MTX ile birlikte PTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	39
Tablo 17. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı.....	40

Tablo 18. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değereri $p<0,05$ .....	40
Tablo 19. MTX ile birlikte PTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri .....	41
Tablo 20. Tek başına ve MTX ile birlikte kullanılan PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değereri $p<0,05$ .....	42
Tablo 21. Tek başına ve MTX ile birlikte kullanılan PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değereri $p<0,05$ .....	43

## İÇERİK LİSTESİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 1. Paklitaksel 'in formülü .....	14
Şekil 2. MTX'in kimyasal yapısı.....	16
Şekil 3. JAR ve JEG-3 hücre kültürlerini içeren flasklar ve hücre kültür plakları.....	23
Şekil 4. 24 kuyucuklu hücre kültür plağı.....	23
Şekil 5. Flowsitometri .....	23
Şekil 6. Nüve CO <sup>2</sup> inkübatörü .....	24
Şekil 7. JAR hücre kültürü mikroskopik görünümü .....	25
Şekil 8. JEG-3 hücre kültürü mikroskopik görünümü .....	25
Şekil 9. MTX'in JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	29
Şekil 10. MTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri .....	30
Şekil 11. MTX'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi .....	31
Şekil 12. MTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri .....	32
Şekil 13. PTX'in JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi .....	33
Şekil 14. PTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	34
Şekil 15. PTX'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi .....	35
Şekil 16. PTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	36
Şekil 17. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	37
Şekil 18. MTX ile birlikte PTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	38
Şekil 19. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	39
Şekil 20. MTX ile birlikte PTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri.....	41
Şekil 21. Tek başına ve MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JEG-3 hücre hattı üzerine apoptotik etkilerinin grafiksel karşılaştırılması .....	42

Şekil 22. Tek başına ve MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JAR hücre hattı üzerine apoptotik etkilerinin grafiksel karşılaştırılması .....	43
---	----

## 1. GİRİŞ

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

Komplet ve parsiyel HM, invaziv mol, koryokarsinom, histopatolojik olarak plasental yerleşim bölgesinden köken alan trofoblastik tümörler (PYBGTT) olarak sınıflandırılırlar.

Bu hastalıklarda kemoterapinin (KT) etkin olması, human koryonik gonadotropinin (hCG) beta ( $\beta$ ) subünitinin hassas olarak ölçülebilmesi ve tümör belirteci olarak kullanılması sayesinde günümüzde GTN'ler hastalığın yaygın olduğu durumlarda dahi tedavi edilebilmektedir. Koryokarsinomada üretilen hCG normal gebelikte sentezlenen hCG'den daha büyük oligosakkarid yan zincirine sahip olduğundan hiperglikozile hCG olarak adlandırılır. Hiperglikozile hCG gelecekteki çalışmalarda kullanılabilir bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir (2) Bir GTN olan koryokarsinom, yüksek metastatik potansiyeli olan neoplastik bir durum iken HM, malign dönüşüm ihtimali bulunan anormal plasenta yapısına sahiptir (3; 4). Gestasyonel trofoblastik neoplaziler (GTN) genellikle HM sonrası gelişebildikleri gibi terapötik veya spontan abortus, ektopik ya da term gebeliği de takiben gelişebilmektedirler. Gebeliği takiben gelişen koryokarsinom ve PYBGTT'ler gerçek neoplazmlardır. Çocukluk çağı akut lösemilerinde bir antimetabolit olan Metotreksat (MTX), 1948'den günümüze klinik kullanımda olan bir ajandır. MTX, aktif olarak bölünen hücrelerde dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe ederek folik asitin, folinik asite dönüşümünü engelleyen sitotoksik kemoterapötik ajandır (5; 6). MTX başta çocukluk çağı lösemi-lenfomaları olmak üzere akciğer kanseri, meme kanseri, baş ve boyun kanserleri, osteosarkom, üroepitelyal kanserler gibi solid organ tümörlerinin tedavisinde kullanılır (7). Yakın zamanlarda, MTX'in aynı zamanda antiinflamatuvar, antiproliferatif, immunosupresif, antipsöriyatik etkinlikleri de olduğu bulunmuştur (8; 9). Bu etkileri sayesinde MTX, kanser tedavisi yanında romatizmal hastalıklar, psöriazis gibi enflamatuvar hastalıklar, sarkoidoz, dermatomyozit, Wegener granülomatozisi, insan bağışıklık yetmezlik virüsü (HIV) ile ilişkili



bakteriyel, parazitik enfeksiyonlar ve ektopik gebelik, ilk trimesterde gebelik terminasyonları ve gestasyonel trofoblastik hastalıklar (GTH) gibi jinekolojik ve obstetrik durumlarda da tercih edilen bir ajan haline gelmiştir (10; 11). MTX'in sitotoksik etkisi, kanser hücreleri için seçici değildir. Bu sebeple kemik iliğindeki hematopoetik hücreler ve barsak mukozasındaki aktif bölünen hücreler gibi proliferasyon hızı yüksek dokuları da etkilemektedir (12). Şiddetli enterokolit ya da intestinal hasar gibi toksik etkileri nedeniyle MTX'in etkinliği, sıklıkla sınırlanmaktadır. Ağır yan etkilerin varlığında doz azaltımına gidilmekte ya da tedavi yarıda kesilebilmektedir. Yüksek doz MTX'in akut lösemi tedavisinde aralıklı olarak kullanımı ile psöriasis tedavisinde uzun süre düşük doz kullanımının progresif hepatik fibrozis ve siroza kadar ilerleyen hepatotokisiteye neden olabilmektedir (13).

Paklitaksel tubulini hedef alan birkaç sitoskeletal ilaçtan birisidir. Paklitaksel antitümör etkisini hücrede beta-tubulin subunitine bağlanarak mikrotubullerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotubul toplulukları oluşturmak suretiyle göstermektedir (14).

Sonuçta paklitakselin etki ettiği hücrelerde mitotik iğ iplikçiklerinin oluşması, kromozom ayrışması ve hücre bölünmesi engellenmektedir. Sitoskeletal yapıyı etkileyen ve mikrotübüllerin birleşmesini engelleyen kolşisin gibi ilaçların aksine paklitaksel mikrotübül polimerlerini stabilize eder ve onları ayrışmadan korur. Bunun sonucunda kromozomlar metafazda iğ iplikçiklerini oluşturamazlar veya oluşan iğ iplikçikleri sentromerlerden ayrılamazlar. Bu noktada hücre apoptoza veya bölünme öncesi G fazına dönerek mitozu sonlandırır.

## 2. GENEL BÖLGÜLER

### 2.1. GTH'larda Epidemiyoloji

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

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

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

Koryokarsinomda ırk, yaş, geçirilmiş HM, oral kontraseptifler, gebelik sayısı, östrojen, kan grubu antijenleri gibi risk faktörleri tanımlanmıştır. Koryokarsinomda en önemli risk faktörü geçirilmiş molar gebelik öyküsüdür (25). Koryokarsinom olgularının %29-83'ünün öyküsünde HM olduğu saptanmıştır (26). Olguların önemli bir bölümünün öyküsünde de normal gebelik ya da spontan abortus vardır ve koryokarsinomun %9-42 arasında değişen oranlarda spontan abortuslardan sonra geliştiği saptanmıştır (27). Türkiye'de 6 merkezde 10 yılda 351650 doğum incelenerek yapılan çalışmaya göre tekrar eden mol oranı %1.1 olarak saptanmıştır (23).

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

## **2.2. GTH'larda Genetik Özellikler**

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

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

### **2.3. GTH'larda Patolojik Bulgular ve Etiyopatogenez**

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

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

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

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

PYBGTT'ler sıklıkla uterusu sınırlıdır ve hastalığın ileri evrelerinde metastaz yaparlar. Vakaların büyük çoğunluğunda tümör term gebeliği takiben gelişir. İntermediet yapıda ki trofoblastlardan köken alırlar. Diğer GTH'lara oranla daha az hCG salgırlar ve görece olarak human plasental lactogen (hPL) salınımı artmıştır. Bu tümörler KT'ye

dirençlidirler ve olguların diğer GTH'lardan ayrı olarak rapor edilmesi kabul görmektedir (37; 38; 39) PYBGTT'ler gestasyonel trofoblastik tümörler arasında en nadir olanlarıdır.

HM etiopatogenezinde oksidatif stresin önemli bir role sahip olduğu yapılan klinik çalışmalarla gösterilmiştir (40; 41; 42). Yine buna bağlı olarak trofoblastik hücrelerin proliferasyonunda endotelial nitrik oksid sentaz ekspresyonunun da ciddi öneme sahip olduğu bilinmektedir (43). HM'da serum nitrik oksid seviyesi ve plazma arjinaz seviyesi yüksek bulunmuştur (44; 45). Sonuçta HM'da Oksidatif strese bağlı Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı oluşumu izlenmektedir (46). Bu çalışmalar da göstermektedir ki GTH etiopatogenezinde oksidatif stress önemli bir yere sahiptir.

#### **2.4. GTH'larda Hormonal aktivite**

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

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

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

## 2.5. Tedavide Boşaltım Sonrası Profilaktik Kemoterapi

Hastaların hCG ile izlenebilmeleri nedeniyle profilaktik KT genellikle günümüzde uygulanmamaktadır. Profilaktik KT uygulaması nonmetastatik hastalık olasılığını büyük oranda azaltmakta ve metastatik hastalık riskini ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca lokal invazyon gösteren vakalarda uygulanan ek KT kürünü takiben hastaların tamamında remisyon izlenmiştir. Bu veriler sayesinde, profilaktik KT'nin hem metastazı önlediği, hem de lokal uterin invazyona bağlı insidans ve morbiditeyi düşürdüğü sonucu çıkarılmıştır (58).

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

## 2.6. Boşaltım Sonrası İzlem

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

## 2.7. GTH'larda Sınıflama ve Evrelendirme

Günümüz itibariyle genel kabul gören görüş histolojik kriterlerin prognoz tayininde yetersiz kaldığı şeklinde olmakla birlikte trofoblastik hastalıklarda histolojik kriterlerin prognozu tayin edip edemeyeceği tartışması halen devam etmektedir. Ek olarak her olguda histolojik tanının konulmamış olması tedaviyi histolojik ölçütlere göre planlamayı engellemektedir. Farklı merkezler arasında veriler karşılaştırılırken FIGO ve DSÖ'nün evreleme sistemleri kullanılarak bir standardizasyon sağlanması mümkün olabilecektir (64).

**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, geniÇbağ)</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.

GTH'lar için Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu'nun (FIGO) önerdiği evreleme sisteminde hastalığın anatomik lokalizasyonu esas alınmış, ayrıca iki risk faktörü değerlendirmeye eklenmiştir (Tablo 1) (65).

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

**Tablo 2. DSÖ Histolojik Sınıflama Sistemi**

<b>1. HM</b>
Komplet
Parsiyel
<b>2. Çvaziv HM</b>
<b>3. Koryokarsinom</b>
<b>4. PYBGT</b>
<b>5. Trofoblastik tümör (diğer)</b>
Abartılmış plasental yerleşim bölgesi
Plasental yerleşim bölgesi nodülü veya plağı
<b>6. Sınıflanamayan trofoblastik lezyonlar</b>

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) histolojik sınıflaması Tablo 2'de verilmiştir (66).

**Tablo 3. GTH için DSÖ/FIGO prognostik skorum sistemi**

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



Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından GTN için hazırlanmış olan bir prognostik skorlama sistemide mevcuttur. Bu sınıflandırmada KT'ye karşı muhtemel bir direncin öngörülebilmesi hedeflenmiştir (Tablo 3) (65).

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

## **2.8. Gestasyonel Trofoblastik Neoplazilerde Tedavi**

GTN'ler term gebelik, düşük, HM ya da ektopik gebelik sonrası gelişebilirler. GTN'lerin tedavileri planlanırken en önemli parametre hCG düzeyinin takip edilmesidir.

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

Term gebeliği, Spontan düşüğü ya da elektif gebelik terminasyonunu takiben 3 ile 6 hafta geçmesine karşın hCG düzeyi hala yüksek seyrediyorsa yine koryokarsinom şüphesi söz konusudur. Hastalığın yaygınlığının, mümkünse histopatolojisinin tespit edilebilmesi için tam bir değerlendirme yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu değerlendirme kapsamında fizik muayene yapılması, karaciğer, böbrek, tiroid fonksiyonlarının ve kan

tablosunun tespit edilmesi gerekir. Uterin trofoblastik hastalığın mevcudiyeti pelvik muayene, pelvik ultrason, küretaj ve pelvik Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ile ortaya konulmalıdır. Metastaz alanlarıysa akciğer grafisi, karaciğer fonksiyon testleri, karaciğer sintigrafisi, batin ultrasonografisi, beyin BT, beyin omurilik sıvısında hCG tayini ve bazı olgularda abdominal ve pelvik organların selektif anjiografisi ile ortaya konabilir. Yapılan son çalışmalarda BT'nin, karaciğer ve akciğer metastazlarının erken tanısında önemli bir yeri olduğu ortaya konulmuştur (33; 63).

FIGO'ya göre Evre I ve düşük riskli Evre II-III olgularında ve DSÖ skorlama sistemine göre düşük risk grubuna tedavi; tek ajan KT, KT ile birlikte histerektomi ve bazı seçilmiş vakalarda KT'nin intraarterial infüzyon yolla verilmesi olarak üç grupta toplanabilir.

Bu tedavilerden ilki ve mutlaka uygulanması gerekeni KT'dir. Bir diğer tedavi şekli KT'ye ek olarak histerektomi yapılmasıdır. Çocuk isteği olmayan hastalarda histerektomi uygulandığında hastalık sadece uterusu sınırlıysa %100 remisyon sağlanmaktadır. KT ve histerektominin birlikte uygulanması aynı zamanda hastanede kalış süresini kısaltmakta ve verilen KT kür sayısını da düşürmektedir. KT'ye cevap vermeyen olgularda uterus dışında ki hastalık kontrol altına alınmışsa yine histerektomi uygulanabilir. Bu tür uygulamaya geç histerektomi uygulaması adı verilmektedir. Gerek KT ile birlikte gerekse geç dönemde yapılan histerektomi KT baskısı altında yapılmaktadır. Bu uygulama sayesinde herhangi bir morbidite artışına neden olmaksızın tümör embolizasyonu önlenmektedir (57; 67; 68; 69).

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

GTN'lerde tedavi planlaması ölçülen hCG düzeylerine göre yapılır. Remisyon tanısı, hCG düzeyi normal değerlere düştüğünde birer hafta aralarla bakılan dört hCG

düzeıı normal sınırlarda bulunmasıyla konur. Bu tanı konulduktan sonra 1 veya 2 kür daha ilave KT uygulanır. Remisyon sağlanmasını takiben ise 12 ay süre ile ayda bir hCG düzeyine bakılır. Yine bir yıllık takip döneminde üçer aylık aralarla fizik muayene ve pelvik muayene yapılır, akciğer grafisi çekilir ve hematopoetik değerler kontrol edilir. KT uygulanmasını takiben remisyon sağlanan olgularda bir yıl süreyle etkin kontrasepsiyon sağlanması gereklidir. Bu amaçla oral kontraseptiflerin kullanılması önerilir (71; 72).

### **2.8.1. Kemoterapi ve Radyoterapi**

Günümüzde uygulanan KT, tek ajan ile ya da kombine tedavi olarak iki grupta toplanmaktadır. Tek ajan kemoterapisinde yaygın kullanım alanı bulan iki ilaç metotraksat ve aktinomisin D'dir. Bu iki ajanın tedavi etkinliği birbirine yakın bulunmuştur. Tek ajan KT'si ile hem metastatik olmayan hem de düşük riskli metastatik GTH'da %100'e yaklaşan oranlarda remisyon elde edilmektedir. Tekli ajan seçiminde farklı protokoller mevcuttur (73; 74; 75).

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

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

Kemoterapiye direnç etkileyen nedenler (86):

- Metastatik hastalık olması durumunda
- Önceki gebelikte molar gebelik öyküsünün olması
- Patolojik olarak Koryokarsinom tanısı alması
- Artan yaş
- Yüksek ölçülen hCG seviyelerinin varlığı
- Yüksek FIGO skoru

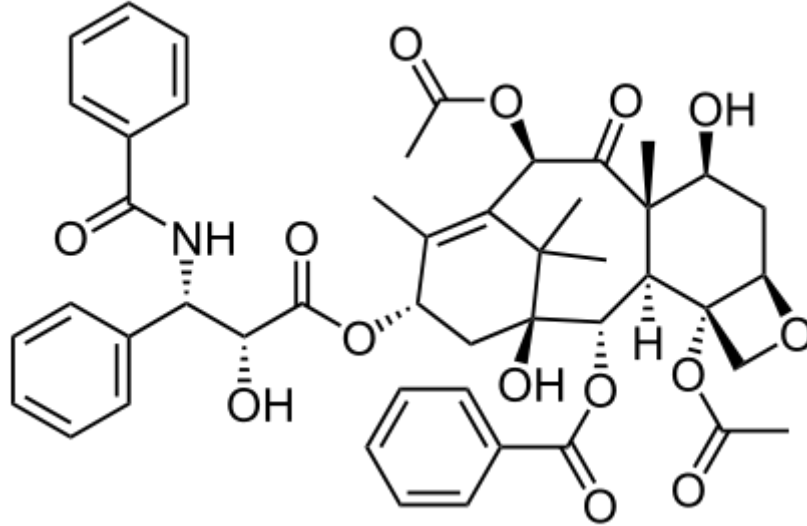
Kombine KT rejimleri uygulanmasına bağlı olarak nöropati, myelosupresyon, enfeksiyon, bulantı, kusma, karaciğer, böbrek disfonksiyonu, alopesi, mukozit, lösemi, meme, kolon gibi ikincil kanser gelişim riskleri, overlerde meydana gelebilecek disfonksiyon durumları tek ajan tedavilerine göre daha da artar (87).

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

## 2.9. Tedavi Sonrası

Molar gebeliği takiben sonraki gebeliklerinde bu hastalığın tekrarlama riski %1'dir (91) Hastalar HM'u takiben tekrardan fertilitelerine kavuşabilirler, bu hastalarda infertilite riskinin artmadığı tespit edilmiştir (92; 93). KT sonrası kür sağlanmış GTN'li hastalarda normal fertilitelerine kavuşabilirler (92; 93). Kullanılan kemoterapötik ilaçların teratojenik ve mutajenik etkileri olmasına karşın majör ve minör malformasyonların oranı %2.5 ile normal sınırlarda tespit edilmiştir (94; 95).

## 2.10. Paklitaksel



Şekil 1. Paklitaksel 'in formülü

Paklitaksel, yeni doğal antikanser bileşikler bulmak üzere NCI tarafından değişik birçok bitkinin tarandığı bir program kapsamında, ABD'de yetişen *Taxus brevifolia*'nın kabuğundan 1971 yılında izole edilmiştir (96).

Paklitaksel tubulini hedef alan birkaç sitoskeletal ilaçtan birisidir. Paklitaksel antitümör etkisini, hücrede mikrotubullerin toplanmasını arttırmak ve depolimerizasyonunu önleyerek stabil mikrotubul toplulukları oluşturmak suretiyle göstermektedir (97; 98). Sonuçta paklitakselin etki ettiği hücrelerde mitotik iğiplikçiklerinin oluşması, kromozom ayrışması ve hücre bölünmesi engellenmektedir. Sitoskeletal yapıyı etkileyen ve mikrotübüllerin birleşmesini engelleyen kolşisin gibi

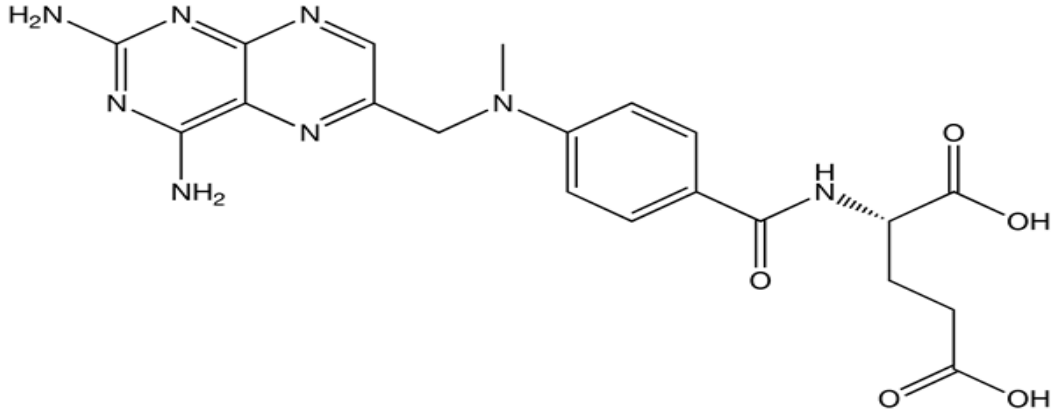
ilaçların aksine paklitaksel mikrotübül polimerlerini stabilize eder ve onları ayrışmadan korur. Bunun sonucunda kromozomlar metafazda iğ iplikçiklerini oluşturamazlar veya oluşan iğ iplikçikleri sentromerlerden ayrılamazlar . Bu noktada hücre apoptoza veya bölünme öncesi G fazına dönerek mitozu sonlandırır.

Faz I deneylerinde kemik iliği baskılanması ve nötropeni doz sınırlayıcı olarak belirlenmiştir. Kas, eklem ağrısı ve nöropati ise daha kısa süre uygulanan infüzyonlarda doza bağımlı olarak ortaya çıkmıştır. Mukozitis ise uzun uygulamalarda daha sık ve daha şiddetli olarak ortaya çıkmıştır. Bu bulgular ışığında faz II çalışmaları ile ilacın uygun premedikasyondan sonra 135-250 mg/m<sup>2</sup> dozda 24 saatlik infüzyon veya üç saatlik infüzyon halinde verilmesi ve her iki tedavi formunun da üç haftada bir tekrarlanması şeklinde planlanması uygun görülmüştür (99; 100; 101).

Atılımı karaciğer ve safra yoluyla olmaktadır. Karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi ile metabolize olmaktadır. Metabolitleri esas bileşiklerine göre inaktif veya daha az sitotoksik özelliktedir. Karaciğeri bozuk olan hastalarda değişen metabolizma ve atılımına bağılı olarak toksisite olasılığı artmaktadır (102; 103).

İlaç değişik kanser tiplerinde (meme, akciğer, ovaryum ve diğer kanserler) denenmiş ve belirgin aktivitesinin bulunduğu tespit edilmiştir. Daha sonra diğer antikanser maddelerle beraber tedavide uygulanmaya başlanmıştır (99). üroteliyal karsinomalar, germ hücreli tümörler (özellikle testis kanseri) ve endometriyal kanserlerde çok kuvvetli antitümör aktivite göstermiştir. Önceden tedavi edilmemiş tekrarlayan üroteliyal kanserlerde (başlıca mesane) % 46 ve % 56 oranında cevap vermiştir (100; 104). Ayrıca paklitaksel non-Hodgkin lenfomalı hastalarda da denenmiş ve % 17 ile % 23 oranında değişen cevap alınmıştır (99).

## 2.11. MTX



### Şekil 2. MTX'in kimyasal yapısı

Metotreksat gestasyonel trofoblastik hastalıkların tek ajanla tedavisinde en sık kullanılan ilaç olup aynı zamanda kombinasyon kemoterapilerinde de yer alan bir ajandır. MTX bir folik asit antagonistidir, kimyasal olarak folik asidin 4- amino-N<sub>10</sub>-metil analogudur (105). Metotreksat maksimal sitotoksik etkisini hücre siklusunun S fazında gösterir. MTX dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzim inhibisyonu yapar (106). Bu enzimin inhibisyonu, 5-10 metilen tetrahidrofolik asit ve N-10 formil tetrahidrofolik asit gibi tetrahidrofolat kofaktörlerinin kısmi azalmasıyla sonuçlanır (107). Bu ko-faktörler, timidilat ve pürin nükleotidleriyle serin ve metionin gibi aminoasitlerin sentezi için gereklidir. Sonuçta DNA, Ribonükleik asit (RNA) ve protein yapımı bozulur.

Antifolat tedavi, ilk olarak 1948 yılında aminopterinlerin tedavide yer almalarından bu zamana, çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde etkin olarak kullanılmaktadır. Aminopterinle oranla toksisitesi daha belirlenebilir olan MTX, 1960' tan sonra çocukluk çağı Akut lenfoblastik lösemi ve non-Hodgkin lenfoma tedavisinde kullanılmıştır (108). MTX ayrıca Burkitt ve diğer non-Hodgkin lenfomaların kombinasyon tedavisinde, göğüs, baş- boyun, over ve mesane kanserinde kullanılan bir ajandır. Toksisitesini sınırlayabilmek amacıyla lökoverin ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX, osteosarkomlarda adjuvan tedavide rutin olarak kullanılan protokolde de yer almaktadır (109). Düşük doz MTX tedavisinin koryokarsinomada ya da ilişkili trofoblastik tümörlerde, mitokondriyal membran

potansiyelinde azalma yaparak, kaspaz-9 enzimini aktive ederek, Bax/Bcl-2 gen ekspresyonunda yukarı regülasyon yaparak hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (110).

Antineoplastik özelliğini folat metabolizmasını antagonize ederek gösteren MTX, kanser hücreleri ile birlikte hızlı bölünen hücrelerde de nükleik asitlerin yapımını engeller (111). Buna bağlı olarak, antifolat tedavinin primer toksisitesi ve yaygın etkileri, kemik iliği, cilt ve intestinal epitelyum hücreleri üzerinedir. Sonuçta alopesi, dermatit, interstisyel pnömoni, nefrotoksisite, hepatotoksisite, oogenez/spermatogenezde defektler, abort ve teratojenite gibi yan etkiler de izlenebilir (112). İntestinal epitel hücreleri de, hızlı çoğalan hücreler olduğundan MTX ile kolaylıkla inhibe olurlar. MTX, sıklıkla oral ve intestinal mukozada inflamasyona neden olur. Bu hasara, hücre çoğalmasının inhibe olmasının sonucu olarak ortaya çıkan intestinal bariyer fonksiyonlarında azalma ve ksenobiyotik ve endotoksinlerin invazyonu eşlik eder. Dolayısıyla makrofaj ve nötrofiller gibi fagositer hücreler, inflamasyon alanına infiltre olur ve reaktif oksijen radikalleri üretilir (111). Normal hücreler üzerindeki bu toksik etkileri önlemek için, MTX ile birlikte başka bir folat analogu olan 5-formil-tetrahidrofolat kullanımı yaygın olarak uygulanan bir protokoldür (113). MTX kullanımına bağlı oluşan yan etkiler sıklıkla iki hafta içinde geri döner, ancak eğer hastada renal fonksiyonu bozulmuş ise, ilaç atılımındaki azalmaya bağlı olarak myelosupresyon uzayabilir. Yüksek doz MTX uygulaması, 1000 mg/m<sup>2</sup> ve üzerinde MTX'in lökoverin eklenerek verilmesi olarak tanımlanır. Lökoverin eklenerek verilen yüksek doz MTX, hastaların çoğu tarafından iyi tolere ediliyor olsada, MTX ve metabolitlerinin renal tübüllerde toplanması sonucu hayatı tehdit edebilecek düzeyde nefrotoksisite gelişebilir. Asidik idrarda presipite olan MTX, obstrüktif üropati nedeniyle oligo-anürik böbrek hasarı oluşturabilir. 1970'li yıllarda ilaca bağlı morbidite ve mortalitenin primer nedeni yüksek doz MTX'a bağlı gelişen nefrotoksisiteydi (114).

## **2.12. Hücre Kültürü**

Hücre kültürü, hücrelerin laboratuarda kontrol altında tutulan koşullarda üretilmesi sürecidir. Hücre kültürü tanımı daha ziyade ökaryot hayvan hücrelerinden elde edilen



hücrelerin kültürleri için kullanılmaktadır. Hücre kültürleriyle yapılan araştırmalar günümüzde oldukça popüler çalışmalardır. Hücre kültüründe, hücrelerin gelişmesi ve büyümesi için gerekli teknikler 20. yüzyıl boyunca geliştirilmiştir. 1885'te bir tavuk embriyosunun nöral plağının bir kısmını ayıran ve ılık bir tuzlu su çözeltisinde dokuyu birkaç gün yaşatan Wilhelm Roux doku kültürünün temellerini de atan kişidir (115). 1952'de George Gey ve arkadaşları tarafından ilk insan kanser hücre hattı olan HeLa'nın ekilmesinin ardından binlerce yeni kanser hücre kültürü geliştirilmiştir (106).

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

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

## **2.12.1 Baçca Hücre Kültür Tipleri**

### **2.12.1.1 Primer Kültürler**

Primer hücre kültürleri, ait oldukları orijinal dokudan alınarak kültür şartlarına konulan hücreleri içerir. Bu hücreler, genotipik ve fenotipik yönden orijinal doku hücresi ile aynı özelliklerle içerir ve dokunun fizyolojik durumunun ifadesidir. Doğrudan dokudan elde edilir ve ayrı bir ortamda ek hücre süspansiyonunda ayrışana kadar enzimatik prosedüre tabi tutulurlar. Bu tarz kültürler heterojen yapıdadırlar ve fibroblastlar tarafından etkinleştirilirler. Bu kültürlerin elde edilmesi ciddi bir çaba gerektirir ve in vitro koşullarda saklanma süreleri oldukça kısıtlıdır. İn vitro ortamda ki bu hücreler, in vivo

ortamda ki hücrelerden farklı karakteristikler göstermektedir. Primer hücre kültürleri, orijinal fizyolojik durumun ifadesi olmaları nedeniyle pek çok çalışmada örnek sistem oluşturmaktadırlar ancak hassas hücreler olmaları ve üretim aşamasında ki zorluklar, hücre kültürlerinin kontrolünü son derece zor hale getirmekte ve çalışma esnasında problemlere yol açmaktadır (118).

### **2.12.1.2 Sürekli Kültürler**

Sürekli kültürler, bir seri hücrenin hedef kültüre dönüştürülmesiyle ya da kısıtlı bölünme sayısına izin verilmiş, tek hücre tipinden oluşmaktadır. Kısmen farklılaşmayı da barındırabilen, kısıtlı bir ömüre sahip diploid hücrelerdir. Eğer 30 ya da daha fazla bölünme tekrarı olacaksa, bu tip hücre toplulukları farklı ve uzun süre saklanma yöntemlerini içeren bir sistem ile saklanmalıdır (119).

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

### **2.13. Sitotoksosite**

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

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

Hücre kültürleriyle yapılan sitotoksisite çalışmalarında ilaç içerisindeki etken maddelerin ne kadarının hangi koşullarda hücre içerisine alınacağını ve de hücre ortamında yapacakları etkileşim ve hareketlerin taraması yapılabilmektedir. Etken maddenin hedef proteine bağlanmasını sağlayan veya engellenen mekanizmaları tespit edilebilmesi bu doğrultuda diğer seçeneklerle çalışmaya imkan verilebilmektedir. Hücre kültürünün yüksek duyarlılık gösterdiği bir sitotoksik ajanın ortaya çıkarabileceği zararlar bu çalışmalar sayesinde önceden tespit edilebilmektedir (122).

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

## **2.14. Apoptoz**

1972'de J.F.K.Kerr nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için Apoptoz terimini kullanmıştır (124; 125). Hücrenin intiharı olarak da adlandırılan apoptoz, hücrenin maruz kaldığı çeşitli travmalara bağlı ya da genetik birtakım faktörlerle aktive edilen ve yine hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma yoluyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlemler dizisi olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve KT'yi içeren travmatik ajanların etkisiyle gerçekleşen hücre hasarları ya da genetik faktörlerin etkisiyle aktive edilen hücre imha sürecinin apoptoza yol açtığı söylenebilir (125).

Apoptoz sinyali bir hücreye ulaştıktan sonra o hücrenin kromatinini ve sitoplazmasını yoğunlaşmaya başlar, hücre küçülür. Daha sonra hücre apoptotik cisimcik adı verilen küçük parçacıklara bölünür. Apoptotik cisimciklerin yüzeyinde sinyal veren

yapılar ortaya çıkar ve bu reseptörlere bağlanan histiyositler tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılırlar (124).

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

Kantitatif bir apoptoz belirleme yöntemi olan Flowsitometri (FCM) İlk kez 1960 yılında patolog Herbert Derman ve bilgisayar uzmanı olan John Hoffer tarafından sitoflorografi cihazı olarak tasarlandı. Geliştirilmesinde Caspersson ve arkadaşlarının esaslarını belirlediği hücre nükleusunun floresan boyanma ilkeleri temel alındı (126). Kamenstsky 1963 yılında sistemi modifiye etti ve hareketsiz hücrelerin analizi yerine hareketli ortamda hücre analizi yapabilmeyi mümkün kılarak FCM'yi icat etmiş oldu (127; 128). FCM'nin avantajı lam üzerinde ki hücrelerin optik özelliklerini tarayan sitofotometri ve imaj sitometrinin tersine, çok hızlı ve birden fazla değişkenin analizini yapma olanağı vermesidir. Bu sayede yaklaşık 100 kat kadar fazla sayıda hücrenin incelenmesi de FCM ile mümkün olabilmektedir. FCM'nin temel çalışma prensibi floresansı ölçüp kaydetme esasına dayanır. Florokomla boyandıktan sonra eksitasyon kaynağına doğru hareket eden hücrelerin floresans dereceleri ölçülür ve elektronik uyarıma dönüştürülür. Eksitasyon kaynağı genellikle 450-514 nm dalga boyunda monokrom ışık veren Xenon-civa ya da argon laserdir. Bu ışık sayesinde hücresel elemanların floresan boyalarını maksimum emebilmeleri sağlanır. İnceleme genelde saniyede 100-200 hücre hızıyla yapılır. Floresan ölçümler sonucu elde edilen veriler sanal ortamda saklanabilirler. Floresans yöntem sayesinde hücrelerin büyüklükleri de ölçülebilir (129; 130).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ile 2.0 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 500 ml) (Sigma), FCS ısı ile inaktif 100ml (Biochrom), L-Glutamine (200 mM) 100 ml (Biochrom), Penisilin-streptomisin karışım 100 ml (Biochrom), Tripsin-EDTA karışımı 100ml (Sigma), DMSO 50 ml (Sigma), MTX (Sigma), Paclitaxel (Sigma).

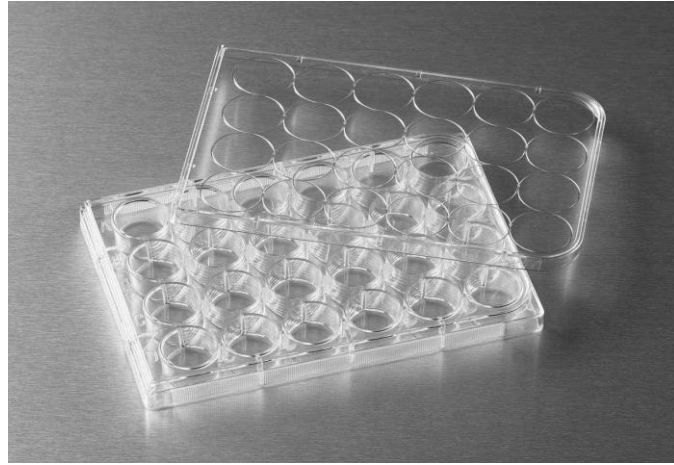
#### 3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

24 kuyucuklu hücre kültür plağı 20 adet (Costar), 12 kuyucuklu hücre kültür plağı 20 adet (Costar), Apoptoz kiti (200 test) (Trevigen). 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, ependorf tüp.



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



ğekil 4. 24 kuyucuklu hücre kültür plağı



ğekil 5. 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).

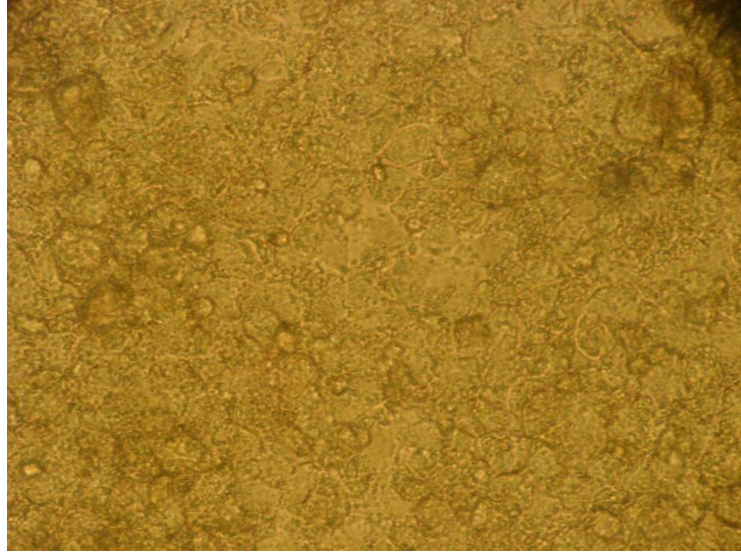


Şekil 6. Nüve CO<sup>2</sup> inkübatörü

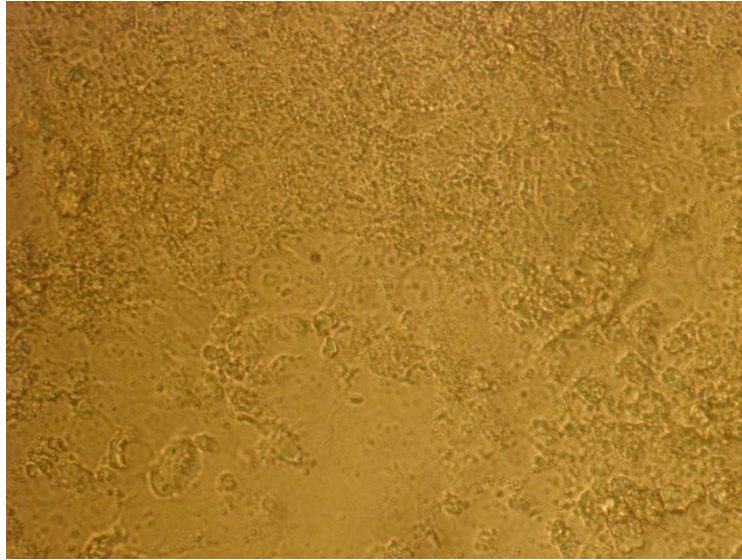
### 3.4. JAR ve JEG-3 Hücre Kültürleri

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 (rapid per minute)'de gerçekleştirilmiştir. Hücreler Neubauer lamında sayılıp, kuyucuk başına

$1 \times 10^5$  hücre düşecek şekilde 12 ve 24 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. 2 gün inkübasyondan sonra besi ortamı tazelenerek ilaç dozları hücrelerin üzerine eklenmiştir.



**Şekil 7. JAR hücre kültürü mikroskopik görünümü**



**Şekil 8. JEG-3 hücre kültürü mikroskopik görünümü**



### **3.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması**

#### **3.5.1. Paclitaxel dozunun hazırlanması**

Paclitaxel, Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ng/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. MTX dozunun hazırlanması**

MTX (Sigma), DMSO içerisinde çözülerek 2, 4 ve 8 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 flasklarda, 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 ve h-HCG ölçümü**

MTX belirlenen dozları hazırlanmıştır, çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde ve son konsantrasyonları; 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, olması sağlanarak hazırlanmıştır.

Paclitaxel, Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ng/ml'lik dozlar halinde hazırlanmıştır. En yüksek konsantrasyonda DMSO oranı %1'den çok daha az olacak şekilde RPMI 1640 ile dilüsyon yapılmıştır.

Paklitaksel ve MTX kombinasyonunda; Paklitaksel'in 10, 50, 100, 200, 400, 800, 1600 ng/ml'lik dozları ile MTX'in 4 µg/ml'lik dozu kullanılmıştır. Maddeler hücelere aynı anda verilmiştir.

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

### **3.6.3. Annexin V yöntemi ile apopitoz tespiti ve istatistiksel analiz**

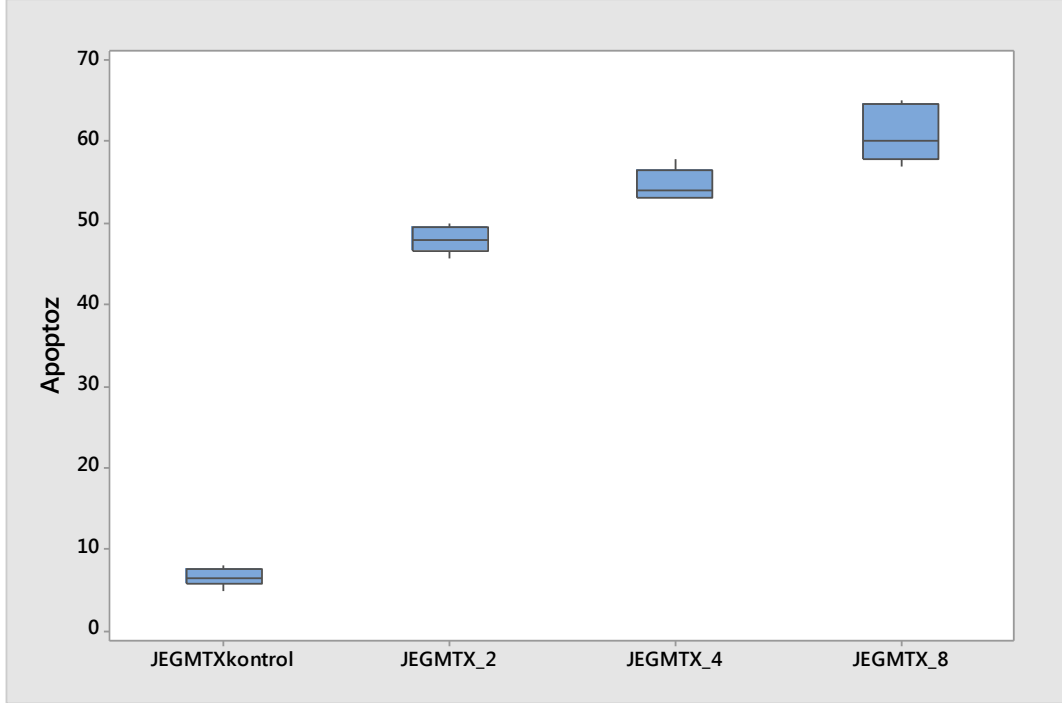
Fosfatidilserin (PS) hücre membranının iç kısmına asimetrik olarak yayılmış halde bulunmaktadır. Normalde hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan PS bulunmaktadır. Hücre apopitoza gidecek olursa normalde iç kısımda yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne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

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

Hücrelerin, deney setlerinde her test maddesi dozu için ekildiği deneyler, birbirinden bağımsız olarak 6 kez tekrarlanmıştır. Apoptoz sonuçlarının istatistiksel analizleri SPSS 19.0 paket programında yapılmıştır. Çalışmada yer alan sürekli değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler medyan, minimum ve maksimum değerleriyle verilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Dozlar arası 2'li karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi ve Bonferonni düzeltmeli Mann Whitney U testleri kullanılmıştır. Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde p değeri 0,05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

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



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

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

	Median (Min-Max)
JEGMTXkontrol	6,7 (5-8)
JEGMTX_2	48 (45,7-50)
JEGMTX_4	54,1 (52,9-58)
JEGMTX_8	60 (57-65)

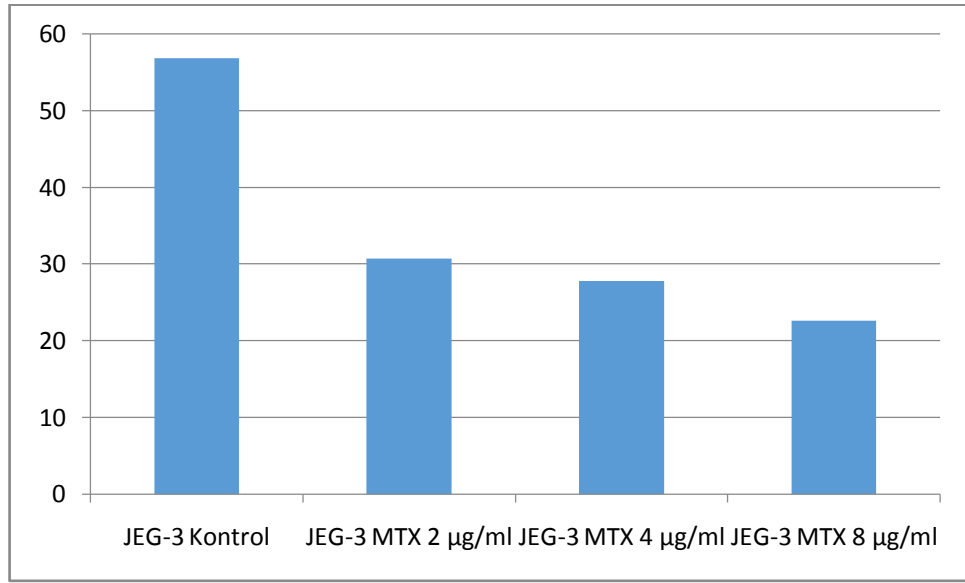
24 saat muamele sonunda MTX'in 2 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %48'dir. 4 µg/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %54,1, 8 µg/ml'lik muamelesi sonucu ise %60'dır. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır.

Anlamlılık değeri  $p < 0,05$  alındığında;

Mtx2 ile Mtx4 arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p=0,002$ ).

Mtx2 ile Mtx 8 arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p=0,002$ ).

Mtx4 ile Mtx 8 arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p=0,002$ ).



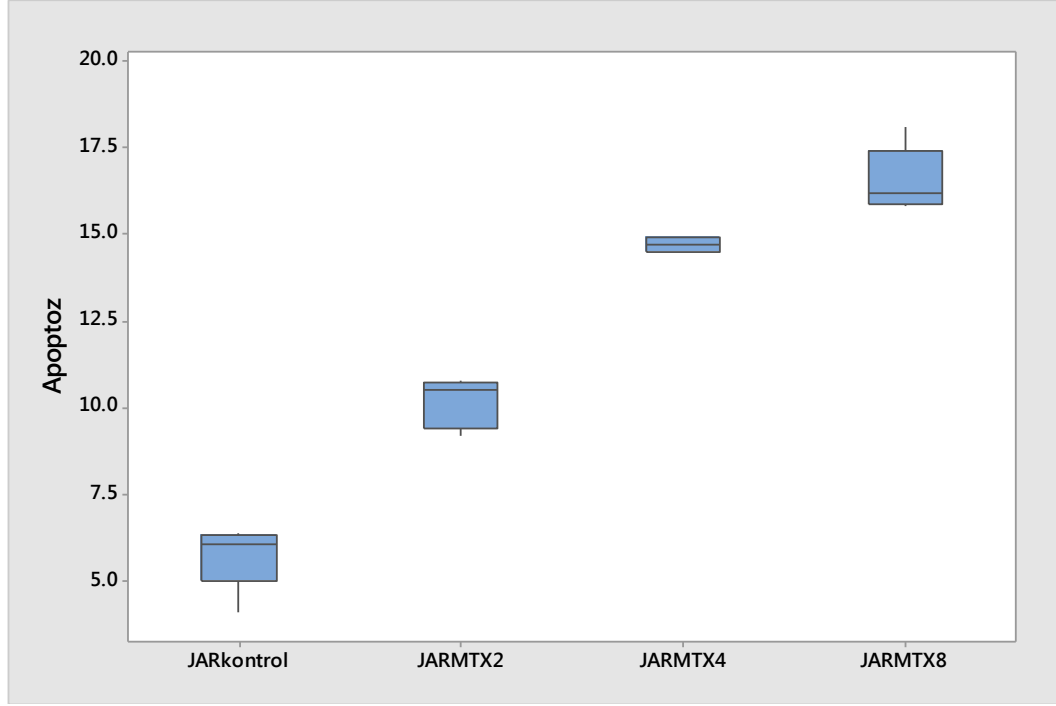
Şekil 10. MTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri

Tablo 5. MTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri

	h-hCG
JEG-3 Kontrol	56,8
JEG-3 MTX 2 µg/ml	30,7
JEG-3 MTX 4 µg/ml	27,8
JEG-3 MTX 8 µg/ml	22,6

h-hCG düzeylerinde MTX'in dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

#### 4.2. MTX'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri



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

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

	Median (Min-Max)
JARMTXkontrol	6 (4,1-6,4)
JARMTX_2	10,5 (9,2-10,8)
JARMTX_4	14,7 (14,5-14,9)
JARMTX_8	16,2 (15,8-18,1)

24 saat muamele sonunda MTX'in 2 µg/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %10,5'dir. 4 µg/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %14,7, 8 µg/ml'lik muamelesi sonucu ise %16,2'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır.

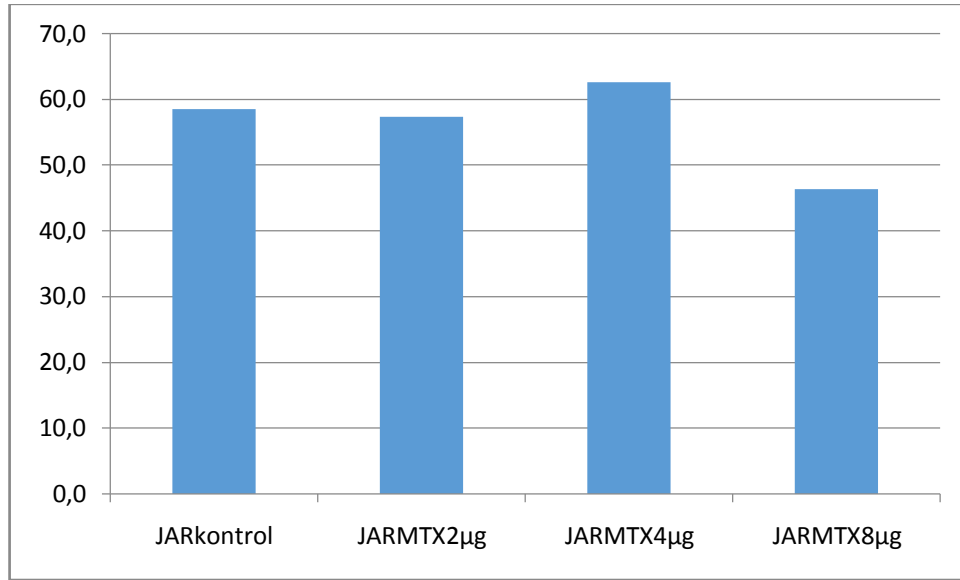
Anlamlılık değeri  $p < 0,05$  alındığında;

Mtx2 ile Mtx4 arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p=0,002$ ).

Mtx2 ile Mtx 8 arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p=0,002$ ).

Mtx4 ile Mtx 8 arasında apoptotik etki açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık var ( $p=0,002$ ).

### Şekil 12. MTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri



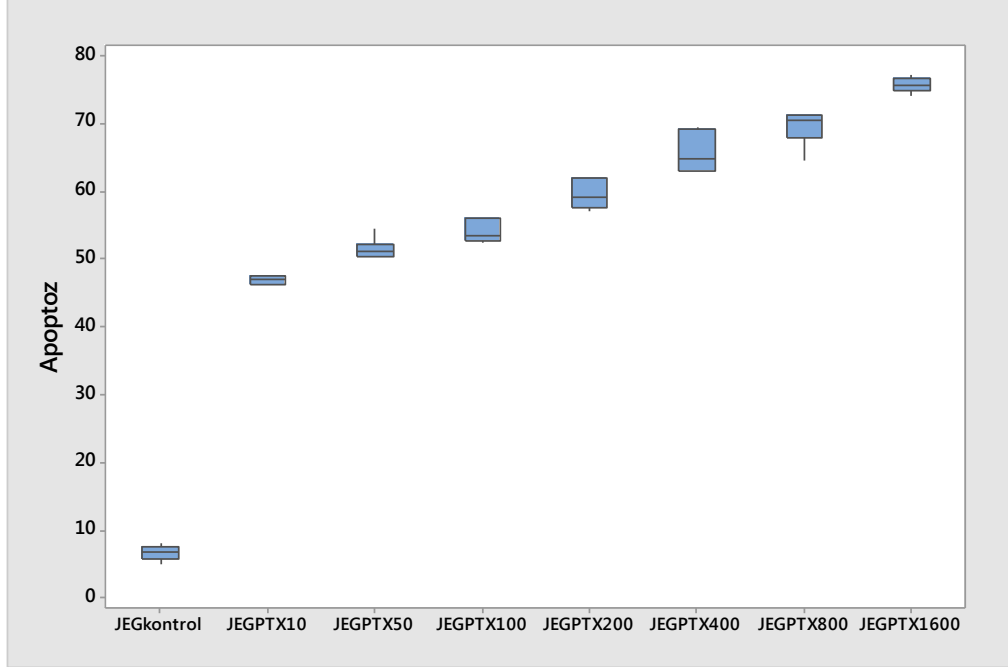
**Tablo 7. MTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri**

	h-hCG
JAR Kontrol	58.5
JARMTX 2 µg/ml	57.4
JAR MTX 4 µg/ml	62.6
JAR MTX 8 µg/ml	46.4

h-hCG düzeylerinde de MTX'in dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

### 4.3. PTX'in JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri

Şekil 13. PTX'in JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi



Tablo 8. PTX'in artan dozlarda JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı

	Median (Min-Max)
JEGPTXkontrol	6,7 (5-8)
JEGPTX_10	46,9 (46,1-47,4)
JEGPTX_50	51 (50,2-54,5)
JEGPTX_100	53,4 (52,4-56,1)
JEGPTX_200	59 (57-62,2)
JEGPTX_400	64,8 (62,9-69,4)
JEGPTX_800	70,4 (64,6-71,4)
JEGPTX_1600	75,6 (74-77,2)

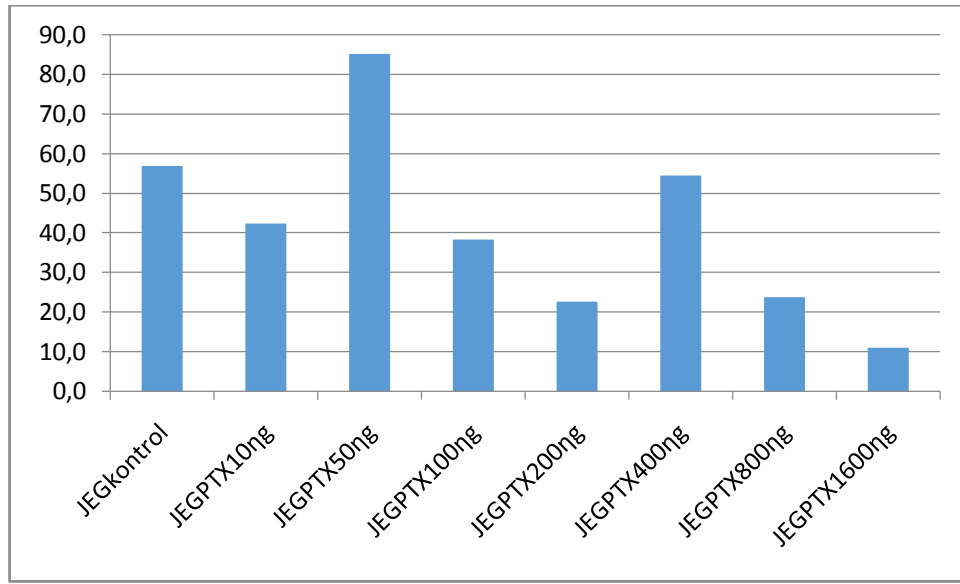
24 saat muamele sonunda PTX'in 10ng/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %46,9'dir. 50ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %51, 100ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %53,4, 200ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %59, 400ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %64,8,



800ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %70,4, 1600ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %75,6'dır. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır.

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

JEG-3	PTX10/ Kontrol	PTX10/ PTX50	PTX50/ PTX100	PTX100/ PTX200	PTX200/ PTX400	PTX400/ PTX800	PTX800/ PTX1600
p	,002	,002	,026	,002	,002	,026	,002



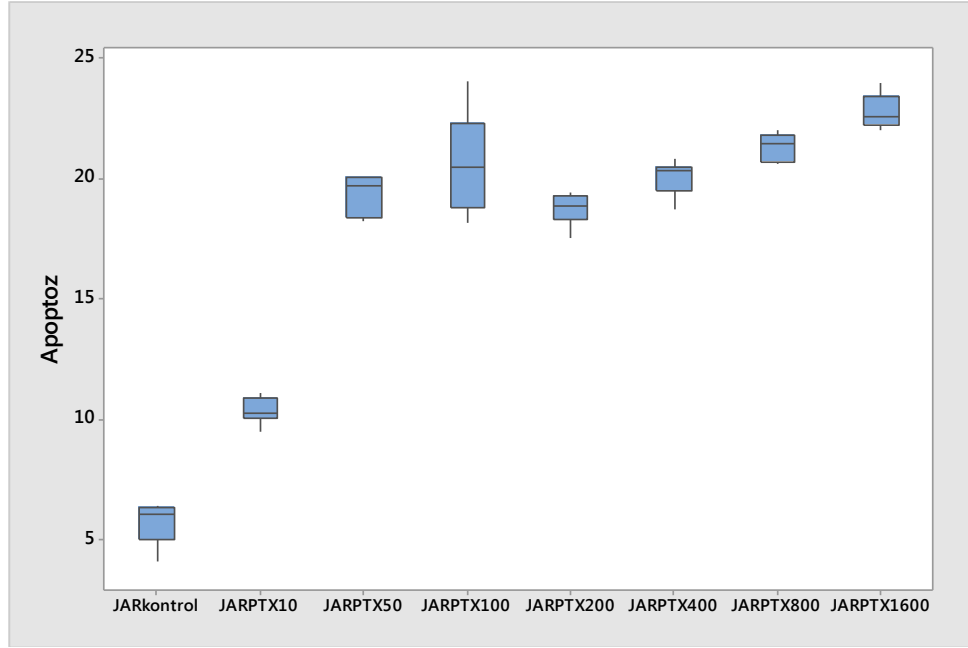
**Şekil 14. PTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri**

**Tablo 10. PTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri**

	h-hCG
JEGkontrol	56,8
JEGPTX10ng/ml	42,3
JEGPTX50ng/ml	85,2
JEGPTX100ng/ml	38,2
JEGPTX200ng/ml	22,6
JEGPTX400ng/ml	54,5
JEGPTX800ng/ml	23,7
JEGPTX1600ng/ml	11,0

h-hCG düzeylerinde de PTX'in dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

#### 4.4. PTX'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri



Şekil 15. PTX'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 11. PTX'in artan dozlarda JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı

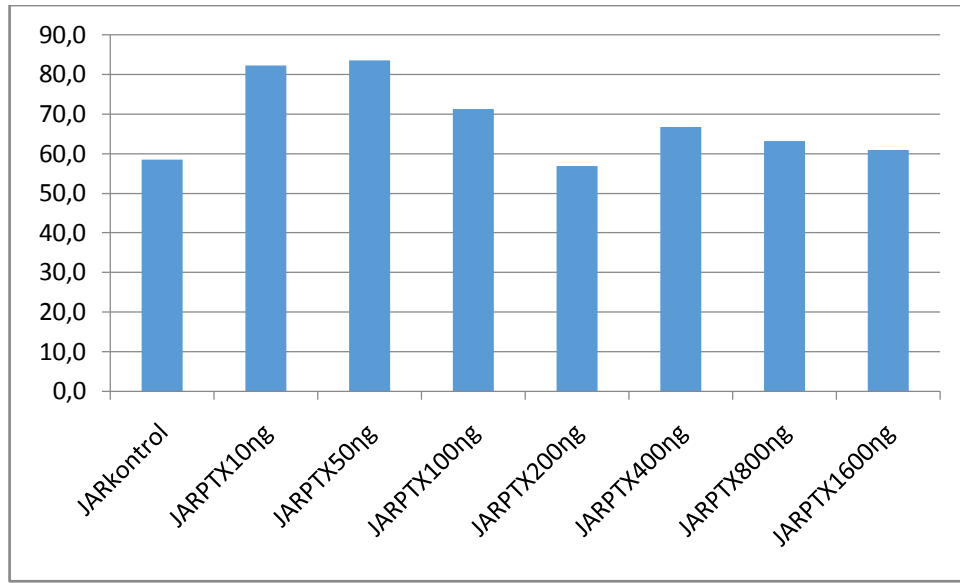
	Median (Min-Max)
JARPTXkontrol	6 (4,1-6,4)
JARPTX_10	10,2 (9,5-11,1)
JARPTX_50	19,7 (18,2-20)
JARPTX_100	20,4 (18,1-24)
JARPTX_200	18,8 (17,5-19,4)
JARPTX_400	20,3 (18,7-20,8)
JARPTX_800	21,4 (20,6-22)
JARPTX_1600	22,5 (22-23,9)

24 saat muamele sonunda PTX'in 10ng/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %10,2'dir. 50ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %19,7, 100ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %20,4, 200ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %18,8, 400ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %20,3,

800ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %21,4, 1600ng/ml'lik muamele sonucu apoptoz oranı %22,5'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır.

**Tablo 12. PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$**

JAR	PTX10/ Kontrol	PTX10/ PTX50	PTX50/ PTX100	PTX100/ PTX200	PTX200/ PTX400	PTX400/ PTX800	PTX800/ PTX1600
p	,002	,002	,394	,093	,026	,009	,002



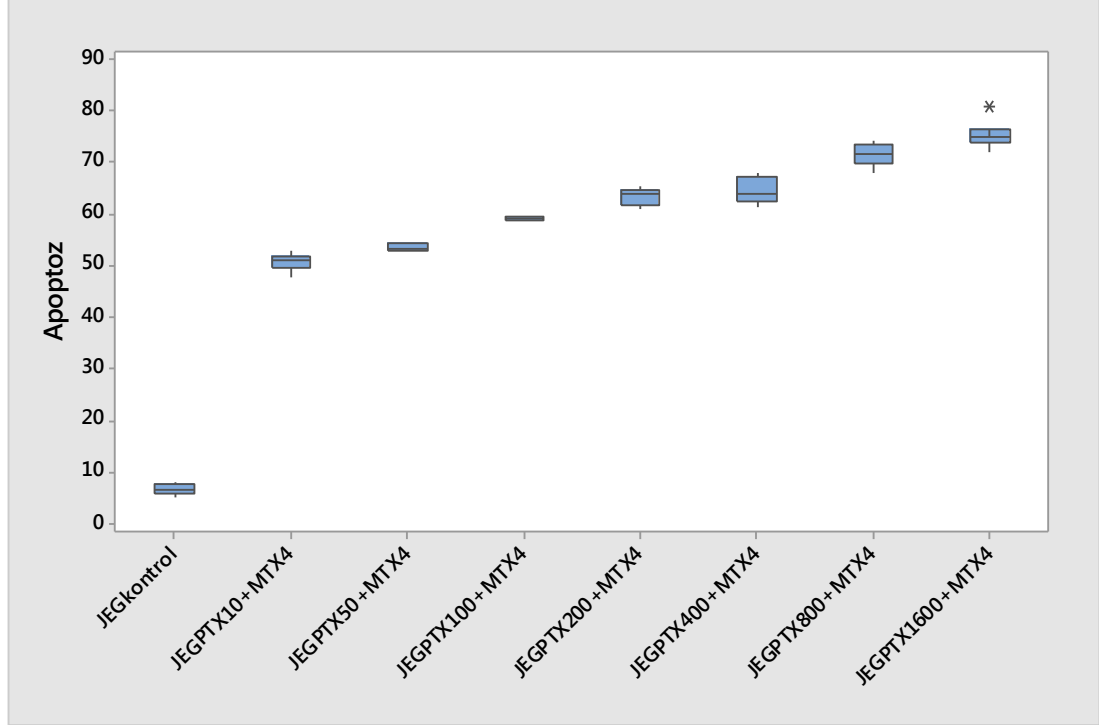
**Şekil 16. PTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri**

**Tablo 13. PTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri**

	h-hCG
JARkontrol	58,5
JARPTX10ng/ml	82,3
JARPTX50ng/ml	83,5
JARPTX100ng/ml	71,3
JARPTX200ng/ml	56,8
JARPTX400ng/ml	66,7
JARPTX800ng/ml	63,2
JARPTX1600ng/ml	60,9

h-hCG düzeylerinde PTX'in dozu ile orantılı bir değişiklik izlenmemiştir.

#### 4.5. MTX ile Birlikte Kullanılan PTX'in JEG-3 Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri



Şekil 17. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 14. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JEG-3 hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı

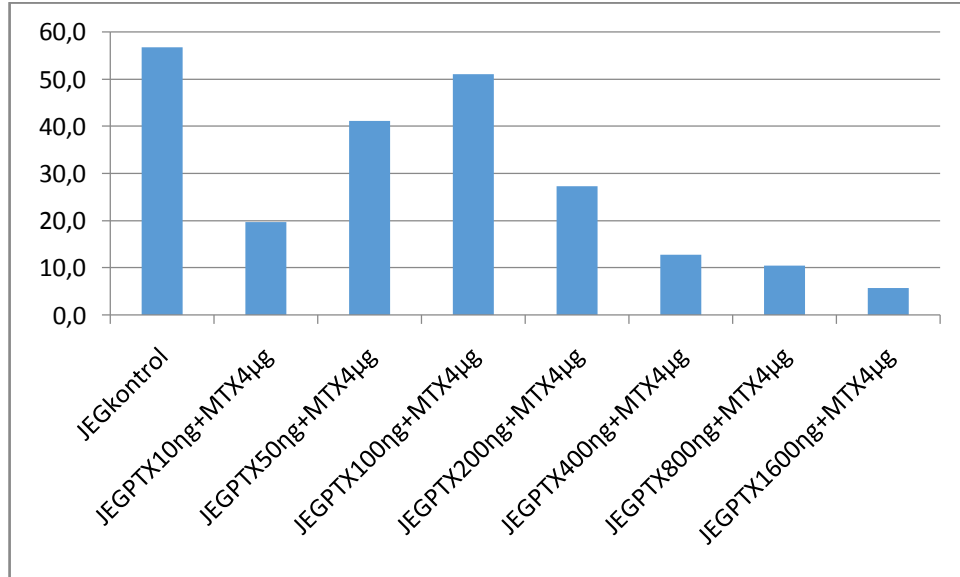
	Median (Min-Max)
JEGPTX+MTXkontrol	6,7 (5-8)
JEGPTX_10+MTX_4	51,2 (47,9-52,8)
JEGPTX_50+MTX_4	53,3 (52,5-54,4)
JEGPTX_100+MTX_4	59 (58,8-59,6)
JEGPTX_200+MTX_4	64,1 (61-65,3)
JEGPTX_400+MTX-4	63,9 (61,5-68)
JEGPTX_800+MTX_4	71,7 (68-74,2)
JEGPTX_1600+MTX_4	75 (72-81)

24 saat muamele sonunda 4µg/ml MTX ile birlikte kullanılan PTX'in 10ng/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %51,2'dir.

50ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apopitoz oranı %53,3, 100ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apopitoz oranı %59, 200ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apopitoz oranı %64,1, 400ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apopitoz oranı %63,9, 800ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apopitoz oranı %71,7, 1600ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apopitoz oranı %75'dir. İstatistiksel olarak apopitoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır.

**Tablo 15. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$**

JEG-3	PTX10 +MTX4 Kontrol	PTX10+MTX4/ PTX50+MTX4	PTX50 +MTX4/ PTX100 +MTX4	PTX100 +MTX4/ PTX200 +MTX4	PTX200 +MTX4/ PTX400 +MTX4	PTX400 +MTX4/ PTX800 +MTX4	PTX800 +MTX4/ PTX1600 +MTX4
p	,002	,004	,002	,002	,699	,002	,015



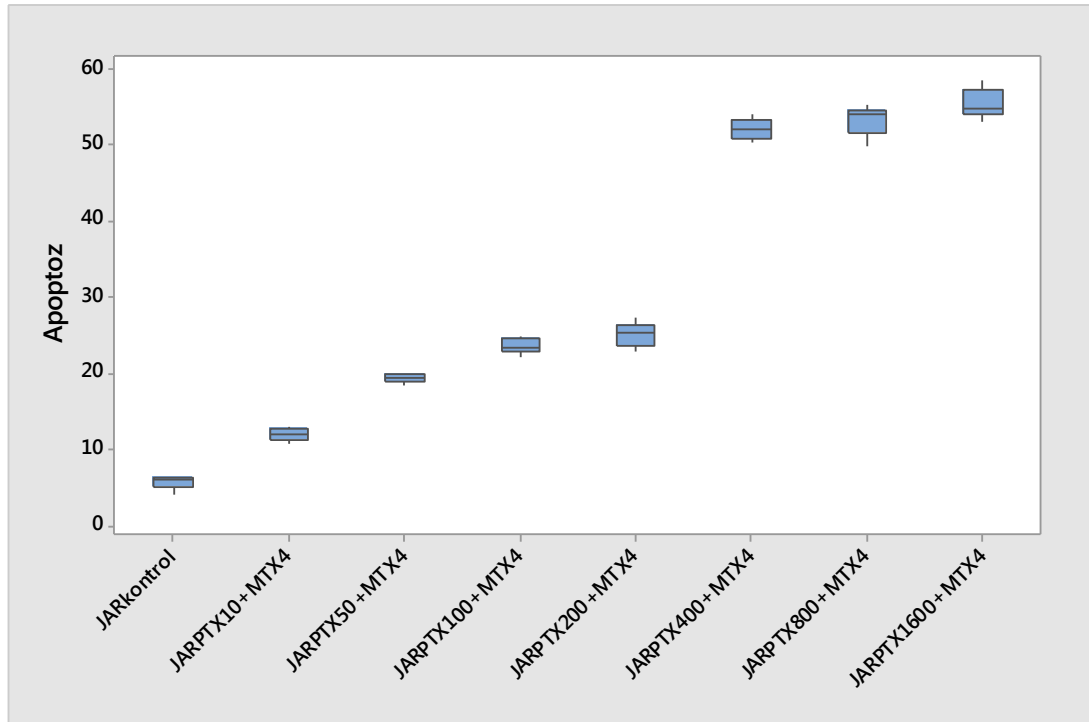
**Şekil 18. MTX ile birlikte PTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri**

**Tablo 16. MTX ile birlikte PTX verildiğinde JEG-3 hücre hattında h-hCG düzeyleri**

	h-hCG
JEGkontrol	56.8
JEGPTX10ng/ml+MTX4μg/ml	19.7
JEGPTX50ng/ml+MTX4μg/ml	41.1
JEGPTX100ng/ml+MTX4μg/ml	51.0
JEGPTX200ng/ml+MTX4μg/ml	27.2
JEGPTX400ng/ml+MTX4μg/ml	12.7
JEGPTX800ng/ml+MTX4μg/ml	10.4
JEGPTX1600ng/ml+MTX4μg/ml	5.8

h-hCG düzeylerinde de PTX'in dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

#### **4.6. MTX ile Birlikte Kullanılan PTX'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkileri**



**Şekil 19. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi**

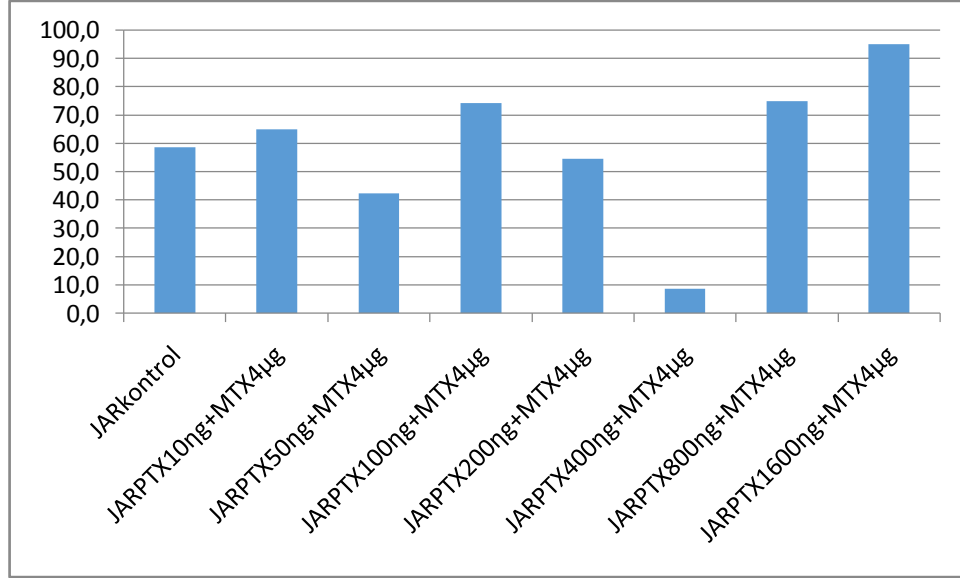
**Tablo 17. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JAR hücreleri üzerinde oluşturduğu apoptoz oranlarının dağılımı**

	Median (Min-Max)
JARPTX+MTX4kontrol	6 (4,1-6,4)
JARPTX_10+MTX4	12 (10,8-13,1)
JARPTX_50+MTX4	19,5 (18,4-20)
JARPTX_100+MTX4	23,4 (22,2-24,9)
JARPTX_200+MTX4	25,3 (23-27,4)
JARPTX_400+MTX4	52 (50,4-54)
JARPTX_800+MTX4	54,2 (50-55,3)
JARPTX_1600+MTX4	54,9 (53-58,5)

24 saat muamele sonunda 4µg/ml MTX ile birlikte kullanılan PTX'in 10ng/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %12'dir. 50ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apoptoz oranı %19,5, 100ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apoptoz oranı %23,4, 200ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apoptoz oranı %25,3, 400ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apoptoz oranı %52, 800ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apoptoz oranı %54,2, 1600ng/ml'lik PTX ile birlikte sonucu apoptoz oranı %54,9'dır. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır.

**Tablo 18. MTX ile birlikte kullanılan PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri p<0,05**

JAR	PTX10 +MTX4 Kontrol	PTX10+MTX4/ PTX50+MTX4	PTX50 +MTX4/ PTX100 +MTX4	PTX100 +MTX4/ PTX200 +MTX4	PTX200 +MTX4/ PTX400 +MTX4	PTX400 +MTX4/ PTX800 +MTX4	PTX800 +MTX4/ PTX1600 +MTX4
p	,002	,002	,002	,093	,002	,132	,093



Şekil 20. MTX ile birlikte PTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri

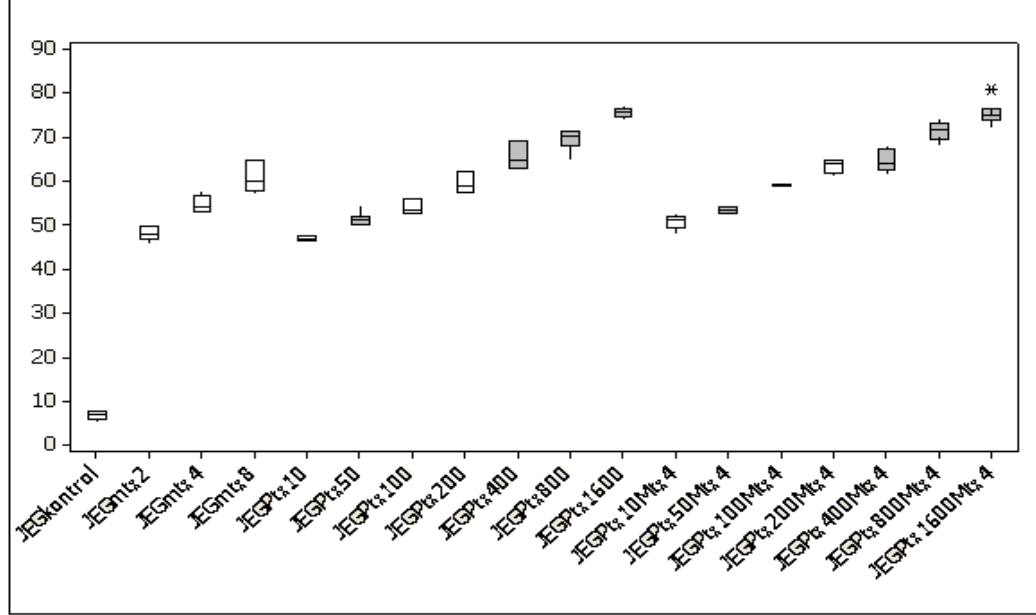
Tablo 19. MTX ile birlikte PTX verildiğinde JAR hücre hattında h-hCG düzeyleri

	h-hCG
JARkontrol	58.5
JARPTX10ng/ml+MTX4µg/ml	64.9
JARPTX50ng/ml+MTX4µg/ml	42.3
JARPTX100ng/ml+MTX4µg/ml	74.2
JARPTX200ng/ml+MTX4µg/ml	54.5
JARPTX400ng/ml+MTX4µg/ml	8.7
JARPTX800ng/ml+MTX4µg/ml	74.8
JARPTX1600ng/ml+MTX4µg/ml	95.1

h-hCG düzeylerinde de PTX'in dozu ile orantılı bir düşüş izlenmemiştir.



#### 4.7. Tek Bağna ve MTX ile Birlikte Kullanılan PTX'in JEG Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkilerinin KarĖıĖılması

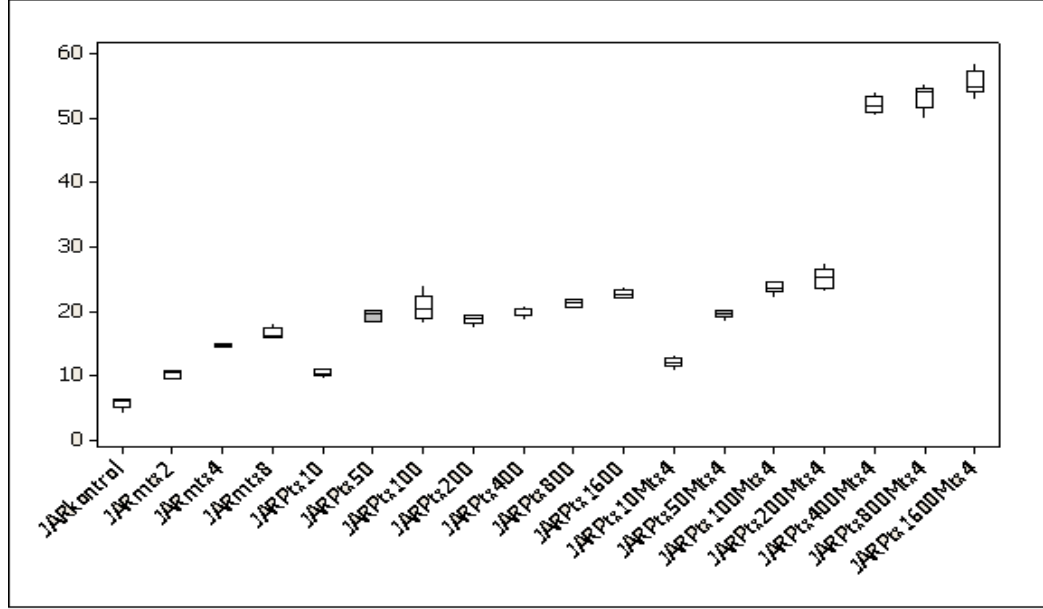


Ėekil 21. Tek bağna ve MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JEG-3 hücre hattı üzerine apoptotik etkilerinin grafiksel karĖıĖılması

Tablo 20. Tek bağna ve MTX ile birlikte kullanılan PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JEG-3 hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

JEG	PTX10/ PTX10 +MTX4	PTX50/ PTX50+MTX4	PTX100/ PTX100 +MTX4	PTX200/ PTX200 +MTX4	PTX400/ PTX400 +MTX4	PTX800/ PTX800 +MTX4	PTX1600/ PTX1600 +MTX4
p	,002	,065	,002	,026	,589	,310	,240

#### 4.8. Tek Bağna ve MTX ile Birlikte Kullanılan PTX'in JAR Hücre Hattı Üzerine Apoptotik Etkilerinin KarĖılaĖtırılması



Ėekil 22. Tek bağna ve MTX ile birlikte kullanılan PTX'in JAR hücre hattı üzerine apoptotik etkilerinin grafiksel karĖılaĖtırılması

Tablo 21. Tek bağna ve MTX ile birlikte kullanılan PTX'in artan dozları arasındaki etkinliğinin JAR hücreleri üzerinde Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri  $p < 0,05$

JAR	PTX10/ PTX10 +MTX4	PTX50/ PTX50+MTX4	PTX100/ PTX100 +MTX4	PTX200/ PTX200 +MTX4	PTX400/ PTX400 +MTX4	PTX800/ PTX800 +MTX4	PTX1600/ PTX1600 +MTX4
p	,004	,937	,026	,002	,002	,002	,002

## 5. TARTIĞMA

Özellikle daha yeni olan ilaçların etkilerinin değerlendirilmesinde hücre kültürü çalışmaları sıklıkla başvurulan yöntemlerdir. Bu sayede ilaç adaylarının bilinen ya da etki etmesi düşünülen moleküler hedefler üzerinde yol açtıkları etkiler tespit edilebilmekte; ilacın hedef dokuda yaratacağı etkiler öngörülebilmektedir. Geliştirilmiş kanser ilaç bileşenlerinin hücre fenotipinde meydana getirdiği değişiklikler nedeni ile yenilenen tümör büyümesi, klinik uygulamalarda beklenmeyen sonuçların alınmasına neden olmaktadır (90). Klinikte görülen bu sonuçların nedenlerinin tahmin edilebilmesi için insan tek tabakalı kanser hücre hatlarının kullanımı oldukça yaygındır ve önemli bir belirleyicidir (134; 135). Çalışmalar farklı hücre hatları üzerinde yapılmaktadır. Bu durum primer tümörlerde meydana gelen genomik değişimler hakkında geniş veritabanı oluşumunu sağlamaktadır. Böylece hedeflenen inhibitöre yönelik tepkilerin belirlenmesi klinik bulguların açıklanabilmesine de olanak sağlamaktadır (136).

Çeşitli ilaçların hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri nekroz ve apopitoz olmak üzere iki yol üzerinden gerçekleşir. Kanser tedavisinde kullanılan veya kullanılacak ilaçların sitotoksik etkilerinin apopitotik yol üzerinden gerçekleştiğinin gösterilmesi tercih edilen bir özelliktir. Çünkü, kanserin ortaya çıkışını tetikleyen önemli mekanizmalardan biri kanserleşmeye doğru yol alan normal bir hücrenin apopitotik mekanizmalarının bozulması ve hücrenin anti-apopitotik sinyal yollarının apopitotik yollar üzerine hakim bir konuma geçmesidir. Bu nedenle, MTX ve PTX'in kombine kullanımına bağlı olarak gözlenen apoptotik etkinin sinerjistik olup olmadığının araştırılması son derece önemlidir. Bu çalışmada JAR ve JEG-3 hücrelerinde apopitozun derecesi FCM ile belirlendi.

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

EMA-CO protokolüne direnç geliştiren hastalarda geliştirilmiş bir başka standart protokol bulunmamaktadır. PTX'in günümüzde koryokarsinom üzerinde klinik kullanımı sınırlı sayıda ve seçilmiş vakalardan ibaret gözükmektedir.

Termrungruangelert ve arkadaşları koryokarsinomu olan klinik olarak metastatik ve EMA-CO protokolüne direnç geliştiren hastalar üzerinde tek başına yüksek dozlarda PTX kullanılmış (3 haftada bir 250mg/m<sup>2</sup> iv infüzyon) sonuçta hastalarda remisyon geliştiği gözlenmiş (137).

Yine standart tedavi rejimlerinden sonra nüksetmiş metastazları olan hastalar üzerinde PTX tek başına ve başka ilaçlarla kombine edilerek kullanıldığında remisyon geliştiği gösterilmiş (138).

Ganguly ve arkadaşlarının yaptığı çalışma göstermektedir ki paklitaksel hücre göçünü mikrotübülleri baskılayarak inhibe etmekteyken  $\beta$ 3 tubulin PTX'in bu etkisini mikrotübül aktivitesinin devamını sağlayarak antagonize etmektedir (139).

Chen YX ve arkadaşları MTX'in düşük dozlardan başlayarak JAR hücreleri üzerinde apopitozun başlamasını indüklediğini göstermişlerdir (140).

Koechli ve arkadaşlarının hem JAR hem de JEG hücreleri üzerinde 10 ayrı kemoterapotığın kemosensitivitesini ölçmek için yaptıkları bir çalışmada, hücre serileri üzerinde en etkili üç ilaçtan birisi PTX olarak bulunmuştur (134).

Marth ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada paklitakselin koryokarsinom hücre serileri üzerinde ki etkilerinin over kanseri serilerine göre 3 kat fazla olduğu gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada 1-3  $\mu$ mol paklitaksel kullanılmış ve bu dozun tümörün büyümesini %50 oranında inhibe edebildiği ortaya konulmuştur (135). Ancak Hahn ve arkadaşları ile Lopez ve arkadaşları bu dozlarda tümör büyümesinde daha az baskılanma elde ettiklerini ifade etmişler (141; 142).

Marth ve arkadaşları MTX ve PTX kombinasyonunu JAR ve BeWo hücre serileri üzerinde kullandıklarında antiproliferatif aktivitenin arttığını gözlemişler. Buna rağmen büyümeyi baskılayıcı etkilerinde tek ajana göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit etmediklerini ifade etmişlerdir (135).

Bizim çalışmamızda 2  $\mu$ g/ml MTX JEG-3 hücrelerinde tek başına kullanıldığında apopitoz oranı %48,08'dir. 4  $\mu$ g/ml'de %54,77, 8 da ise %60,8'dir. JAR hücrelerinde bu oranlar 2  $\mu$ g/ml MTX için %10,2, 4  $\mu$ g/ml'de %14,7, 8  $\mu$ g/ml'de ise %16,5'dir.

PTX'in 10 $\eta$ g/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apopitoz oranı %46,85'dir. 50 $\eta$ g/ml'de %51,4, 100 $\eta$ g/ml'de %54, 200 $\eta$ g/ml'de %59,5, 400 $\eta$ g/ml'de %65,6, 800 $\eta$ g/ml'de %69,5, 1600 $\eta$ g/ml'de ise %75,6'dır. PTX'in JAR

hücrelerindeki apoptoz oranı 10ng/ml'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %10,2'dir. 50ng/ml'de %19,7, 100ng/ml'de %20,4, 200ng/ml'de %18,8, 400ng/ml'de %20,3, 800ng/ml'de %21,4, 1600ng/ml'de %22,5'dir.

4µg/ml MTX ile birlikte kullanılan PTX'in 10ng/ml'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %50,8'dir. 50ng/ml'de oran %53,4, 100ng/ml'de %59,1, 200ng/ml'de %63,4, 400ng/ml'de %64,5, 800ng/ml'de %71,5, 1600ng/ml'de %75,4'dür. Yine 4µg/ml MTX ile birlikte kullanılan PTX'in 10ng/ml'lik doz uygulaması sonucu bu kez JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %12'dir. 50ng/ml'de %19,4, 100ng/ml'de %23,6, 200ng/ml'de %25,1, 400ng/ml'de %52,1, 800ng/ml'de %53,3, 1600ng/ml'de ise %55,4'dir.

Yaptığımız çalışmada MTX ve PTX'in tek başlarına artan dozlarla kullanıldıklarında hem JAR hem JEG-3 hücre serileri üzerinde ki apoptotik etkilerinin de arttığını istatistiksel olarak gözlemledik. Bu iki ilaç kombine edilip MTX dozu sabit tutulurken PTX'in dozu arttırıldığında JAR hücre serisinde apoptotik etki artarken JEG-3 hücre serisi üzerinde bu etki 400ng/ml'ye kadar artmış bu doz ve üzerinde ise apoptotik etkinin istatistiksel olarak artmadığı görülmüştür.

## 6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmada PTX'in, tek başına JAR ve JEG-3 hücre hattında doza bağlı olarak etki gösterdiği saptanmıştır. MTX ve PTX'in kombinasyonunda JAR ve JEG-3 hücrelerinde doza bağlı olarak apoptoza neden olmuştur; ancak bu etkinin özellikle JEG-3 hücre serisi üzerinden bakıldığından belli bir dozdan sonra artmadığı gözlemlenmiştir.

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

## 7. KAYNAKÇA

1. Rustin GJS. Trophoblastic diseases. In: Shaw RW, Soutter WP, Eds. Gynaecology. 2nd Ed., London: Churchill Livingstone; 1997: 605-614.
2. L.A. Cole, S.A. Butler, S.A. Khanlian, A. Giddinbgs, M.J. Seckl, E.I. Kohorn Gestational trophoblastic diseases: 2. Hyperglycosylated hCG as a reliable marker of active neoplasia Gynecol. Oncol., 102 (2006), pp. 150–158.
3. Mazur MT, Kurman RJ. Gestational trophoblastic disease. In: Kurman RJ Eds. Blaustein's Pathology of Female Genital Tract. 4th Ed., New York: Springer-Verlag 1994; 1049-1093.
4. Elston CW. Gestational trophoblastic disease. In Fox H Eds. Obstetrical and Gynaecological Pathology. 4th Ed., Edinburgh: Churchill Livingstone 1995; 1597-1640.
5. Perez A, Woods A, Grattan CE . Methotrexate: a useful steroid-sparing agent in recalcitrant chronic urticaria. Br J Dermatol. 2010 Jan; 162(1): 191-4. Epub 2009 Nov 6.
6. Bleyer WA, Pohlman DG. Prophylaxis and treatment of leukemia in the central nervous system and other sanctuaries [Review]. Semin Oncol 12: 131–148 (1985).
7. Panetta JC, Sparreboom A, Pui CH, Relling MV, Evans WE PLoS Comput Biol. Modeling mechanisms of in vivo variability in methotrexate accumulation and folate pathway inhibition in acute lymphoblastic leukemia cells. 2010 Dec 2; PLoS Comput Biol 6(12).
8. Sathasivam S. Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis. Nat Clin Pract Neurol. 2008 June; 4(6 ): 317-27. Epub 2008 May 20.
9. Salim A, Tan E, Ilchyshyn A, Berth-Jones J. Folic acid supplementation during treatment of psoriasis with methotrexate : a randomized , double blind, placebo-controlled trial. Br J Dermatol 2006; 154: 1169-74.
10. Koyama S, Sato E, Takamizawa A, Tsukadaira A, Haniuda M, Kurai M, Numanami H, Nagai S, Izumi T. Methotrexate stimulates lung epithelial cells to release inflammatory cell chemotactic activities. Exp Lung Res. 2003 Mar; 29(2): 91-111.

11. Conaghan PG, Brooks P. Disease-modifying antirheumatic drugs, including methotrexate, gold, sulfasalazine, antimalarials, and D-penicillamine. *Curr Opin Rheumatol* 1996; 8(3): 176–82.
12. Chabner B, Wilson W, Supko J. Pharmacology and toxicity of antineoplastic drugs. Editorial: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kipps TJ, Kaushansky K. In *Williams Hematology*. 7th Edition. Mc Graw Hill Company, United States. 2007; 249-51.
13. Sener G, Eksioğlulu-Demiralp E, Çetiner M, et al. L-carnitine ameliorates methotrexate-induced oxidative organ injury and inhibits leukocyte death. *Cell Biology And Toxicology* 2006; 22: 47–6.
14. Anutosh Ganguly, Hailing Yang, and Fernando Cabral “Class III  $\beta$ -Tubulin Counteracts the Ability of Paclitaxel to Inhibit Cell Migration” *Oncotarget*. May 2011; 2(5): 368–377.
15. Palmer JR. Advances in the epidemiology of gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 1994;39:155-162 .
16. Semer DA, Macfee MS. Gestational trophoblastic disease: Epidemiology. *Semin Oncol*. 1995;22:109-113.
17. Özalp S, Yalçın ÖT, Tanır HM. Hydatidiform mole in Turkey from 1932 to 2000. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 73:257-8.
18. Özalp S, Metintaş S, Arslantaş D, Işıklı B, Kalyoncu C ve ark. Frequency of hydatidiform mole in the rural part of Eskişehir, Turkey. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2003; 24(3-4):315-6.
19. Harma M, Harma M, Yurtseven S, Gungen N. Gestational trophoblastic disease in Sanliurfa, southeast Anatolia, Turkey. *Eur J Gyneacol Oncol* 2005; 26: 306-8.
20. Özalp S, Yalcın OT, Tanir HM. Hydatidiform mole at extreme ages of reproductive life in a developing country from 1932 to 2000. *Eur J Gynecol Oncol*. 2002; 23(4):361-2.
21. Özalp S, Yalçın OT, Elmas E. Elli iki yaşında mol hidatidiform olgusu. *Jinekoloji ve Obstetrik Bülteni*. 2000;9(1):26-28.
22. Sand PK, Lurain JR, Brewer JI. Repeat gestational trophoblastic disease. *Obstet Gynecol*. 1984;63:140-5.



23. Oge T, Ozalp SS, Güngör T, Yildirim Y, Sancı M, Dogan A, Ertas IE, Yetimlar H, Dilek S, Celik C. Hydatidiform mole in Turkey: results from six centers. *J Reprod Med.* 2012 May-Jun;57(5-6):259-61.
24. Özalp S, Yalçın OT, Tanir HM, Etiz E. Recurrent molar pregnancy: report of a case with seven consecutive hydatidiform moles. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52(3):215-6.
25. Kösebay D., Demirkıran F.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda epidemiyoloji, içinde: GTH özel sayısı, Özalp S. (Ed.), Kadın doğum dergisi, 2005; Ek 2:96-105.
26. Bracken MB, Brinton LA, Hayashi K. Epidemiology of hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Epidemiol Rev.* 1984;6:52-75.
27. Grimes DA. Epidemiology of gestational trophoblastic disease. *Am J Obstet Gynecol.* 1984;150:309.
28. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Yurtseven S, Demir N. Serum levels of folate, vitamin B12 and homocysteine in complete hydatidiform mole. *J Reprod Med.* 2004 Apr; 49(4):285-8.
29. Harma M, Harma M, Kocyigit A, Keles H. Serum levels of zinc and copper in hydatidiform mole. *Arch Gynecology and Obstetrics.* 2005 Apr;271(4):304-6. Epub 2004 Mar 10.
30. Parazzini F, La Vecchia C, Mangili G, et al. Dietary factors and risk of trophoblastic disease. *Am Obstet Gynecol* 1988;158:93-99.
31. Berkowitz RS, Cramer DW, Bernstein MR, et al. Risk factors for complete molar pregnancy from a case control study. *Am J obstet Gynecol* 1985;52:1016-1020.
32. Wolf NG, Lage JM: Genetic analysis of gestational trophoblastic disease: A review. *Semin Oncol*, 22:113, 1995.
33. Özalp S. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları No. 76, Anadolu Üniversitesi Basım Evi, 1989.

34. Vang R, Gupta M, Wu LS, Yemelyanova AV, Kurman RJ, Murphy KM, Descipio C, Ronnett BM. Diagnostic reproducibility of hydatidiform moles: ancillary techniques (p57 immunohistochemistry and molecular genotyping) improve morphologic diagnosis. *s.l. : Am J Surg Pathol* 2012;36:443-453.
35. Weaver DT, Fisher RA, Newlands ES, Paradinas FJ. Amniotic tissue in complete hydatidiform moles can be androgenetic. *J Pathol* 2000; 191:67–70.
36. Öner Ü. Paşaoğlu Ö.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda Patoloji, Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar Özel sayısı, Özalp S.(ed.), Kadın Doğum Dergisi,2005;Ek 2:110-127.
37. Mazur MT, Kurman RJ. Gestational trophoblastic disease and related lesions. In: Kurman RJ.ed. *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*. 4. Baskı, Newyork: Springer-Verlag, 1994:1055-67.
38. Reedline RW, Abdulkarim FW. Pathology of gestational trophoblastic disease. *Semin Oncol*. 1995;22:96-103.
39. Öner Ü. Komplet ve parsiyel mol hidatidiformda patolojik bulgular. In: Özalp S. ed. *Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar*. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi, 1997:39-58.
40. Harma M, Harma M. Defective placentation and resultant oxidative stress play a similar role in complete hydatidiform mole to that in preeclampsia and early pregnancy loss. *Med Hypotheses* 2006; 66: 100-2.
41. Harma M, Harma MI, Kocyigit A: Comparison of protein carbonyl and total plasma thiol concentrations in patients with complete hydatidiform mole with those in healthy pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004, 83: 857 860.
42. Harma M, Harma MI, Erel O: Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. *Swiss Med Wkly* 2003,133: 563-566.
43. Barut A, Harma M, Arıkan I, Harma MI, Barut F: Endothelial nitric oxide synthase expression in gestational trophoblastic diseases. *Int J Gynecol Cancer*. 2010 Apr;20(3):337-40.

44. Harma M, Harma M, Koçyiğit A, Güngen N, Köylü AA, Demir N. Altered arginine metabolism in complete hydatiform mole. *Artemis* 2004; 5: 131-134.
45. Harma M, Harma MI, Kocyigit A, Demir N: Role of plasma nitric oxide incomplete hydatidiform mole. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004, 25: 333-335.
46. Harma M, Harma MI, Kocyigit A, Erel O (2005) Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. *Mutat Res* 583: 49–54.
47. L.A. Cole Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites *Clin. Chem.*, 43 (1997), pp. 2233–2243.
48. A kinetic comparison of the processing and secretion of the alpha beta dimer and the uncombined alpha and beta subunits of chorionic gonadotropin synthesized by human choriocarcinoma cells *J. Biol. Chem.*, 259 (1984), pp. 15123–15130. B.P. Peters, R.F. Krzesicki, R.J. Hartle, F. Perini, R.W. Ruddon.
49. R.O. Husa Immunologic and physical characterization of human chorionic gonadotropin and its subunits in cultures of human malignant trophoblast *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44 (1977), pp. 1154–1162.
50. L.A. Cole, R.O. Husa The carbohydrate on human chorionic gonadotropin produced by cancer cells *Adv. Exp. Med. Biol.*, 176 (1984), pp. 245–270.
51. L.A. Cole O-glycosylation of proteins in the normal and neoplastic trophoblast *Trophobl. Res.*, 2 (1987), pp. 139–148.
52. S. Imamura, G.A. Armstrong, S. Birken, L.A. Cole, R.E. Canfield Detection of desialylated forms of human chorionic gonadotropin *Clin. Chim. Acta*, 163 (1987), pp. 339–349.
53. Paşaoğlu Ö. Koryokarsinom ve plasental yerleşim bölgesinde gelişen trofoblastik tümörlerde patolojik bulgular. In. Özalp S. ed. *Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar*. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi, 1997:59-75.
54. Güner H. Tanı ve izlemde insan koryonik gonadotropini ve diğer hormonal yöntemler. *Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar*. Özalp S, ed., *Kadın doğum dergisi* 2005; ek 2:128-134.

55. Özalp S.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda izlem. T Klinikleri Jinekoloji ve obstetri, 14(3):182-186, 2004.
56. Tyrey L. Human Chorionic Gonadotropin: Properties and assay methods. Semin Oncol. 1995;22:121-129.43.
57. Berkowitz RS, Goldstein DP. Gestational trophoblastic neoplasia. Practical Gynecologic Oncology. Berek JS, Hacker NF, ed, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2000, s. 615-638.
58. Goldstein DP, Berkowitz RS. Prophylactic chemotherapy of complete molar pregnancy. Semin Oncol 1995;22: 157-160.
59. Prevention of postmolar GTN using prophylactic single bolus dose of Actinomycin D in high-risk HM: a simple, effective, secure and low-cost approach without adverse effects on compliance to general follow-up or subsequent treatment. . Uberti EM, Fajardo Mdo C, DA Cunha AG, Rosa MW, Ayub AC, Graudenz Mda S, Schmid H. s.l. : Gynecol Oncol. 2009;114: 299-305.
60. Ayhan A, Özalp S. Benign trofoblastik Hastalıklar (Hydatidiform mole) 100 olgunun klinik incelenmesi. Hacettepe Tıp / Cerrahi Bülteni. 1982;15(1):56-62.
61. Özalp S, Hassa H, Şener T, Minsin T. Elli dokuz mol hidatidiform olgusunun değerlendirilmesi. Jinekoloji ve Obstetrik Bülteni. 1998;7(2):51-56.
62. Lurain JR, Brewer JI, Torok EE, Halpem B. Natural history of hydatidiform mole after primary evacuation. Am J Obstet Gynecol. 1983;145:591-5.
63. Özalp S., Gestasyonel trofoblastik neoplaziler, Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi, Ed.:Çiçek N.,Akyürek C., Çelik Ç., Haberal A. Güneş Kit., Ankara,2006,1261-1271.
64. Kohorn EI. Negotiating a staging and risk factor scoring system for gestational trophoblastic neoplasia: a progress report. J Reprod Med 2002;47:445-450.
65. Kohorn EI. The FIGO 2000 staging and risk factor scoring system for gestational trophoblastic neoplasia. In Hacker RF Eds. 2nd Ed, Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines for Gynaecologic Cancers. Elsevier 2002; 122-145.
66. Gestational Trophoblastic Disease: World Health Organization. Technical Report Series 692, WHO, Geneva, 1983.

67. Soper JT. Surgical therapy for gestational trophoblastic disease. *JRM*. 1994;39:168-74.
68. Özalp S.: Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Cerrahi yaklaşım. *Jinekolojik ve obstetrikal cerrahi*. Güneş Kitapevi, Ankara, 2005, 995-1000.
69. Xiang Y, Yang X, Du J, Song H. The role of hysterectomy in the therapy of gestational trophoblastic tumor. *Chin Med Sci J*. 2000; 15(1):45-8.
70. Tunalı C, Etiz D.:Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda radyoterapinin yeri. *Gestasyonel trofoblastik hastalıklar özel sayısı*, Özalp S (Ed.), *Kadın Doğum Dergisi*, 2005; Ek 2: 164-168.
71. Curry SL, Schlaerth JB, Kohorn El Boyce JB, Gore H, Twiggs LB, et al. Hormonal contraception and trophoblastic sequale after hydatiform mole (A Gynecologic Oncology Group Study). *Am J Obstet Gynecol*. 1989;160:805-8.
72. Deicas RE, Miller DS, Rademaker AW, Lurain JR. The role of contraception in the development of postmolar gestational trophoblastic tumor. *Obstet Gynecol*. 1991;78:221-6.
73. Alazzam M, Tidy J, Hancock BW, Osborne R. First line chemotherapy in low risk gestational trophoblastic neoplasia. *Cochrane Database Syst Rev* 2009 21;(1):CD007102.
74. Homesley HD. Single-agent therapy for nonmetastatic and low-risk gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 1998;43: 69-74.
75. Osborne R, Gerulath A. What is the best regimen for low-risk gestational trophoblastic neoplasia? A review. *J Reprod Med* 2004;49: 602-16.
76. Fleisher M. Antifolate analogs: mechanism of action, analytical methodology, and clinical efficacy. *Ther Drug Monit* 1993;15: 521-6.
77. Treon SP, Chabner BA. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem* 1996;42: 1322-9.
78. Matsui H, Iitsuka Y, Suzuka K, Yamazawa K, Mitsunashi A, Sekiya S. Salvage chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic tumor. *J Reprod Med* 2004;49: 438-42.

79. Tonanont M, Inthasorn P, Boriboonhirunsarn D, Wongthiraporn W, Suphanit I. Response to initial treatment of low and intermediate risk gestational trophoblastic disease with methotrexate and folinic acid. *J Med Assoc Thai* 2005;88: 1349-54.
80. Gordon AN, Gershenson DM, Copeland LJ. High-risk metastatic gestational trophoblastic disease: further stratification into clinical entities. *Gynecol Oncol* 1989;34: 54-56.
81. Shimizu T, Yaegashi N. Gestational trophoblastic tumors and recent clinical information. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29: 1363-70.
82. Lurain JR. Treatment of gestational trophoblastic tumors. *Curr Treat Options Oncol* 2002;3: 113-24. Lurain JR. Pharmacotherapy of gestational trophoblastic disease. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4: 2005-17.
83. Lu WG, Ye F, Shen YM, Fu YF, Chen HZ, Wan XY, Xie X. EMA-CO chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic neoplasia: a clinical analysis of 54 patients. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18: 357-62.
84. Bower M, Newlands ES, Holden L. EMA-CO for high-risk gestational trophoblastic tumors: results from a cohort of 272 patients. *J Clin Oncol* 1997;15: 2636-2643.
85. Lurain JR, Nejad B. Secondary chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005;97: 618-23.
86. Maestá I et al. Prognostic factors associated with time to hCG remission in patients with low-risk postmolar gestational trophoblastic neoplasia. *Gynecol Oncol*.2013, ; 130:312-6.
87. Rustin GJ, Newlands ES, Lutz JM, et al. Combination but not single-agent methotrexate chemotherapy for gestational trophoblastic tumors increases the incidence of second tumors. *J Clin Oncol* 1996; 14:2769.
88. Schechter NR, Mychalczak B, Jones W, Spriggs D. Prognosis of patients treated with whole-brain radiation therapy for metastatic gestational trophoblastic disease. *Gynecol Oncol* 1998; 68:183.

89. Amikura T, Aoki Y, Banzai C, Yokoo T, Nishikawa N, Sekine M, Suzuki M, Tanaka K. Metastatic choriocarcinoma successfully treated with paclitaxel and carboplatin after interstitial lung disease induced by EMA-CO. *Gynecol Oncol*. 2006 Sep;102(3):573-5. Epub .
90. Jones WB, Schneider J, Shapiro F, Lewis JL Jr. Treatment of resistant gestational choriocarcinoma with taxol: a report of two cases. *Gynecol Oncol*. 1996 Apr;61(1):126-30.
91. Schorge JO, Goldstein DP, Bernstein MR. Recent advances in gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 2000;45: 692-700.
92. Garner EI, Lipson E, Bernstein MR, Goldstein DP, Berkowitz RS. Subsequent pregnancy experience in patients with molar pregnancy and gestational trophoblastic tumor. *J Reprod Med* 2002;47: 380-6.
93. Garner E, Goldstein DP, Berkowitz RS, Wenzel L. Psychosocial and reproductive outcomes of gestational trophoblastic diseases. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2003;17: 959-68.
94. Berkowitz RS, Tuncer ZS, Bernstein MR. Management of gestational trophoblastic diseases: subsequent pregnancy experience. *Semin Oncol* 2000;27: 678-685.
95. Khoo SK. Clinical aspects of gestational trophoblastic disease: a review based partly on 25-year experience of a statewide registry. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2003;43: 280-9.
96. Wani, M.C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T. "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*" *J. Am. Chem. Soc*, 93(9), 2325-2327 (1971).
97. Schiff, P.B., Fant, J., Horwitz, S.B. "Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol" *Nature*, 277, 665-667 (1979). .
98. Ringel, I., Horwitz, S.B."Studies with RP 56976 (Taxotere): A semisynthetic analogue of taxol" *J. Natl. Cancer Inst.*, 83, 288-91 (1991).
99. Eisenhauer, EA., Vermorken, J.B. "The Taxoids" *Drugs*, 55(1), 5-30 (1998).
100. Rowinsky, E.K. "The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents" *Annu. Rev. Med.*, 48, 353-374 (1997).

101. Rose, W.C. "Preclinical antitumor activity of taxanes" in Suffness M (ed.), *Taxol: Science and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 209-236 (1995).
102. Rowinsky, E.K., Wright, ML, Monsarrat, B., Lesser, G.J., Donehower, R.C. "Taxol: Pharmacology, metabolism and clinical implications" *Cancer Surv.*, 17, 283-304 (1993).
103. Harris, J.W., Katkı, A., Anderson, L.W., Chmurny, G.N., Paukstelis, J.V., Collins, J.M. "Isolation, structural determination, and biological activity of 6<sub>7</sub>-hydroxytaxol, the principal human metabolite of taxol" *J. Med. Chem.*, 37(5), 706-709 (1994).
104. Arbuck, S.G., Blaylock, B.A. "Taxol: Clinical results and current issues" in Suffness M (ed.), *Taxol: Science and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 379-415 .
105. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1. Cilt. 11. baskı. Ankara. Hacettepetas Yayıncılık 2005. 317- 347.
106. Gey, G. O., Coffman, W. D. and Kubicek, M.T. (1952) Tissue culture studies of the proliferativecapacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 364-365.
107. Bruce N Cronstein,MD. The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin N Amer* 1997;23:739-55.
108. Norris RE, Adamson PC. Clinical potency of methotrexate, aminopterin, talotrexin and pemetrexed in childhood leukemias. *Cancer Chemother Pharmacol* (2010) 65:1125–1130.
109. Jolivet jj, Cowan KH, Clendennin Nj, Chabner BA. The pharmacokinetics and clinical use of methotrexate. *N Engl j med* 1983; 309: 1094-104.
110. Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis. Results of the USAUSSR double blind placebo controlled trial.The Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group and The Cooperative Study Group. *N Engl J Med* 1992: 326:1043– 1049. Ginnani EH, Brewer EJ, Kuzima N, Shakiov A, Maximov A, Vorontsov I, Fink CW, Newman AJ, Cassidy JT, Zemel LS.
111. Maeda T, Miyazono Y, Ito K, Hamada K, Sekine S, Horie T. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats *Cancer Chemother Pharmacol* (2010) 65: 1117–1123.




112. McEvoy GK, ed. Methotrexate. Bethesda, MD:AHFS drug information 2004. American Society of Health-System Pharmacists; 2003:1082-9.
113. Regina Maria V. Babiak, Annibal P. Campello, Eva G. S. Carnieri And Ma. Benigna M. Oliveira. Methotrexate: Pentose Cycle And Oxidative Stres.Cell Biochem Funct. 16(1998), 283-293.
114. Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, Bielack S, Pratt CB, Ferrari S, Bacci G, Craft AW, Adamson PC. High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. Cancer. 2004 May 15;100(10):2222-32.
115. Burrows, M. T. The cultivation of tissues of the chicken embryo outside the body. (1910) JAMA 55, 2057.
116. Akbaba, G., Sunay, Ç., Hayvan Deneyleri Yararsız ve Acımasız Çalışmalar mı, Sağlığımız İçin Önemli Bir Gereksinim mi? Bilim ve Teknik, Mayıs 2000.
117. Helfrich, M.H., Ralston, S.H., Bone research protocols, Humana Press Inc., Totowa, 2003.
118. Brauner, A., Kaden, P., Human gingival fibroblast cultures for biological intra-oral material testing.Z. Stomatol., 86(8), 533-8., 1989.
119. Topal, Ş.R., Hücre kültür teknikleri-II Uygulamalar, Cemturan Ofset Matbaası, İstanbul,138-140. 2004.
120. Langdon, S.P., Lawrie, S.S., Hay, F.G., Hawkes, M.M., McDonald, A., Hayward, I.P., Schol, D.J., Hilgers, J., Leonard, R.C., Smyth, J.F. Characterization and properties of nine human ovarian adenocarcinoma cell lines. 1988, Cancer Res., 48: 6166-6172.
121. Bono, J., Tolcher, A. ve Rowinsky, E., (2003), The future of cytotoxic therapy: selective cytotoxicity based on biology is the key, Breast Cancer Research, 5, 154-159.
122. An improved  $\beta$ -lactamase reporter assay: multiplexing with a cytotoxicity readout for enhanced accuracy of hit identification, 2007, Journal of Biomolecular Screening, 12, 635-644. Halis, T.M., Kop, L.A., Gibson, J., Lebakken, S.C., Hancock, M., Kramer, H.K. ve Etienne, T.T.
123. Weyermann, J., Lochmann, D. ve Zimmer, A. (2005), A practical note on the use of cytotoxicity assays, International Journals of Pharmaceutics, 288, 369-376.

124. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *BrJ Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
125. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-259.
126. Mayall, B.H., Casperion, T.O.: selected publications, *Cytometry* 5:314, 1984.
127. Kamensky, L.A., Memaed, M.R.: Spectrophotometric cell sorter *Science* 156:1364, 1967.
128. Kamensky, L. A., Memaed, M. R., Dierman, H.: Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 150:630. 1965.
129. Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. *Modernflow cytometry: a practical approach. Clin Lab Med.* 2007; 27(3): 453-68.
130. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem.* 2002;48: 1819-27.
131. Meers P and Mealy T: Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan. 1994, *Biochemistry* 33 (19): 5829–37.
132. Morrone S (2007) Annexin V. *Purdue Cytometry CD-ROM Series*, volume 4.
133. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GAM et al. (1994). "Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis". *Blood* 84 (5): 1415–20.
134. Koechli OR, Schaer GN, Sevin BU, Perras JP, Schenk V, Rodriguez M, Untch M, Steren A, Haller U. In vitro chemosensitivity of paclitaxel and other chemotherapeutic agents in malignant gestational trophoblastic neoplasms. *Anticancer Drugs.* 1995 Feb;6(1):94-10.
135. Marth C, Lang T, Widschwendter M, Müller-Holzner E, Daxenbichler G. Effects of Taxol on choriocarcinoma cells. *Am J Obstet Gynecol.* 1995 Dec;173(6):1835-42. PubMed PMID: 8610772.


136. Gullbo, J., Fryknä, M., Rickardson, L., Darcy, P., Hägg, M., WicPhenotype based drug screening in primary ovarian carcinoma cultures identifies intracellular iron depletion as a promising strategy for cancer treatment, *Biochemical Pharmacology*, 82,139-47. 2011.
137. Termrungruangleert W, Kudelka AP, Piamsomboon S, Verschraegen CF, Edwards CL, Lifshitz S, Mante RP, Kavanagh JJ. Remission of refractory gestational.
138. Osborne R, Covens A, Mirchandani D, Gerulath A. Successful salvage of relapsed high-risk gestational trophoblastic neoplasia patients using a novel paclitaxel-containing doublet. *J Reprod Med*. 2004 Aug;49(8):655-61. Erratum in: *J Reprod Med*. 2005 May;50(5).
139. Ganguly A, Yang H, Cabral F. Class III  $\beta$ -tubulin counteracts the ability of paclitaxel to inhibit cell migration. *Oncotarget*. 2011 May;2(5):368-77. PubMed PMID: 21576762; PubMed Central PMCID: PMC3248193.
140. Chen YX, Lv WG, Chen HZ, Ye F, Xie X. Methotrexate induces apoptosis of human choriocarcinoma cell line JAR via a mitochondrial pathway. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009 Apr;143(2):107-11.
141. Hahn SM, Liebmann JE, Cook J, Fisher J, Goldspiel B, Venzon D, Mitchell JB, Kaufman D. Taxol in combination with doxorubicin or etoposide. Possible antagonism in vitro. *Cancer*. 1993 Nov 1;72(9):2705-11. PubMed PMID: 8104682.
142. Lopes NM, Adams EG, Pitts TW, Bhuyan BK. Cell kill kinetics and cell cycle effects of taxol on human and hamster ovarian cell lines. *Cancer Chemother*.

## 8. EKLER

### Ek 1: Etik Kurul Kararı



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



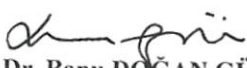
TOPLANTI TARİHİ : 18/09/2012  
TOPLANTI NO : 2012/18

**KARARLAR :**

2- B.E.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Aykut BARUT'un sorumluluğunda yapılacak olan 2012-110-04/09 Protokol no'lu "Metotreksat ve Paklitaksel Kemoterapilerinin Farklı Koryokarsinom Hücre Kültür Modelleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması" konulu çalışmanın Etik Kurallara uygunluğuna,

Oy Birliğı ile karar verilmiştir.

**A S L I G İ B İ D İ R**

  
**Doç. Dr. Banu DOĞAN GÜN**  
**B.E.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı**