

**T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

***All-trans* retinoik asit,
Metotreksat ve Aktinomisin D
kemoterapilerinin farklı koryokarsinom hücre
kültür modelleri üzerindeki etkilerinin
karşılaştırılması**

**UZMANLIK TEZİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI**

Dr. Görker SEL

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Müge HARMA**

Zonguldak 2014

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiii
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	7
2.8. Gestasyonel Trofoblastik Neoplazilerde Tedavi.....	9
2.8.1. Kemoterapi ve Radyoterapi	11
2.9. Tedavi Sonrası	13
2.10. ATRA.....	13
2.11. MTX	15
2.13. Act-D	17
2.14. Hücre Kültürü	18
2.14.1 Başlıca Hücre Kültür Tipleri	19
2.15. Sitotoksisite	20
2.16. Apoptoz	21
2.17. Flowsitometri	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	23
3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler	23
3.3. Kullanılan Aletler	25
3.4. JAR ve JEG-3 Hücre Kültürleri.....	26
3.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması	27
3.5.1. ATRA dozunun hazırlanması	27

3.5.2. MTX dozunun hazırlanması.....	28
3.5.3. Act-D dozunun hazırlanması	28
3.6. Yöntem.....	28
3.6.1. Hücre hatlarının kültüre edilmesi	28
3.6.2. Kemoterapötiklerin testler için hazırlanması ve β -HCG ölçümü.....	29
3.6.3. Annexin V yöntemi ile apopitoz tespiti ve istatistiksel analiz	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. ATRA'nın JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	31
4.2. ATRA'nın JAR hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	33
4.3. Act-D'nin JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri	35
4.4. Act-D'nin JAR hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	37
4.4. MTX'in JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri	39
4.5. MTX'in JAR hücre hattı üzerine apopitotik etkileri	41
4.6. Act-D 0.05 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	43
4.7. Act-D 0.05 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	45
4.8. Act-D 0.1 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	47
4.8. Act-D 0.1 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	49
4.9. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	51
4.10. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	53
4.11. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	55
4.12. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D'nin kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apopitotik etkileri.....	58
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ.....	64
7. KAYNAKÇA.....	65
8. Ekler	74
8.1. Ek 1 Etik kurul kararı	74

TEZ ONAY TUTANAĐI

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

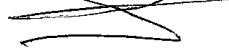
Tez Başlığı : All Trans Retinoik Asit, Metotreksat ve Aktinomisin D Kemoterapilerinin Farklı Koryokarsinom Hücre Kültür Modelleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Görker SEL

Tez Savunma Tarihi: 01/04/2014

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Müge HARMA

Prof. Dr. Mehmet İbrahim HARMA
Jüri Başkanı



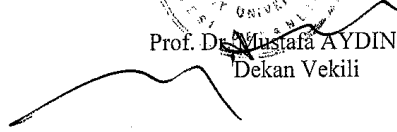
Prof. Dr. Müge HARMA
Üye



Doç. Dr. Aykut BARUT
Üye



Prof. Dr. Mustafa AYDIN
Dekan Vekili



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve bitirme tezimde değerli bilgileri, tecrübeleri ile bana yön veren, bir kliniği yönetme becerisi kazanmamı ve böylece iyi bir uzman olarak yetişmemi sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Müge Harma'ya hücre kültürü çalışmalarını gerçekleştiren Doç. Dr. İshak Özel Tekin'e; asistanlığım boyunca bana destek olan, mesleğimi öğrenmemi, sevmemi ve cerrahi beceri kazanmamı sağlayan Prof. Dr. Mehmet Harma'ya, Prof. Dr. Ülkü Özmen'e, Doç. Dr. Aykut Barut'a, Doç. Dr. İlker Arıkan'a; ayrıca tezimin Flow sitometri çalışmalarını gerçekleştiren Biyolog Nergis Sevinç'e, istatistiksel değerlendirmedeki yardımları nedeniyle Yrd. Doç. Dr. Çađatay Büyükuysal'a; tüm çalışma arkadaşlarıma; her zaman yanımda olan ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim anneme, babama ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım.

Araş. Gör. Dr. Görker SEL
Zonguldak, 2014

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. DSÖ Histolojik Sınıflama Sistemi	8
Tablo 2. 2000 FIGO Evrelendirmesi	8
Tablo 3. GTH için DSÖ/FIGO prognostik skorlama sistemi	9
Tablo 4. ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	31
Tablo 5. ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi	32
Tablo 6. ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	33
Tablo 7. ATRA'nın JAR hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi	34
Tablo 8. Act-D'nin JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	35
Tablo 9. Act-D'nin JEG-3 hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi	36
Tablo 10. Act-D'nin JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	37
Tablo 11. Act-D'nin JAR hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi.....	38
Tablo 12. MTX'in JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	39
Tablo 13. MTX'in JEG-3 hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi	40
Tablo 14. MTX'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	41
Tablo 15. MTX'in JAR hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi	42
Tablo 16. Act-D ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	43
Tablo 17. Act-D 0.05 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi.....	44
Tablo 18. Act-D 0.05 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	45
Tablo 19. Act-D 0.05 μ M'lik dozu ile, ATRA'nın JAR hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi.....	46
Tablo 20. Act-D 0.1 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	47
Tablo 21. Act-D 0.1 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi.....	48
Tablo 22. Act-D 0.1 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	49
Tablo 23. Act-D 0.1 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi.....	50
Tablo 24. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	51
Tablo 25. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin β -hCG değerlerine etkisi	52
Tablo 26. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	53
Tablo 27. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin β -hCG değerlerine etkisi.....	54

Tablo 28. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	55
Tablo 29. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin β -hCG değerlerine etkisi	56
Tablo 30. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D'nin kombinasyonlarının JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p<0,05$	58
Tablo 31. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JAR hücreleri üzerindeki etkisinin β -hCG değerlerine etkisi	59

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. ATRA'nın formülü ve temel özellikleri.....	13
Şekil 2. MTX'in kimyasal yapısı.....	15
Şekil 3. Act-D'nin kimyasal yapısı (C62H86N12O16).....	17
Şekil 4. JAR ve JEG-3 hücre kültürlerini içeren flasklar ve hücre kültür plakları	24
Şekil 5. 24 kuyucuklu hücre kültür plağı	24
Şekil 6. Flowsitometri	24
Şekil 7. Nüve CO ² inkübatörü.....	25
Şekil 8. JAR hücre kültürü mikroskopik görünümü	27
Şekil 9. JEG-3 hücre kültürü mikroskopik görünümü	27
Şekil 10. ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	31
Şekil 11. ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi	32
Şekil 12. ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	33
Şekil 13. ATRA'nın JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi	34
Şekil 14. Act-D'nin JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	35
Şekil 15. Act-D'nin JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi	36
Şekil 16. Act-D'nin JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	37
Şekil 17. Act-D'nin JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi	38
Şekil 18. MTX'in JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	39
Şekil 19. MTX'in JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi	40
Şekil 20. MTX'in JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	41
Şekil 21. MTX'in JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi	42
Şekil 22. Act-D ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	43
Şekil 23. Act-D 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi.....	44
Şekil 24. Act-D 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi	45
Şekil 25. Act-D 0.05 µM'lik dozu ile, ATRA'nın JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi.....	46
Şekil 26. Act-D 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	47
Şekil 27. Act-D 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi.....	48
Şekil 28. Act-D 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi	49
Şekil 29. Act-D 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi.....	50
Şekil 30. MTX 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi	51
Şekil 31. MTX 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin β-hCG değerlerine etkisi	52

Şekil 32. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi	53
Şekil 33. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin β -hCG değerlerine etkisi.....	54
Şekil 34. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	55
Şekil 35. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin β -hCG değerlerine etkisi	56
Şekil 36. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D'nin kombinasyonlarının JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi.....	58
Şekil 37. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JAR hücreleri üzerindeki etkisinin β -hCG değerlerine etkisi	59

KISALTMA LİSTESİ

9-cis RA: 9-cis retinoik asit

Act-D: Aktinomisin-D

APL: Akut Promiyelosit lösemi

ATRA: All-*trans* retinoik asit

β: Beta

BT: Bilgisayarlı Tomografi

DHFR: Dihidrofalat redüktaz

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EDTA: Etilen Diamin Tetraasetik Asit

EMA-CO: Etoposid, Metotreksat, Aktinomisin-D, Siklofosamid, Vinkristin

FA: Folinik asit

FCM: Flow sitometri

FIGO: Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu

GTH: Gestasyonel Trofoblastik Hastalık

GTN: Gestasyonel Trofoblastik Neoplazi

hCG: human koryonik gonadotropin

hPL: Human Plasental Laktojen

HM: Hidatidiform mol

KT: Kemoterapi

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

MTX: Metotreksat

PS: Fosfatidilserin

PYBGTT: Plasental yerleşim bölgesinden gelişen trofoblastik tümör

RNA: Ribonükleik asit

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RT: Radyoterapi

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences

T3: Triiodotiroksin

T4: Tiroksin

ÖZET

All-trans retinoik asit, Metotreksat ve Aktinomisin D kemoterapilerinin farklı koryokarsinom hücre kültür modelleri üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

Amaç: All-trans retinoik asit (ATRA) *trans* formu yapısıyla A vitamininin doğal bir derivativesi olup, hayvansal (retinoidler) ve bitkisel (karetenoid provitamin) gıdalarla vücuda alınır. ATRA, immatür hücrelerin farklılaşmasını uyarır ve yüksek bölünme potansiyeline sahip tümör hücrelerinin fonksiyonel hücrelere dönüşmesini sağlar. Bu etkisiyle özellikle Akut Promyelositik Lösemi'nin tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında ATRA'nın apoptozu uyarıcı, hücre çoğalmasını azaltıcı ve invazyonu inhibe edici etkileri olduğu bildirilmiştir.

Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar, insanda plasentadan gelişen bir grup hastalıktır ve koryokarsinom bunların malign formudur. Bu hastalıkların etyolojisinde, retinoik asit eksikliği ve A vitamini alımının azlığının, hastalık riskini arttırdığı çeşitli çalışmalarda saptanmıştır. Literatürde ATRA'nın diğer kemoterapötikler ile karşılaştırıldığı çalışmaların sayısı çok kısıtlıdır.

Çalışmamızın amacı, farklı hücre kültürü modelleri (JAR, JEG-3) kullanılarak ATRA'nın tek başına veya MTX, Act-D ile kombine kullanıldığında, koryokarsinom tedavisindeki etkinliğinin araştırılması ve bu konuda çok sınırlı olan literatür bilgisine ek yeni bir veri sağlamaktır.

Gereç ve Yöntem: İnsan koryokarsinom benzeri JAR ve JEG-3 hücreleri kültüre edildi. ATRA, MTX ve ACTD'nin uygulama grupları aşağıdaki gibi belirlendi;

Tek ilaç uygulaması için MTX'in 2 µM, 4 µM, 8 µM; ATRA'nın 0.1 µM, 1 µM, 10 µM; Act-D'nin 0.05 µM, 0.1 µM, 0.2 µM olması sağlanarak hazırlanmıştır.

ATRA ve MTX kombinasyonunda; ATRA'nın 0.1 µM, 1 µM ve 10 µM dozları ile MTX'in 2 µM, 4 µM ve 8 µM'lık dozu kullanılmıştır.

ATRA ve Act-D kombinasyonunda; ATRA'nın 0.1 µM, 1 µM ve 10 µM dozları ile Act-D'nin 0.05 µM, 0.1 µM ve 0.2 µM dozları kullanılmıştır.

ATRA ve MTX ve ACT-D kombinasyonunda ATRA'nın 0.1 µM, 1 µM ve

10 µM; MTX'in 2 µM'lık dozu ve ACT-D'nin 0.05 µM, 0.1 ve 0.2 µM'lık dozları kombine edilmiştir. Maddeler hücrelere aynı anda verilmiştir. İlaç uygulamasını izleyen 72. saatte hücreler Tripsin-Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) solüsyonu ile kaldırılıp, apopitoz çalışmasına alınmıştır. Bu çalışmada JAR ve JEG-3 hücrelerinde apopitozun derecesi Flowsitometri (FCM) ile belirlendi. Sadece bir set için tripsin öncesi süpernatant toplanıp, β-hCG ölçümü için derin dondurucuda saklanmıştır. İmmünoenzimatik yöntemle β-hCG ölçümü yapılmıştır. SPSS 19.0 ve Minitab 17 istatistik programları kullanılarak istatistiksel analiz yapılmıştır.

Bulgular: 0.1 µM, 1 µM ve 10µM ATRA JEG-3 ve JAR hücre hattına tek başına uygulandığında sırasıyla %15, %19, %30 ve %14, %17, %24'lük bir apopitoz oranı saptanırken, 2 µM, 4 µM ve 8 µM MTX JEG-3 ve JAR hücre hattına tek başına uygulandığında sırasıyla %40, %48, %53 ve %40, %45, %49'lük apopitoz oranı saptandı. 0.05 µM, 0.1 µM ve 0.2 µM Act-D JEG-3 ve JAR hücre hattına tek başına uygulandığında sırasıyla %17, %23, %36 ve %14, %15, %24'lük bir apopitoz oranı saptandı. İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre saptanan apopitoz anlamlıydı.

Ancak çalışmamızın asıl önemli çıkarımı olan bulgu ise kombine dozlarda MTX, Act-D ve ATRA'nın apopitoz oranlarına etkisiydi. Üç ilacın da düşük dozlarının kombinasyonu ile elde edilen apopitoz oranı JEG-3 ve JAR hücre hatlarında sırasıyla %54 ve %43 idi ve bu oranlar MTX'in 2 µM dozunda elde edilen apopitoz oranları olan %40'tan fazlaydı. İstatistiksel olarak anlamlıydı.

Sonuç: İnsan Koryokarsinom hücre hattı modelleri olan JAR ve JEG-3 üzerinde ATRA, MTX ve Act-D kombinasyon uygulaması her iki hücre hattında birden literatürde ilk kez yapılmıştır. Elde edilen bu sinerjistik apopitotik veriler, ATRA, MTX ve Act-D 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: ATRA, koryokarsinom, kemoterapi, hücre kültürü

ABSTRACT

The comparison of the effect of *All-trans* retinoic acid, Methotrexate, Actinomycin D and combined chemotherapy on the different choriocarcinoma cell culture models

Aim: *All-trans* retinoic acid (ATRA) is the natural derivative of vitamin with the trans form, which can be obtained from animal sources (retinoids) and from plant sources as provitamin carotenoids. ATRA induces the differentiation of immature cells and high pluripotent tumor cells to gain function. Especially with the help of this effect ATRA treatment is used in Acute Promyelocytic leukemia with success. Previous cell culture studies have shown that ATRA has the effect of inducing apoptosis, decreasing cell proliferation and inhibiting cell invasion.

Gestational trophoblastic diseases are the group of diseases that originates from human placenta and choriocarcinoma is the malignant form. In several studies it is shown that retinoic acid and vitamin A deficiency increase the risk of this disease at the etiology of these diseases. In literature the comparison of ATRA with other chemotherapeutics is scarce.

Our aim is to investigate the ATRA's efficiency in single usage and combined chemotherapy with MTX, Act-D in choriocarcinoma on cell culture models (JAR, JEG-3) and add new data to the literature that is insufficient in this topic.

Materials and Methods: Human choriocarcinoma like JAR and JEG-3 cells were cultured. ATRA, MTX and Act-D trial groups are determined as shown below;

For single drug trial; MTX 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M; ATRA 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M; Act-D 0.05 μ M, 0.1 μ M, 0.2 μ M dosages were maintained.

For the combination of ATRA and MTX; ATRA 0.1 μ M, 1 μ M and 10 μ M dosages with MTX 2 μ M, 4 μ M and 8 μ M dosages were maintained.

For the combination of ATRA and Act-D; ATRA 0.1 μ M, 1 μ M and 10 μ M dosages with Act-D 0.05 μ M, 0.1 μ M and 0.2 μ M dosages were maintained.

For the combination of ATRA, MTX and Act-D; ATRA 0.1 μ M, 1 μ M and 10 μ M dosages with MTX 2 μ M and with Act-D 0.05 μ M, 0.1 μ M and 0.2 μ M dosages were maintained. Drugs were given to the cells at the same time. Following drug administration at the 72nd hour the cells were detached by the Trypsine- Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (EDTA) solution. The degree of apoptosis was obtained by flow cytometry (FCM). Supernatant was collected before trypsin application for only one set, and stored in deep-freeze to investigate β -hCG levels. β -hCG levels were investigated by immunoenzymatic method. SPSS 19.0 and Minitab 17 programmes were used to make statistical analysis.

Findings: With the single application of 0.1 μ M, 1 μ M and 10 μ M ATRA to the JEG-3 and JAR cell line, 15%, 19%, 30% and 14%, 17%, 24% apoptosis were determined, respectively, with the single application of 2 μ M, 4 μ M and 8 μ M MTX to the JEG-3 and JAR cell line, 40%, 48%, 53% and 40%, 45%, 49% apoptosis were determined, respectively. With the single application of 0.05 μ M, 0.1 μ M and 0.2 μ M Act-D to the JEG-3 and JAR cell line, 17%, 23%, 36% and 14%, 15%, 24% apoptosis were determined, respectively. Statistically significant comparing with the control group.

Nevertheless, the more important finding of our trial is the effect on apoptosis ratios of MTX, Act-D and ATRA in combined dosages. The apoptosis ratio on JEG-3 and JAR cell lines obtained with the low dosages of the three drug were 54% and 43%, respectively and those ratios were more than the ratios obtained with the 2 μ M dosage of the MTX, which were 40% and statistically significant.

Result: The application of ATRA, MTX and Act-D combination on the JAR and JEG-3, human choriocarcinoma cell line models, is made in both cell lines for the first time in the literature. The obtained synergistic apoptotic data indicated that; the combination of ATRA, MTX and Act-D 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 and the effect in the combination of drugs may be different in vivo systems, therefore the data should be supported initially by animal experiments and then clinical trials.

Key words: ATRA, choriocarcinoma, chemotherapy, cell culture

1. GİRİŞ

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

Histopatolojik olarak komplet ve parsiyal HM, invaziv mol, koryokarsinom, plasental yerleşim bölgesinden gelişen trofoblastik tümörler (PYBGTT) olarak sınıflandırılırlar.

Gestasyonel trofoblastik neoplaziler (GTN) genellikle HM sonrası gelişmesine karşın terapötik veya spontan abortus, ektopik ya da term gebeliği de izleyebilmektedir.

GTN histopatolojisi içerisinde yer alan koryokarsinom, yüksek metastatik potansiyeli olan neoplastik bir durum iken HM, malign transformasyon olasılığı bulunan anormal plasenta yapısına sahiptir (2; 3). Diğer yandan gebelik sonrası gelişen koryokarsinom ve PYBGTT'ler gerçek neoplazmlardır. Günümüzde human koryonik gonadotropinin (hCG) beta (β) subunitinin hassas olarak ölçülebilmesi, tümör belirteci olarak kullanılması ve bu hastalıklarda KT'nin etkin olması nedeniyle GTN'ler hastalığın yaygın olduğu durumlarda dahi tedavi edilebilmektedir. Bir antimetabolit olan Metotreksat (MTX), çocukluk çağı akut lösemilerinde geçici remisyon sağladığı bulunduğu tarih olan 1948'den günümüze klinik kullanımda olan bir ajandır. Klasik olarak folik asit antagonisti olarak bilinen MTX, aktif olarak bölünen hücrelerde dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe ederek folik asitin, folinik asite dönüşümünü engelleyen sitotoksik kemoterapötik ajandır (4; 5). Bu etkisiyle başta çocukluk çağı lösemilenfomaları olmak üzere meme kanseri, osteosarkom, baş ve boyun kanserleri, akciğer kanseri, üroepitelyal kanserler gibi solid organ tümörlerinin tedavisinde kullanılır (6). Son dönemlerde, MTX'in antimetabolit özelliği dışında, antienflamatuar, antiproliferatif, immunosupresif, antipsöriatik etkinlikleri de bulunmuştur (7; 8). Bu etkileri nedeniyle MTX, kanser tedavisi dışında, psöriazis, romatizmal hastalıklar gibi enflamatuar hastalıklar, dermatomyozit, Wegener granülomatozisi, sarkoidoz, 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 (9; 10). MTX'in sitotoksik etkisi, kanser hücreleri için seçici olmadığından kemik iliğindeki hematopoetik hücreler ve barsak mukozasındaki aktif bölünen hücreler gibi proliferasyon hızı yüksek dokuları da etkilemektedir (11). Bu nedenle, MTX'in etkinliği, şiddetli enterokolit ya da intestinal hasar gibi toksik etkileri nedeniyle sıklıkla sınırlanmaktadır, tedavi sürecinde doz azaltımına gidilmekte ya da tedavi yarıda kesilmektedir. MTX'in akut lösemi tedavisinde aralıklı olarak yüksek doz kullanımı ile psöriasis tedavisinde uzun süre düşük doz kullanımının progresif hepatik fibrozis ve siroza kadar ilerleyen karaciğer hasarına neden olabileceği bilinmektedir (12).

A vitamininin antineoplastik etkinlik gösterdiği düşünülmektedir. Epitelyum hücreleri yanında diğer hücrelerin de normal büyümesinde ve farklılaşmasında rol oynadıkları ve kimyasal etkenlere, radyasyona ve virüslere bağlı kanser oluşmasını antioksidan etkileri ile önledikleri gösterilmiştir (13; 14).

A vitamininin retinol türevi olan Retinoik asitin; *All-trans* retinoik asit (ATRA) ve 9-cis retinoik asit (9-cis RA) olmak üzere iki formu vardır (15). Retinoik asit türevleri olan ATRA ve 9-cis RA gen transkripsiyonunun regülatörleri olup hücre proliferasyonunda ve farklılaşmasında önemli roller oynamaktadırlar. Retinoik asitin anjiogenezde de hücre proliferasyonunu ve gen ekspresyonunu düzenleyerek apoptozu indüklemek ve anjiogenezisi inhibe etmek şeklinde etkileri vardır (16; 17).

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

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GTH'larda Epidemiyoloji

GTH insidansı ile ilgili veriler dünyanın değişik bölgelerinde dramatik olarak değişmektedir. Örneğin, Japonya'da molar gebelik insidansı bin gebelikte 2, Avrupa ve Kuzey Amerika'da ise bin gebelikte 0.6 ile 1.1 arasında değişmektedir (18; 19). Etnik, çevresel ve kültürel faktörlerin insidans üzerindeki etkileri araştırılmış ve çevresel ve kültürel faktörlerin, ırksal faktörler kadar önemli olabileceği gösterilmiştir (19). Türkiye'de yapılan çalışmalarda yalnızca hastane verilerinin kullanılması nedeniyle insidans hakkında gerçekçi bir değerlendirme yapmak güçtür. Türkiye'den Özalp ve ark. yaptığı çalışma verilerine göre Türkiye'de HM görülme sıklığı bin doğum için 1.1 ila 12.1, bin gebelik için ise 0.3 ila 18 arasındadır (20). Türkiye'de topluma dayalı olarak yapılan bir başka çalışmada ise insidans bin canlı doğum için 0.8, bin gebelik için ise 0.6 olarak saptanmıştır (21). Çalışmaların tümü referans hastanesi niteliğindeki merkezlerde yapılmıştır. Başka bir geniş kapsamlı çalışma verileri de bölgesel farklılığı göz önüne sermektedir, güneydoğu bölgesinde bulunan Şanlıurfa ülkemizde GTH insidansının 1000 doğumda 12.1 oranıyla en fazla olduğu ildir (22).

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. Üretgenliğin erken ve geç yaşlarında gelişen HM'de malign potansiyel artmaktadır. Türkiye'den yapılan çalışmalarda üretgenliğin erken yaşlarında ve geç yaşlarında görülme sıklığında belirgin farklar olduğu saptanmıştır (23). HM olgularının %0.3-1.6, 21 yaşın altında ve %1.7-23.1'i, 39 yaşın üzerinde olarak saptanmıştır (23). Ayrıca HM nadiren postmenapozal dönemde de saptanabilmektedir (24).

HM öyküsü daha sonra molar gebelik gelişmesi için risk faktörüdür. Bir kez HM geçirmiş bir kadında hastalığın tekrarlama riskinin yaklaşık 10 kat arttığı saptanmıştır (25). Molar gebelik geçirenlerde bir sonraki gebeliğinde mol gelişme olasılığı %1.1 olarak saptanmıştır (26). Ayrıca geçirilen molar gebelik sayısı arttıkça risk de orantılı olarak artmaktadır. Türkiye'den yapılan bir yayında yedi

kez tekrar eden HM olgusu sunulmuştur (27).

Koryokarsinomda ırk, yaş, geçirilmiş HM, oral kontraseptifler, gebelik sayısı, östrojen, kan grubu antijenleri gibi risk faktörleri ileri sürülmüştür. Koryokarsinomda en önemli risk faktörü geçirilmiş molar gebelik öyküsüdür (28). Koryokarsinom olgularının %29-83'ünün anamnezinde HM olduğu saptanmıştır (29). 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 (30). Türkiye'de 6 merkezde 10 yılda 351650 doğum incelenerek yapılan çalışmaya göre tekrar eden mol oranı %1.1 olarak saptanmıştır (26).

Diyet alışkanlıkları da literatürde 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 (31). 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 (32). İtalya ve Amerika'daki vaka kontrollü çalışmalar diyetle yetersiz karoten alımının artmış molar gebelik insidansı ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (33; 34). Ayrıca molar gebelik insidansının yüksek olduğu bölgelerde, A vitamininin eksikliği artmış sıklıktadır. Diyetel faktörler de GTH insidansındaki bölgesel farklılıkları kısmen açıklayabilmektedir.

2.2. GTH'larda Genetik Özellikler

HM üzerinde yapılan sitogenetik çalışmalar sonucunda komplet ve parsiyel mol belirlenmiştir. Komplet molün diploid karyotipi mevcuttur. Yaklaşık %75-85'i 46 XX, kalan kısmı ise 46 XY şeklindedir. Diandrik diploidinin oluşumunda pek çok mekanizma öne sürülmektedir. En çok kabul edilen iki mekanizmadan biri nükleussuz veya boş bir ovumun tek bir haploid sperm ile fekundasyonu, daha sonra bu kromozomların duplike olmasıdır. Sonuçta 46 XX ve tamamen homozigot bir yapı oluşur. Diğer bir mekanizma nükleussuz ya da boş bir ovumun iki haploid sperm ile fekundasyonu ile 46 XX ya da 46 XY

şeklinde bir heterozigot molün ortaya çıkmasıdır. Parsiyel moller genellikle 69 XXX, 69 XXY veya 69 XYY karyotip şekilleri ile triploiddir. Parsiyel molde genoma, bir maternal iki paternal yapının katıldığı gösterilmiştir. Bu durum diandrik triploidi olarak isimlendirilir ve fazla haploid komponent paternal kaynaklıdır (35).

2.3. GTH'larda Patolojik Bulgular ve Etiyopatogenez

Komplet mol makroskopik olarak üzüm salkımına benzemektedir. Çapı 1 mm'den 2 cm'ye kadar değişen düz, şeffaf, avasküler pembe ya da gri hidropik veziküller karakteristiktir. Bu veziküller ince bağ dokusundan oluşan yapılarla birbiriyle ilişkilidirler. Embriyo veya fetus gözlenmez. Plasenta, amniotik kese ve amniotik sıvı tanımlanamaz ve intervillöz saha tipik olarak anormaldir. Ancak bazı olgularda amnion izlenmiştir (36; 37). Mikroskopik değerlendirmede üç önemli ölçüt vardır. Bunlar: trofoblastik proliferasyon, villuslarda hidropik şişme ve avaskülarizasyondur. Ayrıca komplet ve parsiyal mol ayırımında, parsiyal molün immünohistokimyasal olarak p57 ile boyanması da önemli yardımcı tekniklerdendir (38).

Parsiyel molde embriyo veya fetus ve embriyonik membranlar mevcuttur. Histolojik yapı genellikle mozaiktir, yani hidropik villuslarla birlikte hidropik olmayan villuslar da gözlenir. Parsiyel molün diğer bir özelliği ise fetal damarların, bazen de fetal eritrositlerin gözlenmesidir (39).

İnvaziv mol myometriuma invaze olan komplet moldür. Molar doku kolonlar ya da plaklar şeklinde myometriuma ilerler ve kan damarlarını invazyona uğratarak lokal kanamaya neden olur. Bazı olgularda ise metastatik taşınma ile vücudun diğer bölgelerine de molar doku taşınabilir. İnvaziv molün histolojik kriterleri komplet mol ile aynıdır (39).

Koryokarsinomun tipik histolojik görünümü trofoblastik hücrelerin kolonlar halinde myometriuma doğru ilerlemesidir. Villöz yapı gözlenmez ve hücrelerde önemli düzeyde sitolojik atipi bulunur. Hemoraji ve nekroz tümörün belirgin özellikleridir (37).

PYBGTT'ler belirgin olarak intermediet tipte trofoblastlardan oluşan neoplazmlardır. Olguların büyük çoğunluğunda tümör term gebelik sonrası gelişir. Genellikle uterusu sınırlıdır ve hastalığın geç döneminde metastaz yaparlar.

Diğer GTH'lara oranla daha az hCG salgırlar ve relatif olarak human plasental lactogen (hPL) salınımı artmıştır. Bu tümörler gestasyonel trofoblastik tümörler arasında en nadir olanlarıdır, KT'ye dirençlidirler ve olguların diğer GTH'lardan ayrı olarak rapor edilmesi kabul görmektedir (40; 41; 42).

Endotelyal nitrik oksid sentaz ekspresyonun trofoblastik hücrelerin proliferasyonunda öneme sahip olduğu bilinmektedir (43). Serum nitrik oksid seviyesi ve plazma arjinaz seviyesi HM'da yüksek bulunmuştur (44; 45). Ayrıca oksidatif stresin de HM etiopatogenezinde önemli bir rola sahip olduğu yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir (46; 47; 48). Oksidatif stresle beraber artmış Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı da HM'da izlenmektedir (49). Bu çalışmalar da GTH etiopatogenezinde oksidatif stresin önemini göstermektedir.

2.4. GTH'larda Hormonal aktivite

GTH'lara yaklaşımda en etkili belirteç hCG tayinidir (50). Serum veya idrardaki β -hCG miktarı canlı tümör hücrelerinin sayısı ile paralellik göstermektedir. GTH'ların izleminde hCG etkin tümör belirteci olarak rol almaktadır. Hastalığın tedavisi ile değeri düşmekte, rekürrenslerde ise değeri yükselmektedir (51; 52).

hCG heterojen bir moleküldür. Gebelikte ve GTH'larda peptid varyantları serumda ve idrarda saptanabilir (53). Koryokarsinomda üretilen hCG molekülünün gebelikte üretilen hCG molekülünden daha büyük olduğu bilinmektedir (54; 55). hCG'nin yapısal özelliklerini inceleyen çalışmalar koryokarsinomada üretilen hCG'nin daha büyük oligosakkarid yan zincirine sahip olduğunu göstermektedir (56; 57; 58). Koryokarsinomada üretilen hCG normal gebelikte sentezlenen hCG'den daha büyük oligosakkarid yan zincirine sahip olduğundan hiperglikozile hCG olarak adlandırılır, hiperglikozile hCG gelecekteki çalışmalarda kullanılabilecek bir belirteç olabileceğini düşündürmektedir (59).

Tanı sırasında komplet mol olgularının %2-7'sinde klinik olarak belirgin hipertiroidizm saptanmıştır. Molar doku tarafından tirotropin benzeri maddenin sentezi ile hipertiroidizm oluşmaktadır. PYBGTT'lerde hücrelerin büyük kısmının hPL içerdiği gösterilmiştir. Bu nedenle de bu tümörlerin belirlenmesinde hPL'nin yararlı olabileceği bildirilmiştir (60; 61).

2.5. Tedavide Boşaltım Sonrası Profilaktik Kemoterapi

Günümüzde hastaların hCG ile izlenebilmeleri nedeniyle profilaktik KT genellikle uygulanmamaktadır. Profilaktik KT ile nonmetastatik hastalık olasılığı önemli oranda azalmakta ve metastatik hastalık riski ortadan kalkmaktadır. Ayrıca lokal invazyon gösteren tüm olgulara uygulanan bir ek KT kürü sonrasında, tüm hastalarda remisyon izlenmiştir. Bu nedenle, profilaktik KT'nin hem metastazı önlediği, hem de lokal uterin invazyona bağlı insidans ve morbiditeyi düşürdüğü sonucuna ulaşılmıştır (62).

1987-2006 yılları arasında retrospektif analiz ile tespit edilmiş 265 hasta ile yapılan bir çalışmada, profilaktik KT uygulanan yüksek riskli hastalarda, KT almayanlara göre anlamlı bir şekilde daha düşük oranda postmolar neoplazi gelişimi izlenmiştir (63). Bunun yanında HM olgularında %80 spontan remisyon gerçekleştiği için profilaktik KT verilmesi ile olguların %80'i KT'nin yan etkilerine maruz kalmaktadırlar. Diğer bir yaklaşım nonmetastatik ve metastatik hastalık gelişimi yönünden yüksek risk altında olan olgulara tedavinin uygulanmasıdır. Bu yaklaşım özellikle hCG ile izlemin olmadığı veya güvenilir olmadığı durumlarda geçerli olabilir. Yüksek risk kriterleri, yüksek hCG değerleri, aşırı uterin büyüklük, teka lutein kistlerinin varlığı, tekrar eden HM ve yaşı 18'in altında veya 35'in üzerinde olmasıdır (52; 64).

2.6. Boşaltım Sonrası İzlem

Molar gebeliğin boşaltılmasından sonra genelde kabul edilen izlem süresi 12 aydır (52). Üç negatif değer elde edilinceye kadar hCG tayini haftada bir, daha sonra ayda bir bakılmalıdır. Uterusun subinvolyusyonu ve buna eşlik eden anormal uterin kanama persistan hastalık yönünden uyarıcı olmalıdır. Klinik ve fizik muayene bulguları akciğer tutulumunu düşündürüyor ise akciğer grafisi veya tomografi ile değerlendirme yapılmalıdır (65; 66; 67).

2.7. GTH'larda Sınıflama ve Evrelendirme

Günümüzde trofoblastik hastalıklarda histolojik kriterlerin prognozu tayin

edip edemeyeceği tartışması devam etmektedir. Genel olarak kabul gören görüş histolojik kriterlerin prognoz tayininde yetersiz kaldığı şeklindedir. Ayrıca her olguda histolojik tanının mevcut olmaması tedaviyi histolojik ölçütlere göre planlamayı engellemektedir. Bunlarla beraber FIGO ve DSÖ'nün evreleme sistemleri ile birlikte değişik merkezler arasında verilerin nesnel olarak karşılaştırılmasını sağlayabileceği ümit edilmektedir (68).

Tablo 1. DSÖ Histolojik Sınıflama Sistemi

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

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) histolojik sınıflaması Tablo 1'de verilmiştir (69).

Tablo 2. 2000 FIGO Evrelendirmesi

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

GTH'lar için Uluslararası Jinekoloji ve Obstetrik Federasyonu'nun (FIGO) önerdiği evreleme sisteminde hastalığın anatomik lokalizasyonu esas alınmış, ayrıca iki risk faktörü değerlendirmeye eklenmiştir (Tablo 2) (70).

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 3. GTH için DSÖ/FIGO prognostik skora sistemi

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

GTN için anatomik sınıflamanın dışında, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından hazırlanmış olan bir prognostik skora sistemi mevcuttur. Bu sistem ile KT'ye potansiyel direncin öngörülmesi planlanmaktadır (Tablo 3) (70).

Prognostik skor 0–6 ise düşük risk, ≥7 ise yüksek risk kabul edilir. Evre I hastalar genellikle düşük risk skoruna sahip iken, Evre IV hastalar genellikle yüksek risk skoruna sahiptir. DSÖ, esas Evre II ve Evre III hastaların yönetiminin belirlenebilmesi amacı ile bu sistemi üretmiştir (70). GTN'de hangi koşulda tek ajan KT'nin yeterli olabileceğini ve hangi koşullarda multiajan KT'nin gerekli olacağını önceden öngörebilmek için hazırlanmış klinik bir sınıflamadır (70). Koryokarsinomun histolojik tanısı tedaviyi kesinleştirirse de, ilk tedavi seçeneğini değiştirmez. Hastada klinik veya radyolojik olarak ekstrauterin metastaz bulgusu mevcutsa, hasta metastatik GTN kategorisine dahil edilir.

2.8. Gestasyonel Trofoblastik Neoplazilerde Tedavi

GTN'ler HM, term gebelik, düşük ya da ektopik gebelik sonrası gelişebilmektedir. Tedavinin planlanmasında en önemli ölçüt hCG düzeyinin izlenmesidir. HM sonrası KT başlama ölçütlerinden biri histolojik olarak koryokarsinom tanısının konmasıdır. Diğer KT'ye başlama ölçütleri ise hCG izlem sonuçlarına göre belirlenmektedir. Birinci kriter hCG değerinin yükselmesi, ikinci kriter bir ile dört hafta dilimi boyunca hCG değerlerinin plato çizmesi, üçüncü kriter belli bir zaman dilimi sonunda hCG değerinin pozitif olmasıdır ancak süre bazı merkezlere göre 6-8 hafta kabul edilirken bazı merkezler tarafından 6 ay olarak belirlenmiştir. Dördüncü ölçüt 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 (65). Molar olmayan gebeliklerde ise spontan düşük, elektif olarak gebeliğin terminasyonu ya da term gebelik sonrası 3 ile 6 hafta geçtiği halde hCG düzeyi hala yüksek ise koryokarsinom şüphesi vardır. Hastalığın yaygınlığının, mümkünse histopatolojisinin belirlenmesi için tam bir değerlendirme yapılması gerekmektedir. Bu değerlendirmede fizik muayene yapılması, karaciğer, renal ve tiroid fonksiyonlarının ve kan tablosunun tayin edilmesi gerekir. Uterin trofoblastik hastalığın varlığı pelvik muayene, küretaj, pelvik ultrason ve pelvik Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG) ile ortaya konmalıdır. Metastazlar ise akciğer grafisi, karaciğer fonksiyon testleri, karaciğer sintigrafisi, batin ultrasonografisi, beyin BT, beyin omurilik sıvısında hCG tayini ve bazı olgularda abdominal ve pelvik organların selektif anjiyografisi ile ortaya konabilir. Son çalışmalarda BT'nin, karaciğer ve akciğer metastazlarının erken teşhisinde önemli yeri olduğu gösterilmiştir (39; 67).

DSÖ skorlama sistemine göre düşük risk grubuna ve FIGO'ya göre Evre I ve düşük riskli Evre II-III olgularında tedavi tek ajan KT, KT ile birlikte histerektomi ve bazı seçilmiş olgularda KT'nin intraarterial infüzyon olarak verilmesi şeklinde üç grupta toplanabilir. Bu tedavilerden ilki ve muhakkak uygulanması gerekeni KT'dir. Tedavide diğer bir yaklaşım KT'ye ilave olarak histerektomi uygulanmasıdır. Histerektomi ailesini tamamlamış ve çocuk isteği olmayan hastalarda, hastalık sadece uterusu sınırlı iken uygulandığında %100 remisyon sağlamaktadır. KT ve histerektominin birlikte uygulanması aynı zamanda hastanede kalış süresini kısaltmakta ve verilen KT kür sayısını da

düşürmektedir. Histerektominin diğer bir uygulama alanı KT'ye cevap vermeyen olgularda uterus dışındaki hastalığın kontrol altına alındığı olgulardır. Bu tür uygulamaya geç histerektomi uygulaması adı verilmektedir. Gerek KT ile birlikte gerekse geç dönemde yapılan histerektomi KT baskısı altında yapılmaktadır. Bu uygulama ile herhangi bir morbidite artışına neden olmadan tümör embolizasyonu önlenmektedir (61; 71; 72; 73).

KT'ye ilave olarak beyin ve karaciğer metastazlarının tedavisinde radyoterapi (RT) yardımcı tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Beyin metastazlarında RT, KT ile başlamak üzere 10 günde total 2000-3000 rad verilerek uygulanmaktadır. Beyin metastazı olan olgularda beyin ödeminin önlenmesine yönelik hastanın hayatını kurtarmak amacı ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle kraniyotomi ve yüksek doz kortikosteroid uygulanmaktadır. Karaciğer metastazı olan olgularda da, kombine KT ile birlikte 10 günde verilmek üzere total 2000 rad RT uygulanabilmektedir. Bu doz tümörü öldürücü dozun altındadır. Daha yüksek dozlara çıkılmamasının nedeni, karaciğer toleransının olmamasıdır (74).

GTN'lerde tedavi hCG düzeyleri esas alınarak planlanır. hCG düzeyi normal değerlere düştüğünde ve birer hafta aralarla bakılan dört hCG düzeyi normal sınırlarda bulunduğunda remisyon tanısı konur. Bu tanı konduktan sonra 1 veya 2 kür daha ilave KT uygulanır. Remisyon sağlandıktan sonraki takipte 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 uygulandıktan sonra remisyon sağlanan olgularda bir yıl süre etkin kontrasepsiyon sağlanmalıdır. Bu amaçla önerilen kontrasepsiyon oral kontraseptiflerin kullanılmasıdır (75; 76).

2.8.1. Kemoterapi ve Radyoterapi

GTN'de KT tek ajan ya da kombine olarak uygulanır. Tek ajan KT'sinde Aktinomisin-D (Act-D) ve MTX ile, hem metastatik olmayan hem de düşük riskli metastatik GTH'ta yüksek başarı sağlanmaktadır. Her iki ajan için de farklı protokoller mevcuttur (77; 78; 79).

Act-D iki haftada bir 5 gün veya pulsatil olarak verilebilir. MTX da 5 günlük protokol ile veya haftada bir pulsatil olarak verilebilir. MTX'in sistemik

toksitesini istenilen dozda tutabilmek için beraberinde Folinik asit (FA) de verilmelidir (80; 81). MTX-FA tedavisini ile trombositopeni, granülositopeni, mukozit ve hepatotoksisite gelişebilir, yapılan çalışmalarda bu oranlar yaklaşık olarak, sırasıyla %2.9, %5.8, %6.4 ve %10.2 bulunmuştur (82; 83). İlk tedaviden sonra, β -hCG seviyesi sürekli bir düşüş gösterdiği sürece ek KT uygulanmaz ve standart aralıklı ek tek ajan KT protokolü yoktur. Tedaviden sonraki 18 gün içerisinde β -hCG'deki 1 log (%10) düşüş başarılı tedaviyi göstermektedir. β -hCG 3 hafta ardarda plato çizerse ya da yükselme eğilimine girerse, veya ilk tedavinin tamamlanmasından sonraki 18 gün içerisinde 1 log azalma göstermezse ikinci bir KT kürü daha uygulanır (83).

Kombine KT'de ise günümüzde kabul gören kombinasyon; Etoposid, MTX, Act-D, siklofosfamid ve vinkristinden (EMA-CO) oluşmaktadır ve yapılan çalışmalarda bu rejimin, yüksek riskli GTN grubunda %76-94 arasında değişen oranlarda remisyona sağladığı gösterilmiştir (84; 85). Bu nedenle EMA-CO rejimi, metastazı olan ve prognostik skoru yüksek riskli olan hastalarda öncelikli tedavi seçeneğidir (86; 87). 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 (88; 89). Kombine KT'ye, toksisite izin verdiği sürece, 3 kez ardarda normal serum β -hCG görülene kadar devam edilmelidir. Normal değerlere ulaşıldıktan sonra, relaps riskini azaltmak amacıyla iki ek KT kürü uygulanmalıdır (84).

Kemoterapi rezistansı ile ilişkili faktörler (90):

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

Ancak multiajan KT rejimleri ile bulantı, kusma, mukozit, alopesi, nöropati, myelosupresyon, enfeksiyon, karaciğer, böbrek disfonksiyonu, over fonksiyon kaybı, lösemi, meme, kolon gibi ikincil kanser gelişim riski artar (91).

Beyin metastazı olan hastalarda tüm beyin RT uygulanır, 3000 cGY/10 gün

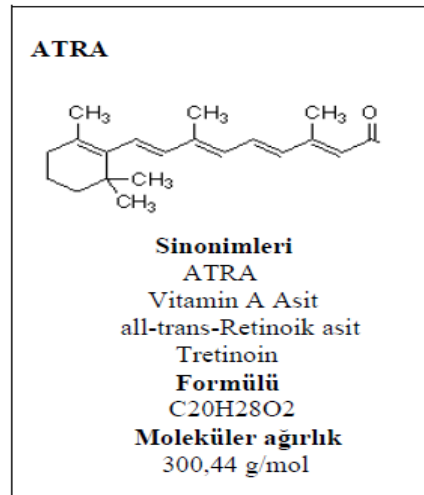
boyunca. Karaciğer metastazlarında da tüm karaciğer RT 2000 cGY/10 gün süresince uygulanır (92).

2.9. Tedavi Sonrası

HM'u takiben, hasta fertilitesine kavuşabilir, infertilite olasılığının artmadığı saptanmıştır (93; 94). Molar gebelik öyküsü bulunan hastaların sonraki gebeliklerinde molün tekrarlama riski %1'dir (95). KT ile tedavi başarısı sağlanmış GTN'yi takiben, hasta normal fertilitesine kavuşabilir (93; 94). Kemoterapötik ajanların potansiyel teratojenik ve mutajenik etkisine rağmen majör ve minör malformasyonların oranı %2.5 ile normal sınırlarda saptanmıştır (96; 97).

2.10. ATRA

ATRA vitamin A'nın karboksilik asit formudur. ATRA ve 9 *cis*-retinoikasit (9 *cis*-RA) nükleer retinoid reseptörlerine bağlanarak gen ekspresyonunu düzenleyen aktif metabolitlerdir (98).



Şekil 1. ATRA'nın formülü ve temel özellikleri

Günlük diyetle direk olarak alınamayan ATRA, özellikle embriyonik

dönemde hücre büyümesi ve gelişimi üzerine etkilidir. Laboratuvarlarda sentetik olarak da sentezlenen ATRA, akne gibi cilt hastalıklarının tedavisinde ve bazı kanser tiplerinde hem tedavi hemde kanserden korunma amaçlı kullanılmaktadır. Ayrıca ATRA güçlü bir antioksidandır ve süperoksit dismutazın etkisini artırarak serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasını engeller ve böylece oksidatif stresi azaltmış olur (99).

Retinoid ailesine mensup olan ATRA bu nedenle aynı zamanda anti-kanser ilaçları arasında yer almaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu ATRA'nın Akut Promiyelosit lösemi (APL) tedavisinde başarılı sonuç verdiği saptanmıştır (100). İn vitro ve in vivo olarak yapılan çalışmalarda retinoidlerin, kemoterapötik ajanlarla kombinasyon uygulamalarında sinerjik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. ATRA ayrıca Kaposi sarkoma, baş boyun skuamoz hücreli karsinoması, over kanseri, mesane kanseri ve nöroblastoma gibi çeşitli tümöral hastalıkların tedavisinde kullanılan KT şemalarına eklenmesi klinik çalışmalarda araştırılmaktadır (101). ATRA ve 13-*cis*-RA'nın in vitro çalışmalarda boyun, göğüs ve kronik miyelojen lösemide, Interferon α ile birlikte uygulanması olumlu sonuçlar vermiştir. Retinoidlerin, Cisplatin, Paklitaksel, Etoposid, Vinoblastin, Gemsitabin gibi kemoterapötiklerle kombinasyonu, tedavilerde sıklıkla kullanılmaktadır (102; 103).

Mikroarray çalışmaları ATRA'nın hücrelerde; farklılaşma, oksidaz aktivasyonu ve adezyon moleküllerinden sorumlu gen bölgelerinin ekspresyonunda artışa neden olduğunu göstermektedir. Bir retinoid olan ATRA, yapılan in vitro çalışmalarda birçok tümör hücre hattında hücre çoğalmasını inhibe etmekte ve hücrelerde farklılaşmaya neden olmaktadır. ATRA, ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanseri tedavisinde de standart kemoterapötikler ile kombine edilerek kullanıldığında olumlu sonuçlar vermektedir (104).

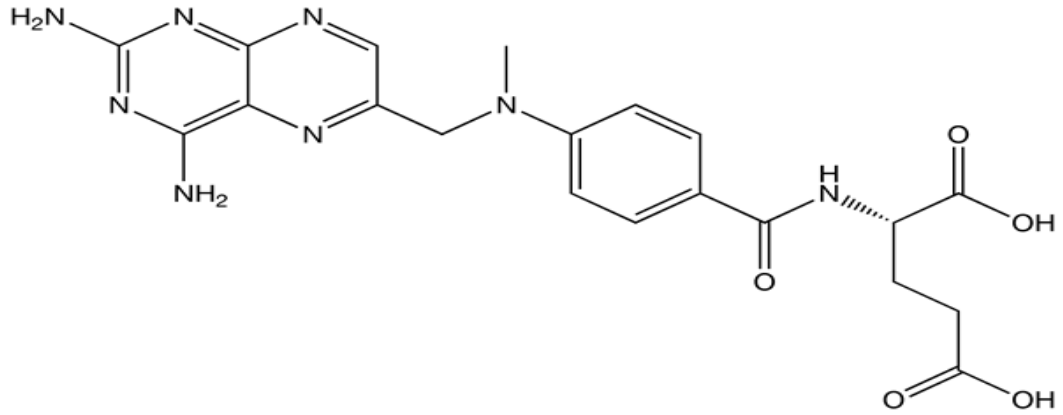
ATRA ve retinoik asit izoformları nöronal farklılaşmayı indüklediklerinden, in vitro nöroblastom farklılaşma modellerinde sıklıkla kullanılmaktadırlar. Fizyolojik konsantrasyonlarda ATRA ile tatbik edilen hücrelerde apoptotik sürece giren hücre sayısında artma meydana geldiği ve hücrelerde genel olarak büyümenin durduğu belirgin bir biçimde görülmektedir. ATRA, c-Jun N-terminal kinaz ve fosfatidilinositol 3-kinaz gibi protein kinazları hızlıca aktive etmektedir. Protein kinaz aktivasyonu sinir hücrelerinde hızlıca

değişime neden olmaktadır. Ayrıca retinoik asit, fosfotaz-1, protein fosfotaz 2A ve protein fosfotaz 2B gibi mitozu aktive edici protein fosfotazları da aktive etmektedir (105).

Vitamin A ve retinoidler servikal hücre büyümesinde de etkindirler. Yapılan klinik çalışmalar, çeşitli retinoidlerin serviks kanser hücrelerinde büyümeyi engellediğini göstermektedir. Human Papilloma Virüsünün neden olduğu serviks kanserinde serumda bulunan ATRA seviyesinde azalma olduğu rapor edilmiştir (101).

2.11. MTX

Bir folik asit antagonisti olarak bilinen MTX, kimyasal olarak folik asidin 4- amino-N¹⁰-metil analogudur (106).



Şekil 2. MTX'in kimyasal yapısı

MTX' in primer hedefi dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimidir. 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, 1948 yılında aminopterinin kullanıma girmesinden beri, çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde uzun süreli ve etkinliği net olarak ortaya konan bir role sahiptir. 1960' lardan sonra ise, aminopterin oranla toksisitesi daha belirlenebilir olan MTX, çocukluk çağı Akut lenfoblastik lösemi ve non-Hodging lenfoma tedavisinde kullanılmıştır (108).

Burkitt ve diğer non-Hodging lenfomaların kombinasyon tedavisinde yararlı etkileri olan MTX, ayrıca göğüs, baş- boyun, over ve mesane kanserinde kullanılan bir ajandır. Lökoverin kurtarma tedavisi ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX, osteosarkomun adjuvan tedavisinde kullanılan standart protokolün bir parçasıdır (109).

Koryokarsinomada ya da ilişkili trofoblastik tümörlerde düşük doz MTX tedavisi, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma yaparak, kaspaz-9 enzimini aktive ederek, Bax/Bcl-2 gen ekspresyonunda yukarı regülasyon yaparak hücrelerde apoptozu indüklediği gösterilmiştir (110).

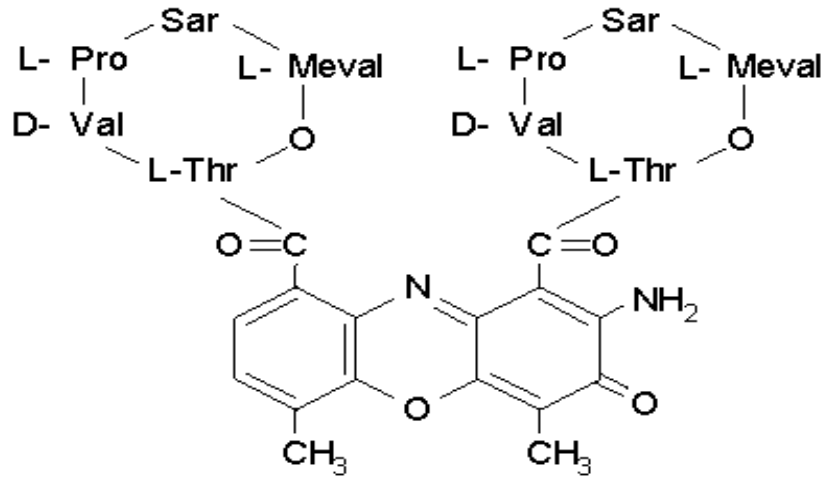
MTX, folat metabolizmasını antagonize ederek antineoplastik özellik gösterirken, kanser hücreleri yanında hızlı bölünen hücrelerde de nükleik asitlerin yapımını engeller (111). Sonuçta, antifolat tedavinin primer toksisitesi ve yaygın etkileri, kemik iliği, cilt ve intestinal epitelyum hücreleri üzerinedir. 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 (112). Yan etkiler genellikle iki hafta içinde geri döner, ancak renal fonksiyonu bozulmuş hastalarda, ilaç atılımındaki azalmaya bağlı olarak myelosupresyon uzayabilir. Bu yan etkilerin yanında; alopesi, dermatit, interstisyel pnömoni, nefrotoksisite, hepatotoksisite, oogenez/spermatogenezde defektler, abort ve teratojenite gibi yan etkiler de izlenebilir (113).

Lökoverin eklenmiş, 1000 mg/m² ve üzeri MTX uygulaması, yüksek doz MTX olarak tanımlanır. Lökoverinle birlikte uygulanan yüksek doz MTX, hastaların çoğu tarafından iyi tolere edilse de, MTX ve metabolitlerinin renal tübüllerde birikmesi ile potansiyel olarak yaşamı tehdit edici olabilen nefrotoksisite gelişebilir. Asidik idrarda presipite olan MTX, obstrüktif üropati nedeniyle oligo-anürik böbrek hasarı oluşturabilir. Yüksek doz MTX'a bağlı gelişen nefrotoksisite, 1970'li yıllarda ilaca bağlı morbidite ve mortalitenin primer

nedenini oluşturmaktaydı (114).

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).

2.13. Act-D



Şekil 3. Act-D'nin kimyasal yapısı (C₆₂H₈₆N₁₂O₁₆)

Act-D bir transkripsiyon inhibitörüdür (Şekil 3) (115). Antineoplastik etkisini DNA'nın deoksiguanozin kolu ile dayanıklı bir bileşik oluşturarak spesifik olmayan bir yoldan gerçekleştirir. Böylece Act-D, DNA'ya bağlanır, RNA ve protein sentezini inhibe ederek hücre çoğalmasını baskılar (116; 117). Act-D antineoplastik etkisinden dolayı Wilms tümörü, Ewing sarkoma, GTH, rabdomyosarkoma gibi bazı kanser türlerinin tedavisinde "Dactinomycin" adı altında kullanılmaktadır (118; 119; 120; 121). Ancak, bu antibiyotiğin kemik iliğindeki kan hücrelerinin üretimini baskılamak ve sindirim sistemi toksisitesine neden olmak gibi ciddi yan etkilere sahip olduğundan, klinikteki kullanım alanı

kanser KT'si ile sınırlı kalmıştır.

Act-D'nin çeşitli hücrelerde apoptozu uyardığı *in vitro* ve *in vivo* deneylerle ortaya konmuştur (122; 123). Sistemik etkili bir transkripsiyon inhibitörü olan Act-D, apoptozu uyararak amacıyla TNF- α ile birlikte *in vitro* kullanılmaktadır. Act-D uygulaması, protein sentezinin inhibisyonu sayesinde hücrelerin TNF'nin sitotoksik etkisine hassasiyetini artırır ve konsantrasyona bağlı olarak hücre ölümünü, özellikle de apoptozu uyarır. Act-D gibi transkripsiyonu durduran bir etken varlığında koruyucu proteinlerin sentezi durur ve TNF- α ile uyarılan apoptotik sinyal yolu faaliyete geçirilir (123; 124).

2.14. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Pratikte hücre kültürü terimi, çok hücreli ökaryotlardan özellikle hayvan hücrelerinden kaynaklanan hücrelerin kültürlenmesi için kullanılmaktadır. Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırmaların önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Hücre kültüründe, hücrelerin gelişmesi ve büyümesi için gerekli teknikler 20. yüzyıl boyunca geliştirilmiştir. 1885'te Wilhelm Roux bir tavuk embriyosunun nöral plağının bir kısmını ayırmış ve ılık bir tuzlu su çözeltisinde dokuyu birkaç gün yaşatarak doku kültürünün temellerini de atmıştır (125). 60 yıl içinde, 1952'de George Gey ve arkadaşları tarafından ilk insan kanser hücre hattı olan HeLa'nın ekilmesinde sonra, binlerce yeni hücre kanser hattı geliştirilmiştir (126).

Hücre kültürünün kullanım alanlarını; kanser araştırmaları, sitogenetik, biyokimyasal, moleküler biyolojik çalışmalarda, çeşitli hastalıkların tanı ve araştırılmasında, doku ve deri mühendisliğinde, aşı üretimi, kök hücre çalışmalarında, tüp bebek ve kısırlık tedavilerinde, farmasötik proteinlerin üretiminde, hormon üretiminde, bitki ve hayvan ıslahı ve geliştirilmesi çalışmaları oluşturmaktadır (127; 128).

Son yıllarda hayvan hakları savunucularının kamuoyunda oluşturdukları baskı nedeniyle hayvan haklarına geçmişe nazaran daha çok önem verildiği düşünülürse hücre kültürü çalışmaları birçok hayvan çalışmasını gereksiz kılacak bir araştırma türüdür. Hayvan hakları savunucuları, hayvan deneylerinin

birçoğunun gereksiz yapıldığı yönündeki düşüncelerini, bu deneylerden çıkan sonuçların güvenilemeyecek kadar değişken olmasına ya da hayvanların acı çektirilerek öldürülmelerine değmeyecek kadar önemsiz oldukları savlarına dayandırmaktadırlar (127).

2.14.1 Başlıca Hücre Kültür Tipleri

2.14.1.1 Primer Kültürler

Primer hücre kültürleri, orijinal dokudan yeni ayrılan ve ilk olarak kültür şartlarında bulunan hücreleri içerir. Bu hücreler, genotipik ve fenotipik yönden orijinal doku hücresi ile aynı özellikleri içerir ve dokunun fizyolojik durumunun ifadesidir. Normal hayvan dokusundan doğrudan elde edilir ve ayrı bir ortamda ek hücre süspansiyonunda ayrışana kadar enzimatik sindirime tabi tutulurlar. Bu tip kültürler heterojendir ve fibroblastlar tarafından etkinleştirilirler. Bu kültürlerin oluşturulması emek gerektirir ve kısıtlı zaman içinde sadece in vitro koşullarda saklanabilirler. Bu elde edilen hücreler, in vivo ortamdaki hücrelerden farklı karakteristikler göstermektedir. Primer hücre kültürleri, üretim aşamasındaki zorluklar, hassas hücreler olmaları nedeniyle çalışma esnasında ortaya çıkabilecek problemler ve bunların kontrolünün son derece güç olmasına karşın, orijinal fizyolojik durumun ifadesi olmaları nedeniyle pek çok çalışmada örnek sistem oluşturmaktadırlar (129).

2.14.1.2 Sürekli Kültürler

Sürekli kültürler, hedef kültüre seri olarak dönüştürülen ya da kısıtlı bölünme sayısına izin verilen, tek hücre tipinden oluşmaktadır. Kısıtlı ömürlü hücre toplulukları diploiddir ve kısmen farklılaşmayı da barındırabilirler. Gerçekte bu tip hücre toplulukları, 30 ya da daha fazla bölünme tekrarı sonrasında da, farklı ve uzun süre saklanma yöntemlerini içeren bir sistem ile saklanmalıdır (130).

Sürekli hücre toplulukları, spontan gelişim ile çoğalabilirler ve kontamine hücre oluşturma olasılıkları da vardır. Değiştirilmiş hücreler sınırsız

bölünebilirliğe sahiptirler, ancak bunun yanında in vivo karakteristiklerinin çok azını göstermektedirler (130).

2.15. 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 (131).

Kanser tedavisinde yeni ajanların geliştirilmesinde kullanılan yöntemler bazen zaman ve malzeme sarfından daha ileriye gitmemiştir. Literatür taramasıyla hücre hatlarında daha önce denenmemiş ajanların in vitro olarak denenmeye başlanması klinik denemelere geçildiğinde başarısız sonuçlar alınmasına neden olmuştur. Tümör biyolojisi ve moleküler mekanizmaların anlaşılmasıyla birlikte bazı ölçütler göz önüne alınmaya başlanmıştır (132).

Hücre hatları kullanılarak yapılan sitotoksosite çalışmalarında ilaç bileşenlerinin hücre içerisine ne kadarının hangi koşullarda alınacağını ve de hücrel çevrede nasıl hareket edeceklerinin taraması yapılabilmektedir. Böylece bileşenin hedef proteine bağlanmasını tetikleyen ya da engelleyen mekanizmalar gözlemlenebilmekte ve buna alternatif seçeneklerle çalışmaya yön verilebilmektedir. Yüksek duyarlılık gösterilen sitotoksik bir ajanın neden olabileceği maksimum ve minimum zararlar bu çalışmalar sayesinde tanımlanabilmektedir (133).

Sitotoksosite taramaları farklı türlere ait hücreler üzerinde ya da aynı türe ait farklı hücre hatları kullanılarak uygulanabilmektedir. Böylece temel hedefe kadar birçok sonuç in vitro olarak toksisite bakımından karşılaştırılarak incelenmiş olmaktadır (131). Hücre canlılığı ve proliferasyonunun saptanmasında kullanılmak üzere geliştirilmiş birkaç yöntem vardır. Bu yöntemlerin uygulanması esnasında kullanılmak üzere tasarlanmış 96 kuyucuklu plakalar birçok örneğin aynı anda ve hızlıca analizleri açısından çok kullanışlıdır. ELISA plate okuyucu ya

da mikrotiterplate kullanılarak örneklerin kolorimetrik ya da ışımaya tayinleri yapılabilmektedir. Sitotoksitenin belirlenmesi, hücre ölümü ya da proliferasyonu gibi farklı parametrelerde ölçüm yapılarak saptanabilmektedir (134).

2.16. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K.Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve hücre ölümünü ifade eder (135; 136). Teorik olarak apoptoz, hücrenin dışarıdan çeşitli travmalara maruz kalmasıyla ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma yoluyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve KT'yi içeren travmatik ajanlar yoluyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir (136).

Apoptoz sinyali alan bir hücrenin kromatini ve sitoplazması yoğunlaşmaya başlar, hücrenin boyutları küçülmeye başlar. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik olarak adlandırılan daha küçük parçalara bölünür. Apoptotik cisimcikler; yüzeylerinde yeni sinyal verici yapılar ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yakınlarındaki hücre tarafından, ki genelde bunlar histiyositlerdir, fagosite edilerek ortadan kaldırılır (135).

2.17. Flowsitometri

Flowsitometri (FCM), kantitatif bir apoptoz belirleme yöntemidir. İlk kez 1960 yılında patolog Herbert Derman ve bilgisayar uzmanı olan John Hoffer tarafından sitoflorografi cihazı olarak tasarlandı ve Caspersson ve ark.'nın esaslarını belirlediği hücre nükleusunun floresan boyanma özellikleri göz önüne alınarak geliştirildi (137). Kamenstsky 1963 yılında sistemi modifiye ederek, hareketsiz hücrelerin analizi yerine hareketli ortamda hücre analizi yapabilmeyi sağlayarak FCM'yi keşfetmiş oldu (138; 139). FCM lam üzerindeki hücrelerin optik özelliklerini tarayan sitofotometri ve imaj sitometrinin tersine, çok hızlı ve

birden fazla değişkenin analizini yapma olanağı vermesi avantajlarındandır. Bu nedenle FCM ile yaklaşık 100 kat kadar fazla sayıda hücrenin incelenmesi de sağlanmış olur. Temel olarak FCM floresansı ölçüp kaydetme esasına dayanır. Uygun bir florokomla boyanmış ve 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 hücresel elemanların floresan boyalarını maksimum emilimini sağlar. İnceleme genelde saniyede 100-200 hücre hızıyla yapılır. Floresan ölçümler bilgisayarın belleğinde saklanır. Floresans ile birlikte hücre büyüklüğü de ölçülebilir (140; 141).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

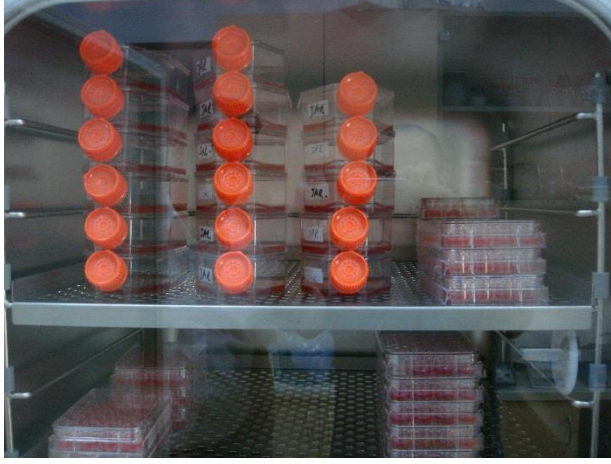
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 ile 2.0 g/l NaHCO₃, 500 ml) (İnterlab), FCS ısı ile inaktif 100ml (Dateks), L-Glutamine (200 mM) 100 ml (İnterlab), Penisilin-streptomisin karışım 100 ml (Dateks), Tripsin-EDTA karışımı 100ml (İnterlab), DMSO 50 ml (Dateks), ATRA (Sigma) , MTX (Sigma), Act-D (Sigma).

3.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

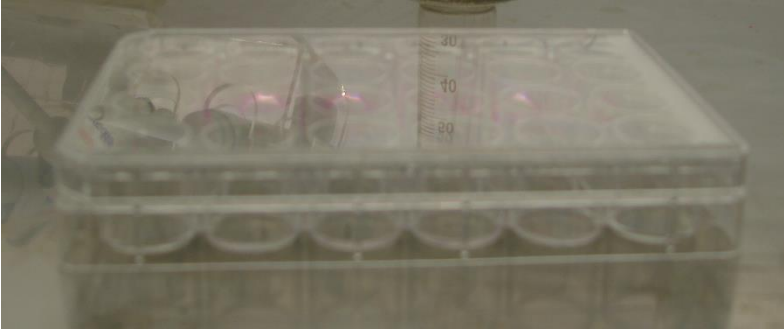
24 kuyucuklu hücre kültür plağı 20 adet (TC-Plate 24 well sterile with lid ind. Packed) (İnterlab), 12 kuyucuklu hücre kültür plağı 20 adet (TC-Plate 12 well sterile with Lid Ind. Packed) (İnterlab), Apopitoz kiti (200 test) (Beckman Coulter). DXI 600 cihazında (Beckman Coulter, CA, USA), Flowsitometri (Beckman Coulter FC 500).

25 cm²'lik ve 75 cm²'lik flasklar, 12 vv3 24 kuyucuklu plaklar, steril polipropilen santrifüj tüpleri (15 ve 50 ml hacimlerinde), steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Thoma lamı, ependorf tüp.

Şekil 4. JAR ve JEG-3 hücre kültürlerini içeren flasklar ve hücre kültür plakları



Şekil 5. 24 kuyucuklu hücre kültür plağı



Şekil 6. Flowsitometri



3.3. Kullanılan Aletler

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

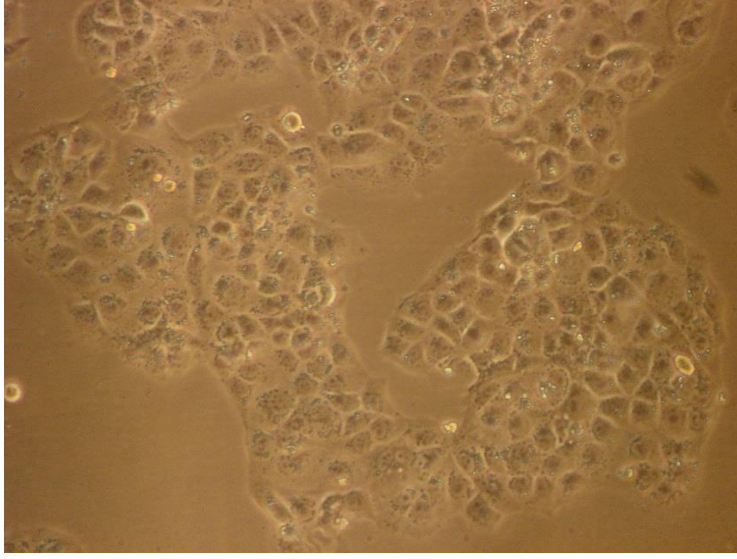
Şekil 7. Nüve CO² inkübatörü



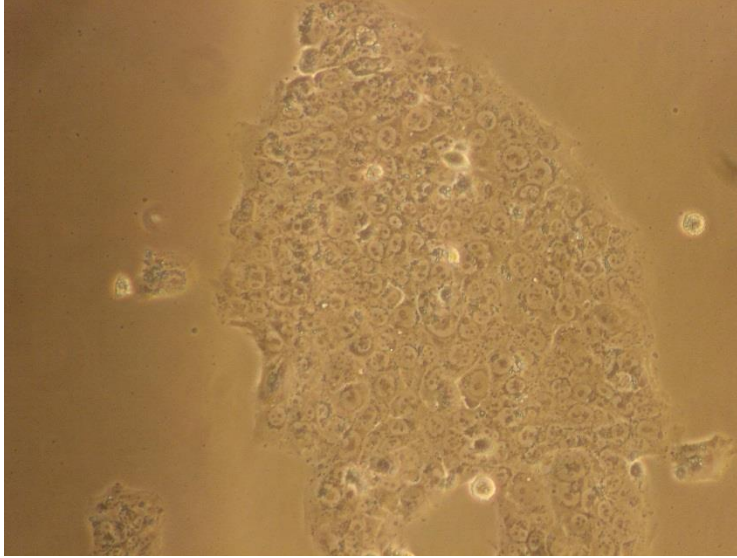
3.4. JAR ve JEG-3 Hücre Kültürleri

JAR ve JEG-3 hücreleri üniversitemizin 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, RMPI-1640 (İnterlab), Penicilin-Streptomycin ve L-glutamin içeren besiyerinin bulunduğu 75 cm²'lik flasklarda %95'lik hava, %5'lik CO² ortamı ve %98 nem ortamında, 37⁰C'deki Nüve CO² inkübatöründe kültüre edilmiştir. Hücrelerin flask tabanını doldurmasından sonra, tripsin EDTA solusyonu 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 1x10⁵ hücre düşecek şekilde 12 ve 24 kuyucuklu plaklara aktarılmıştır. 2 gün inkübasyondan sonra besi ortamı tazelenerek ilaç dozları hücrelerin üzerine eklenmiştir.

Şekil 8. JAR hücre kültürü mikroskopik görünümü



Şekil 9. JEG-3 hücre kültürü mikroskopik görünümü



3.5. Test Maddelerinin Dozlarının Hazırlanması

3.5.1. ATRA dozunun hazırlanması

ATRA (Sigma) Dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülerek 0.1, 1 ve 10 μM 'lık 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 μM 'lık dozlar halinde hazırlanmıştır. En yüksek konsantrasyonda DMSO oranı %1'den çok daha az olacak şekilde RPMI 1640 ile dilüsyon yapılmıştır.

3.5.3. Act-D dozunun hazırlanması

Act-D (Sigma) DMSO içerisinde çözülerek 0.05, 0.1 ve 0.2 μM 'lık 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^2 'lik flasklarda, yetiştirilmiş ve %95 hava ve %5 CO_2 'li gaz ortamında ve 37⁰ C'deki CO_2 inkübatöründe kültüre edilmiştir.

3.6.2. Kemoterapötiklerin testler için hazırlanması ve β -HCG ölçümü

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

ATRA için çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. ATRA'nın belirlenen dozları hazırlanmıştır. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde final konsantrasyonlarının; 0.1 μ M, 1 μ M ve 10 μ M olması sağlanmıştır.

Act-D için belirlenen dozlar hazırlanmıştır. Çözücü madde olarak DMSO kullanılmıştır. DMSO oranı %1'i geçmeyecek şekilde final konsantrasyonları; 0.05, 0.1 ve 0.2 μ M olması sağlanarak hazırlanmıştır.

ATRA ve MTX kombinasyonunda; ATRA'nın 0.1 μ M, 1 μ M ve 10 μ M dozları ile MTX'in 2, 4 ve 8 μ M'lık dozu kullanılmıştır. Maddeler hücrelere aynı anda verilmiştir.

ATRA ve Act-D kombinasyonunda; ATRA'nın 0.1 μ M, 1 μ M ve 10 μ M dozları ile Act-D'nin 0.05, 0.1 ve 0.2 μ M dozları kullanılmıştır. Maddeler hücrelere aynı anda verilmiştir.

ATRA ve MTX ve Act-D kombinasyonunda ATRA'nın 0.1 μ M, 1 μ M ve 10 μ M; MTX'in 2 μ M'lık dozu ve Act-D'nin 0.05 μ M, 0.1 ve 0.2 μ M'lık dozları kombine edilmiştir. Maddeler hücrelere aynı anda verilmiştir. İlaç uygulamasını izleyen 72. saatte hücreler tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırılıp, apopitoz çalışmasına alınmıştır. Sadece bir set için tripsin öncesi süpernatant toplanıp, β -hCG ölçümü için derin dondurucuda saklanmıştır. İmmünoenzimatik yöntemle Total β -HCG düzeyleri DXI 600 cihazında (Beckman Coulter, CA, USA) çalışılmıştır.

3.6.3. Annexin V yöntemi ile apopitoz tespiti ve istatistiksel analiz

Fosfatidilserin (PS) plazma membranının iç kısmına asimetric olarak yayılmış halde bulunmaktadır. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipitlerinden biri olan PS bulunmaktadır. Eğer hücre apopitoza giderse normalde iç kısımda yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apopitotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir.

Apopitoz indüksiyonunu takiben PS'nin açığa çıkışı, Ca²⁺ bağımlı olarak PS'ye yüksek bir affiniteyle bağlanan bir protein olan rekombinant Aneksin V kullanılarak kolaylıkla belirlenebilir (142).

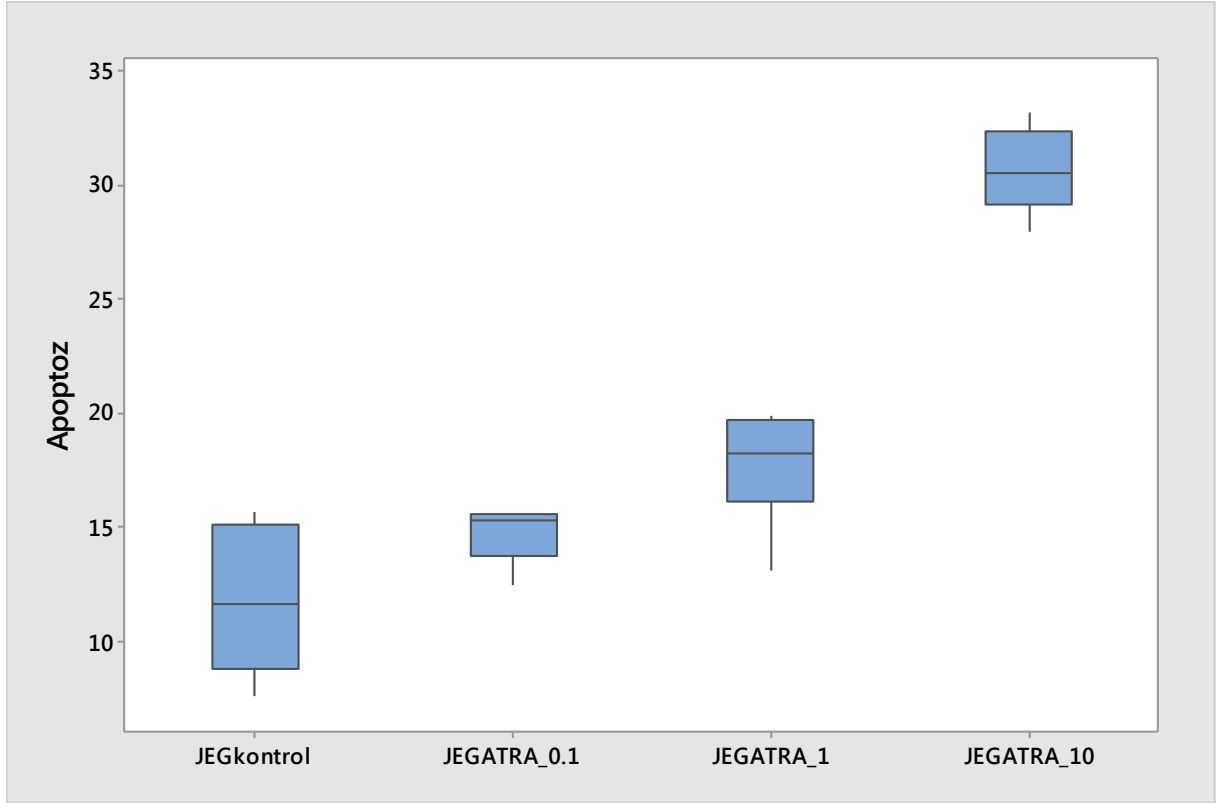
Aneksin V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan PS'ye bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apopitotik hücre görünür hale getirilebilir (143). FITC-Aneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. 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 (FITCPI-), erken apopitotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apopitotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) birbirinden ayırt edilmesine izin verir (144).

Hücrelerin, deney setlerinde her test maddesi dozu için ekildiği deneyler, birbirinden bağımsız olarak 4 kez tekrarlanmıştır. Apopitoz sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesinde SPSS 19.0 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı ve Minitab 17 istatistik programı kullanıldı. Sürekli değişkenlere ait tanımlayıcı istatistiksel z değerleriyle verildi, grup içi karşılaştırmalarda Wilcoxon testi kullanıldı. Çalışmadaki tüm istatistiksel analizlerde p değeri 0.05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

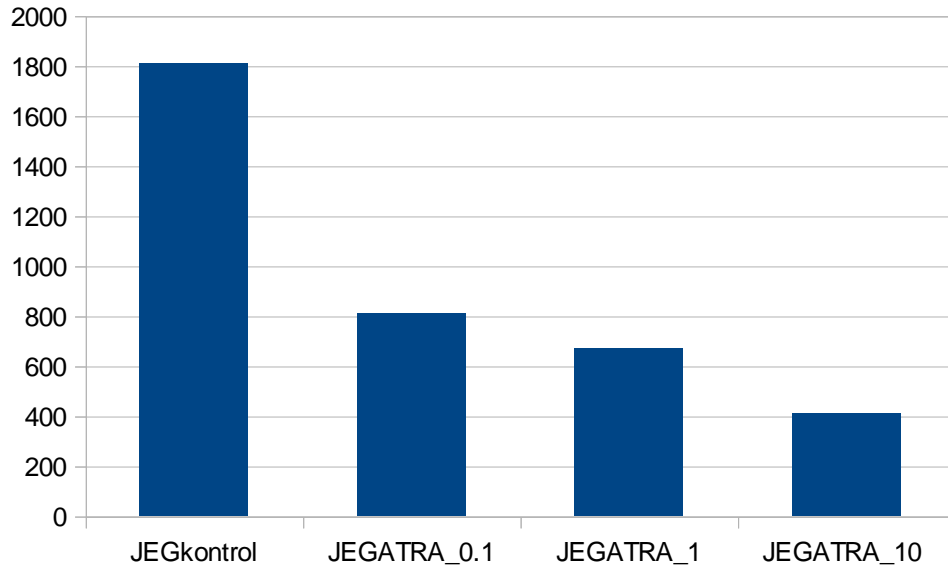
4.1. ATRA'nın JEG-3 hücre hattı üzerine apoptotik etkileri

Şekil 10. ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi



Tablo 4. ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JEG-3	ATRA 0.1 Kontrol	ATRA 1 ATRA 0.1	ATRA 10 ATRA 1
Z	-1,992 (a)	-2,226 (a)	-2,201 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,046	,026	,028



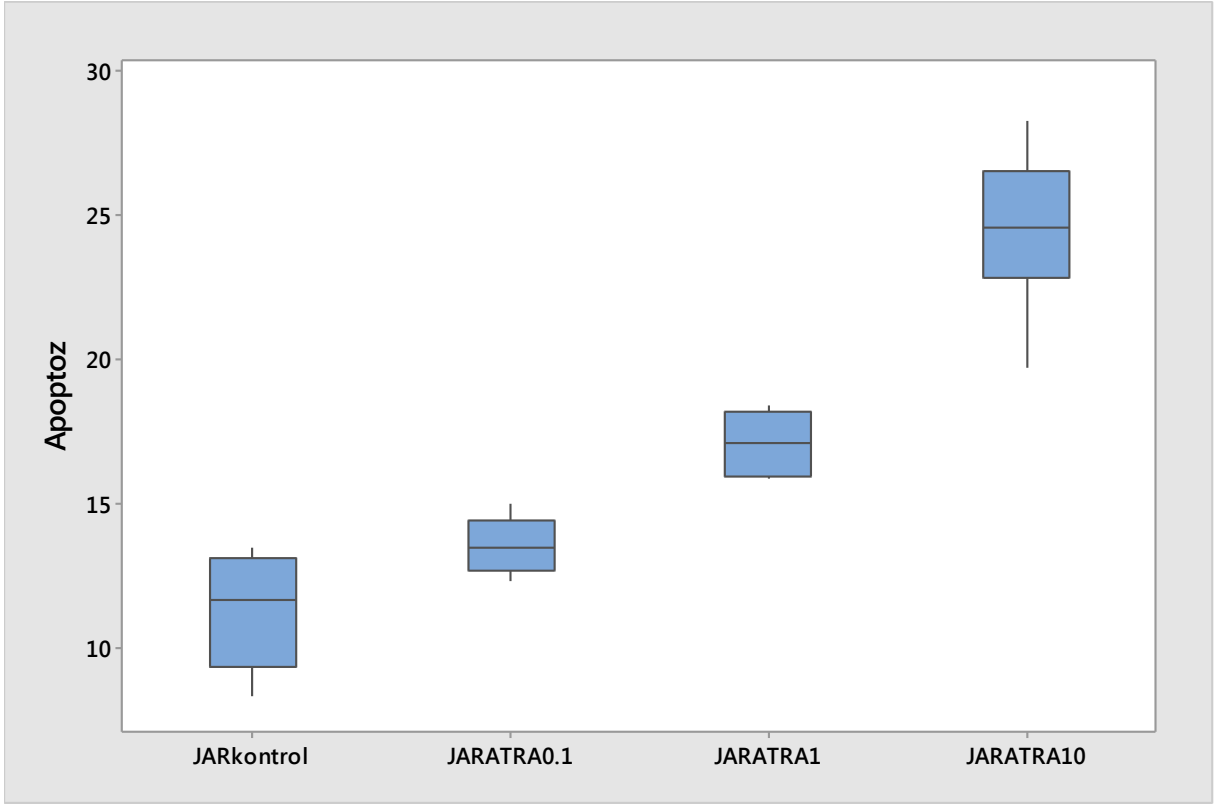
Şekil 11. ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

Tablo 5. ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

	β-hCG
JEG-3 Kontrol	1811
JEG-3 ATRA 0.1 μM	810
JEG-3 ATRA 1 μM	671
JEG-3 ATRA 10 μM	411

24 saat muamele sonunda ATRA'nın 0.1 μM'lık doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %15'tir. 1 μM'lık muamele sonucu hücre canlılığı %19, 10 μM'lık muamelesi sonucu ise %30'dur. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır. β-hCG düzeylerinde de ATRA'nın dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

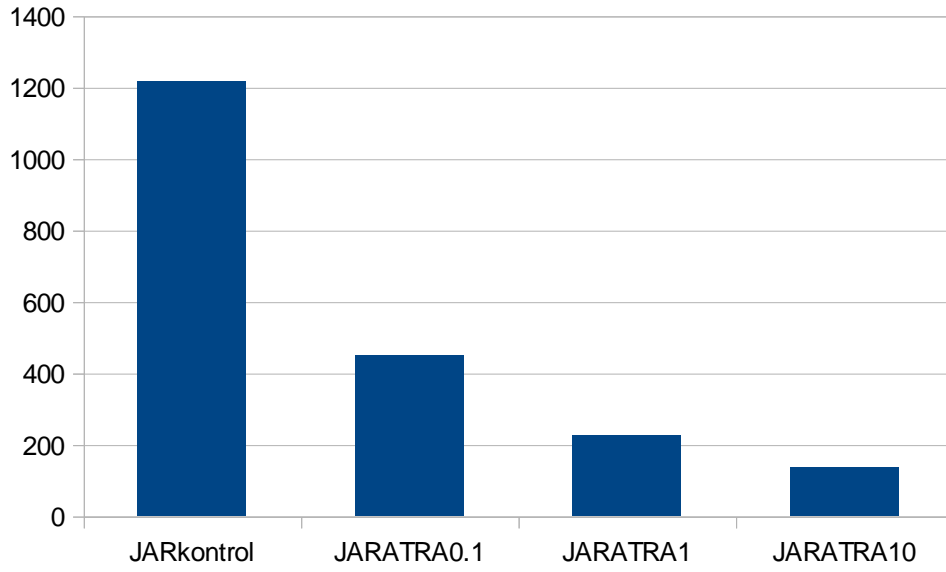
4.2. ATRA'nın JAR hücre hattı üzerine apopitotik etkileri



Şekil 12. ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 6. ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JAR	ATRA 0.1 Kontrol	ATRA 1 ATRA 0.1	ATRA 10 ATRA 1
Z	-2,201 (a)	-2,201 (a)	-2,201 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028	,028	,028



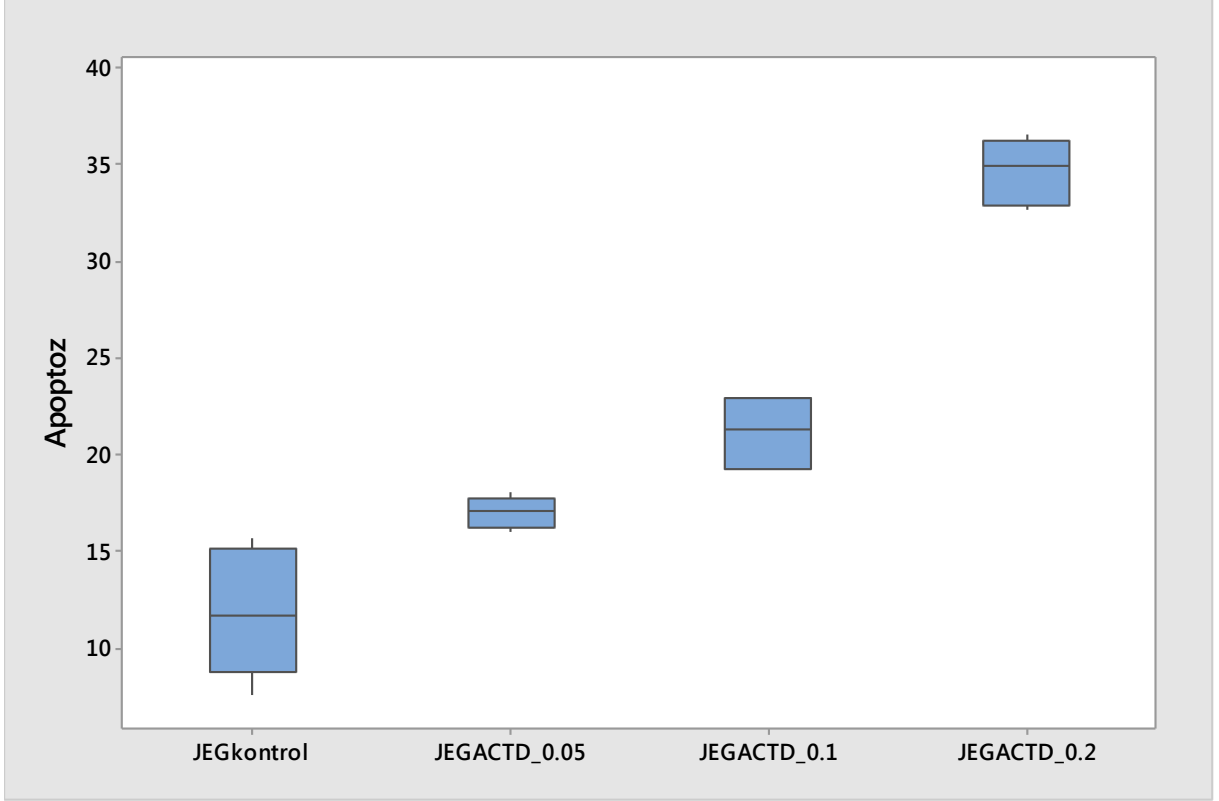
Şekil 13. ATRA'nın JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

Tablo 7. ATRA'nın JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

	β-hCG
JAR Kontrol	1217
JAR ATRA 0.1 μM	450
JAR ATRA 1 μM	225
JAR ATRA 10 μM	136

24 saat muamele sonunda ATRA'nın 0.1 μM'lık doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apopitoz oranı %14'tür. 1 μM'lık muamele sonucu hücre canlılığı %17, 10 μM'lık muamelesi sonucu ise %24'tür. İstatistiksel olarak apopitoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır. β-hCG düzeylerinde de ATRA'nın dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

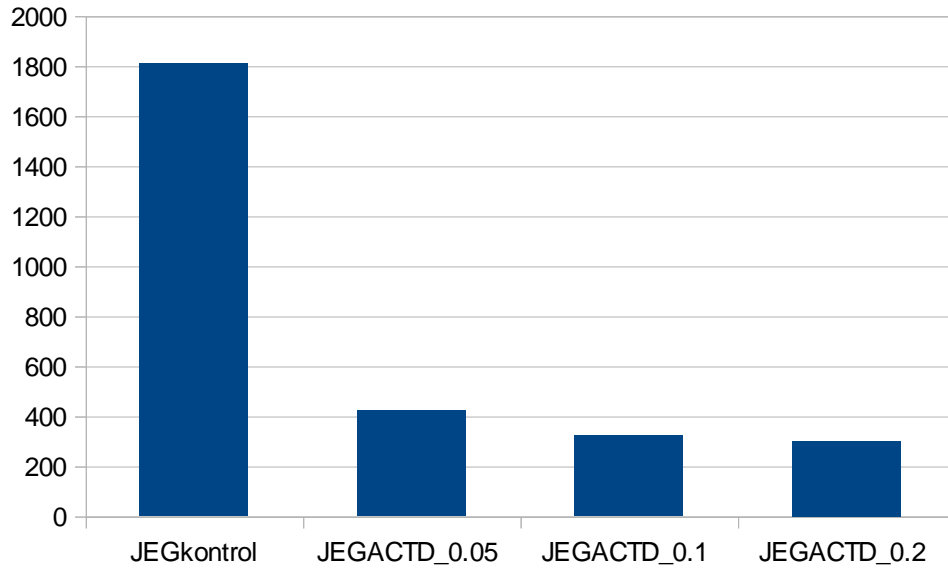
4.3. Act-D'nin JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri



Şekil 14. Act-D'nin JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 8. Act-D'nin JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JEG-3	Act-D 0.05 Kontrol	Act-D 0.1 Act-D 0.05	Act-D 0.2 Act-D 0.1
Z	-2,201 (a)	-2,201 (a)	-2,201 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028	,028	,028



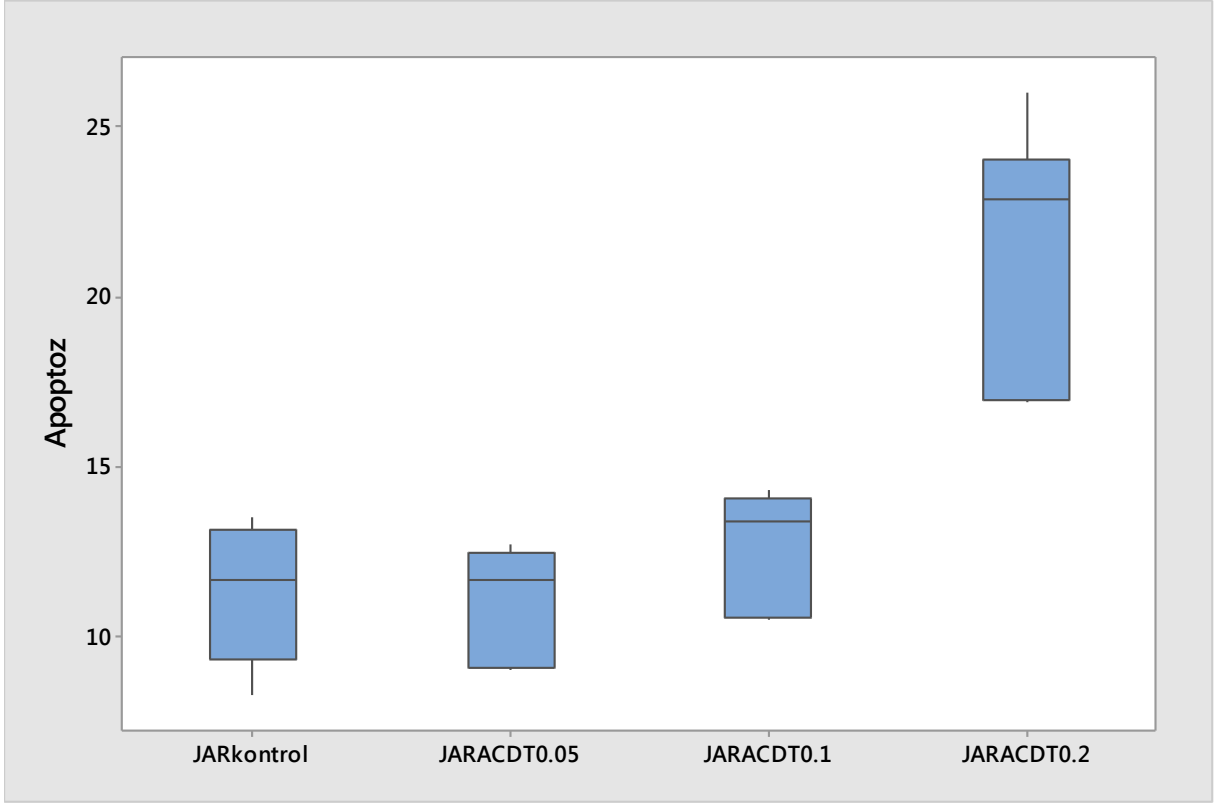
Şekil 15. Act-D'nin JEG-3 hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi

Tablo 9. Act-D'nin JEG-3 hücre hattında β -hCG düzeylerine olan etkisi

	β -hCG
JEG-3 Kontrol	1811
JEG-3 Act-D 0.05 μ M	421
JEG-3 Act-D 0.1 μ M	322
JEG-3 Act-D 0.2 μ M	300

24 saat muamele sonunda Act-D'nin 0.05 μ M'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %17'dir. 0.1 μ M'lik muamele sonucu apoptoz oranı %23, 0.2 μ M'lik muamelesi sonucu ise %36'dır. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır. β -hCG düzeylerinde de Act-D'nin dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

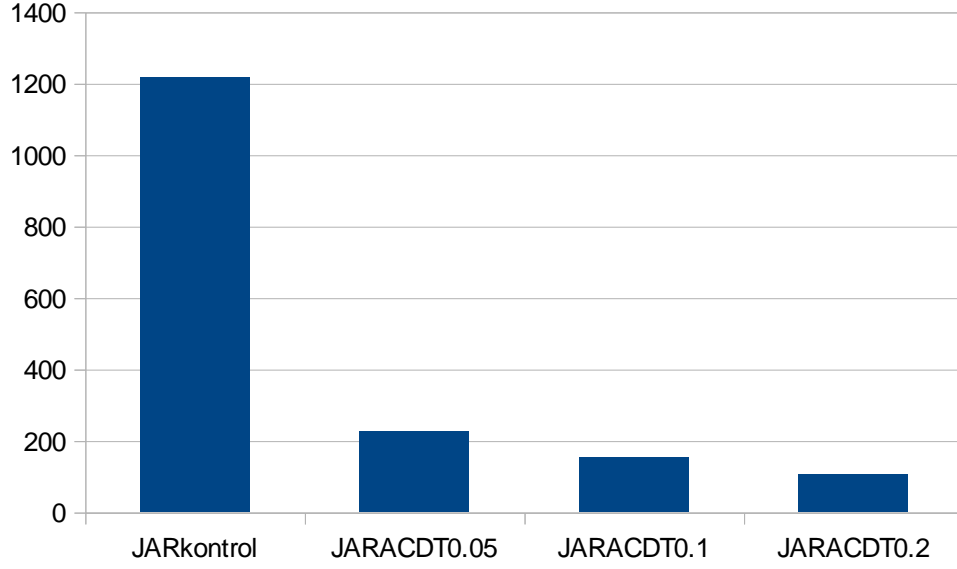
4.4. Act-D'nin JAR hücre hattı üzerine apoptotik etkileri



Şekil 16. Act-D'nin JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 10. Act-D'nin JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JAR	Act-D 0.05 Kontrol	Act-D 0.1 Act-D 0.05	Act-D 0.2 Act-D 0.1
Z	-,105 (a)	-2,207 (a)	-2,207 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,917	,027	,027



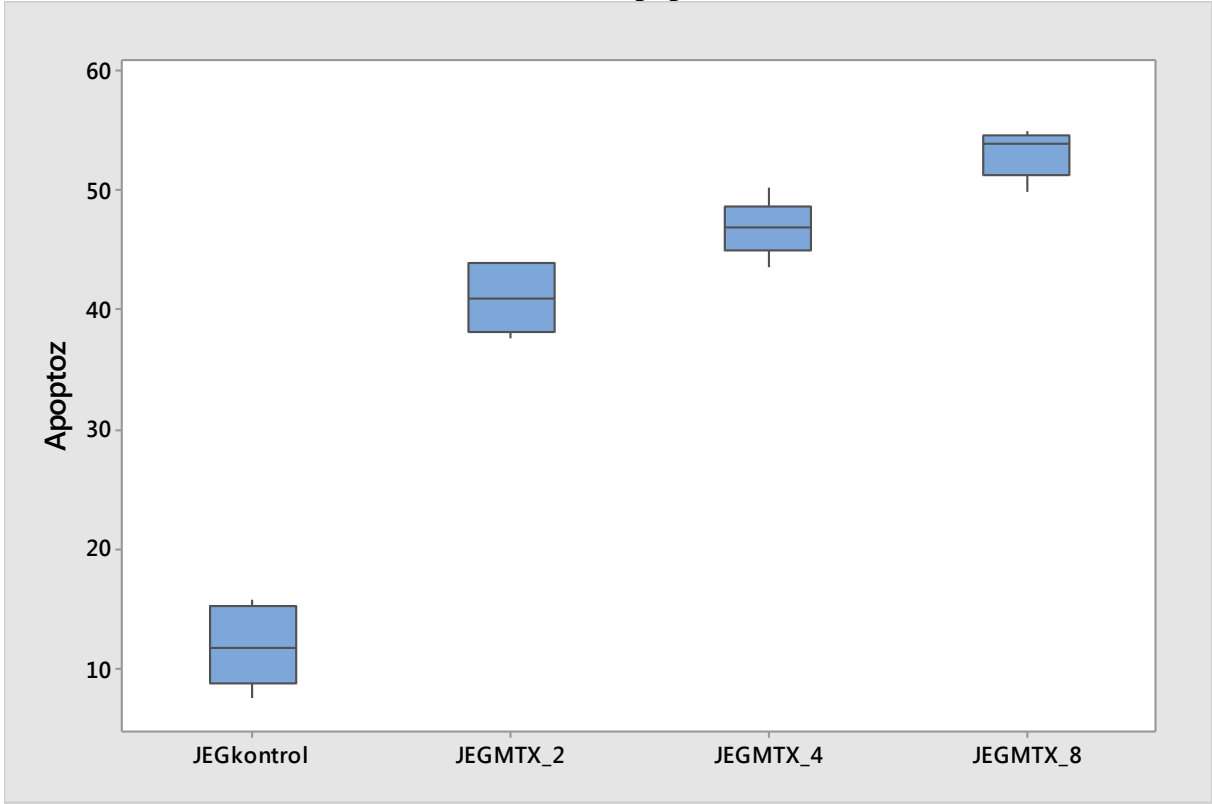
Şekil 17. Act-D'nin JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

Tablo 11. Act-D'nin JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

	β-hCG
JAR Kontrol	1217
JAR Act-D 0.05 µM	225
JAR Act-D 0.1 µM	152
JAR Act-D 0.2 µM	106

24 saat muamele sonunda Act-D'nin 0.05 µM'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %12'dir. 0.1 µM'lik muamele sonucu apoptoz oranı %15, 0.2 µM'lik muamelesi sonucu ise %24'tür. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar 0.1 ve 0.2 µM'lik dozlarda anlamlıdır. β-hCG düzeylerinde de Act-D'nin dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

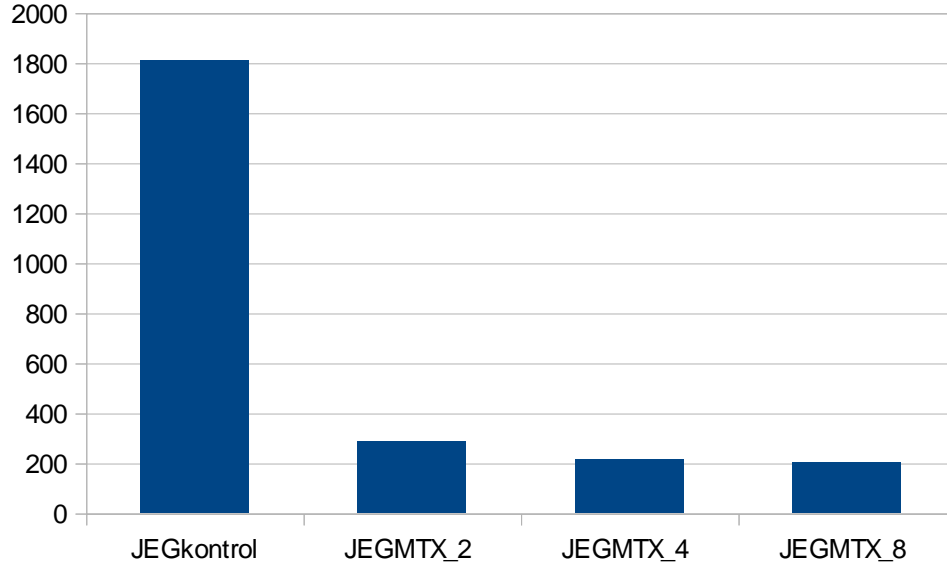
4.4. MTX'm JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri



Şekil 18. MTX'm JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 12. MTX'm JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JEG-3	MTX 2 Kontrol	MTX 4 MTX 2	MTX 8 MTX 4
Z	-2,201(a)	-2,201(a)	-2,201(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,028	,028	,028



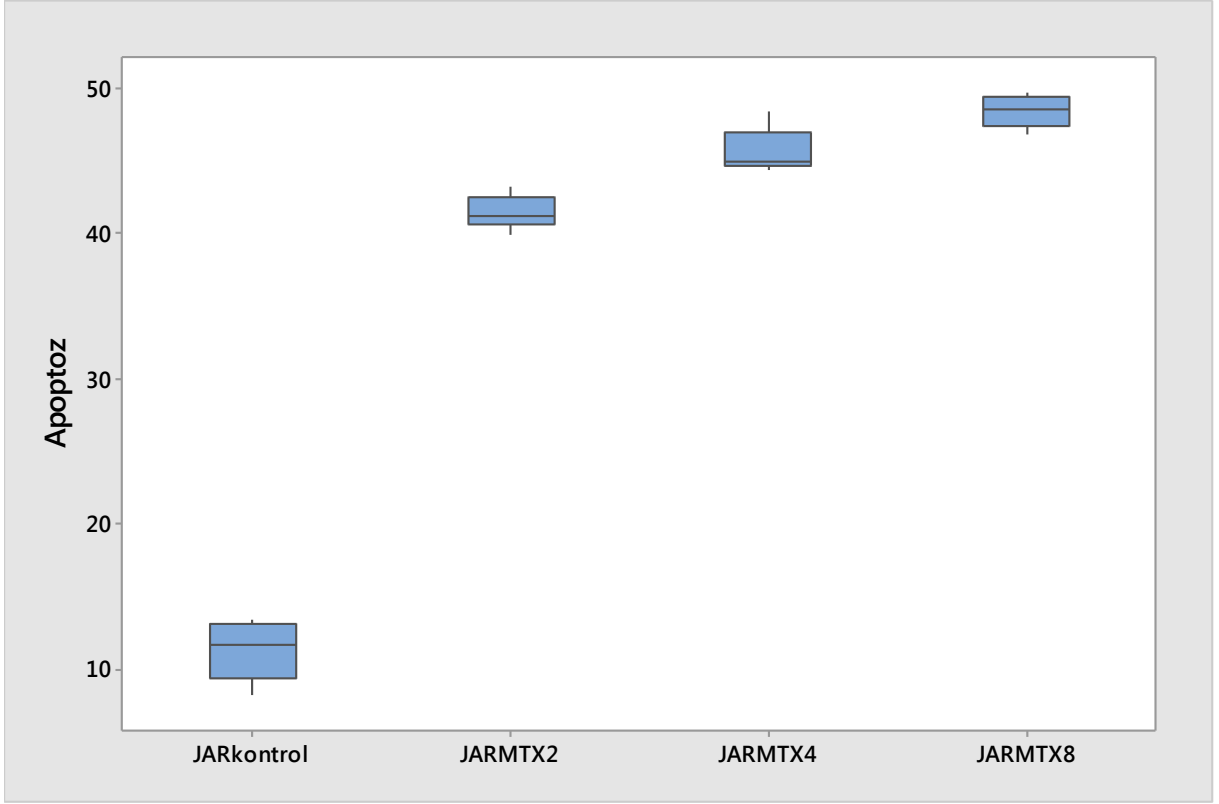
Şekil 19. MTX'in JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

Tablo 13. MTX'in JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

	β-hCG
JEG-3 Kontrol	1811
JEG-3 MTX 2 µM	285
JEG-3 MTX 4 µM	214
JEG-3 MTX 8 µM	203

24 saat muamele sonunda MTX'in 2 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %40'tır. 4 µM'lik muamele sonucu apoptoz oranı %48, 8 µM'lik muamelesi sonucu ise %53'tür. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır. β-hCG düzeylerinde de MTX'in dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

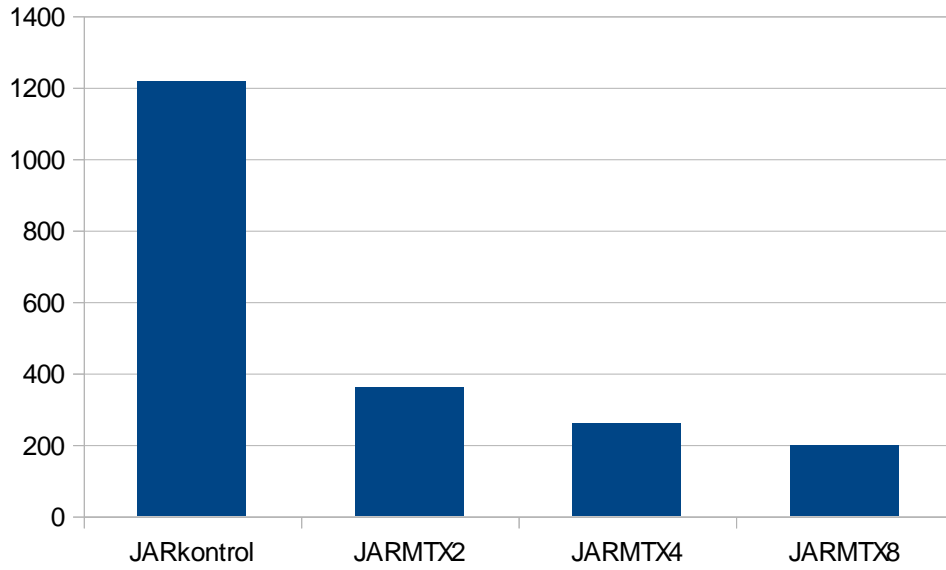
4.5. MTX'm JAR hücre hattı üzerine apopitotik etkileri



Şekil 20. MTX'm JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 14. MTX'm JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JAR	MTX 2 Kontrol	MTX 4 MTX 2	MTX 8 MTX 4
Z	-2,207 (a)	-2,201 (a)	-1,992 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,027	,028	,046



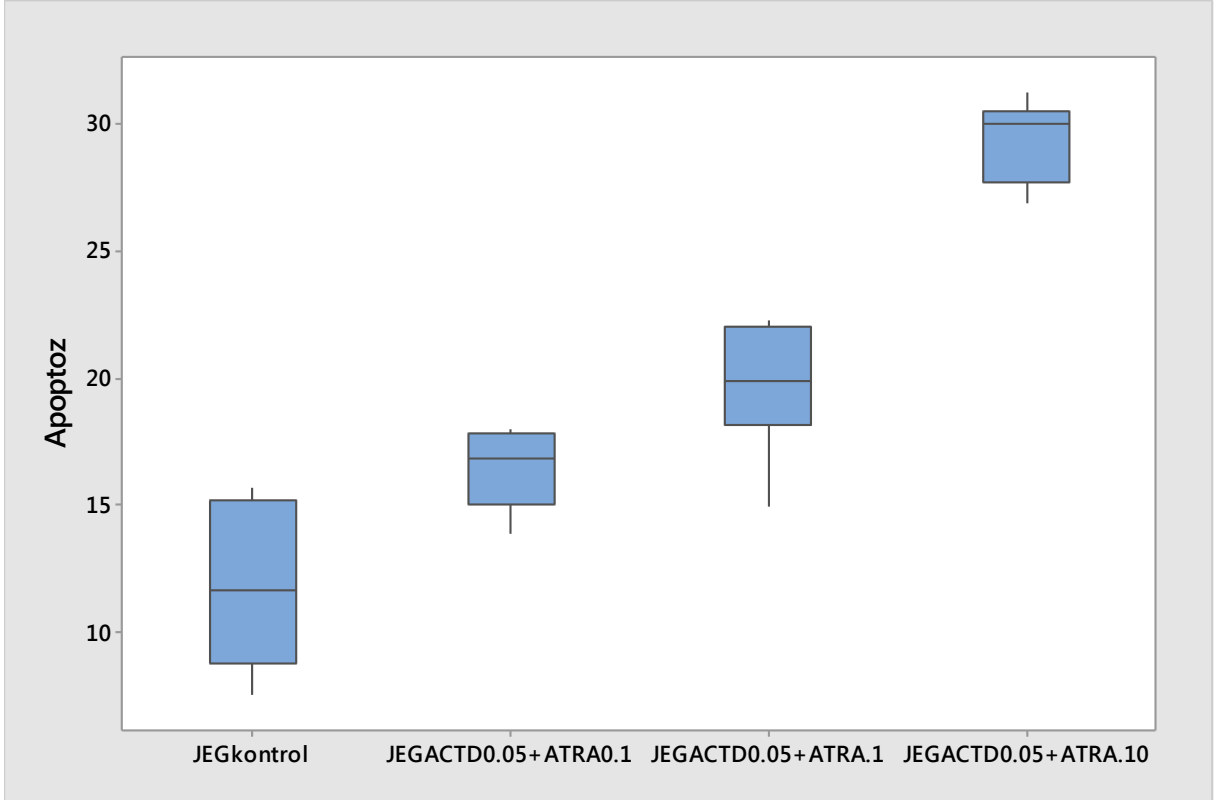
Şekil 21. MTX'in JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

Tablo 15. MTX'in JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

	β-hCG
JAR Kontrol	1217
JARMTX 2 µM	360
JAR MTX 4 µM	275
JAR MTX 8 µM	197

24 saat muamele sonunda MTX'in 2 µM'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %40'tır. 4 µM'lik muamele sonucu apoptoz oranı %45, 8 µM'lik muamelesi sonucu ise %49'dur. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar anlamlıdır. β-hCG düzeylerinde de MTX'in dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

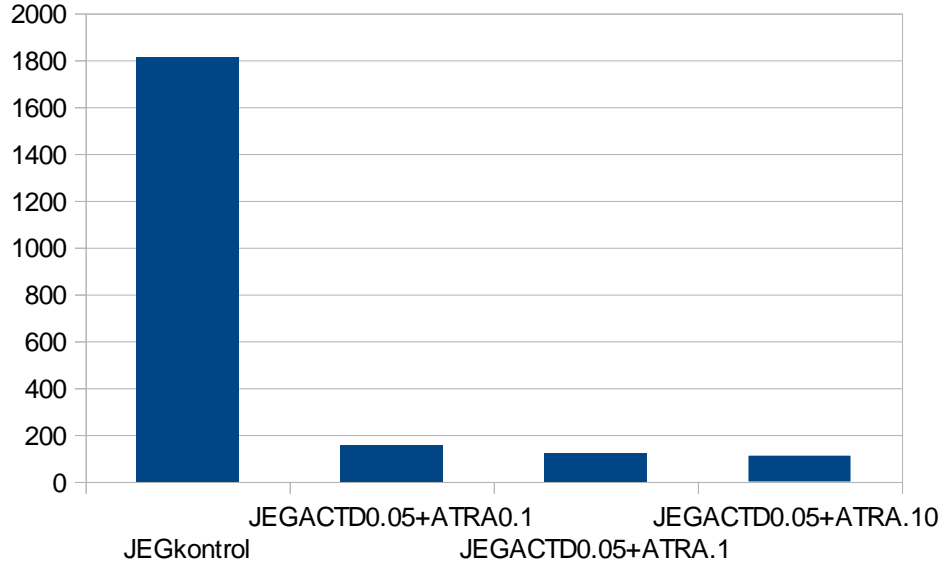
4.6. Act-D 0.05 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JEG-3 hücre hattı üzerine apoptotik etkileri



Şekil 22. Act-D ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 16. Act-D ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JEG-3	Act-D 0.05+ATRA 0.1 Act-D 0.05	Act-D 0.05+ATRA 1 Act-D 0.05+ATRA 0.1	Act-D 0.05+ATRA 10 Act-D 0.05+ATRA 1
Z	-1,378 (a)	-2,207 (b)	-2,201 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,168	,027	,028



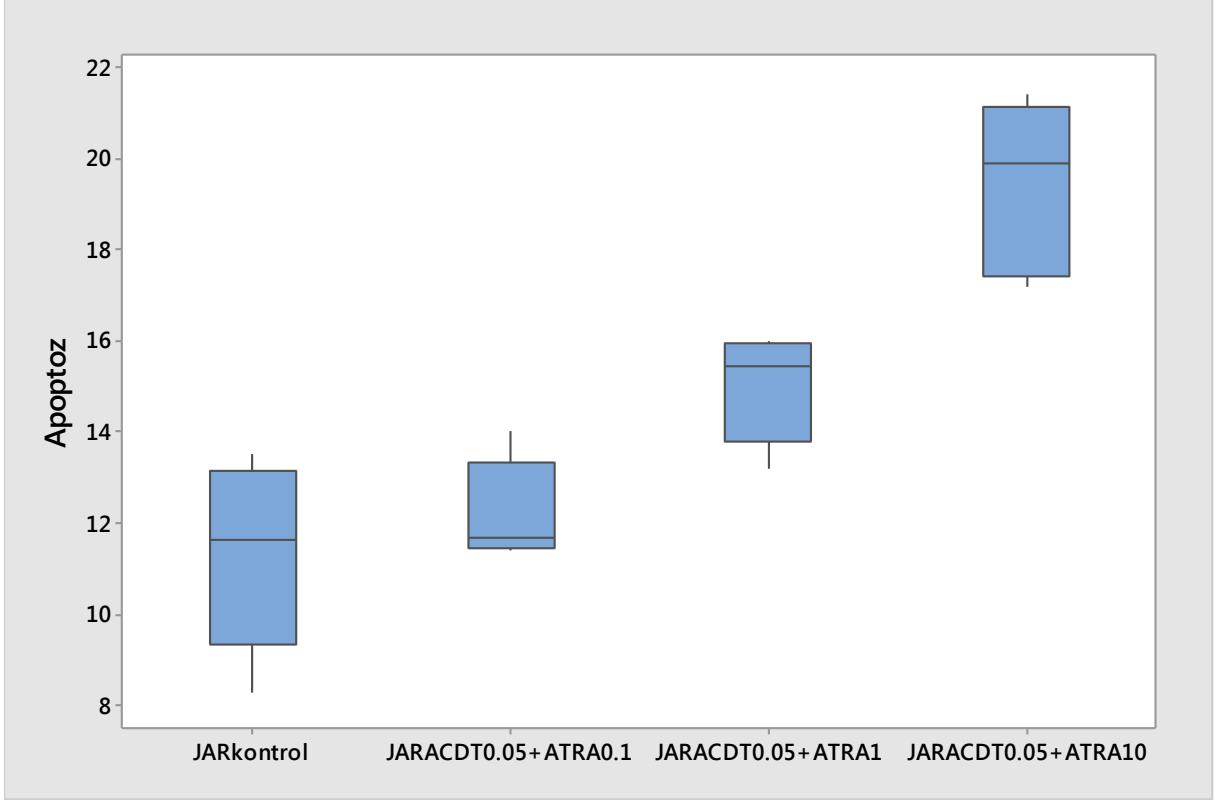
Şekil 23. Act-D 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

Tablo 17. Act-D 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

	β-hCG
JEG-3 Kontrol	1811
JEG-3 Act-D 0.05 µM + ATRA 0.1 µM	156
JEG-3 Act-D 0.05 µM + ATRA 1 µM	123
JEG-3 Act-D 0.05 µM + ATRA 10 µM	110

24 saat muamele sonunda Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %17'dir. Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %21'dir, Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %27'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik dozunda ve Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lik dozlarında anlamlıdır. β-hCG düzeylerinde ATRA'nın eklenmesiyle beraber düşüş izlenmiştir ancak bu düşüş doz artışından bağımsızdır.

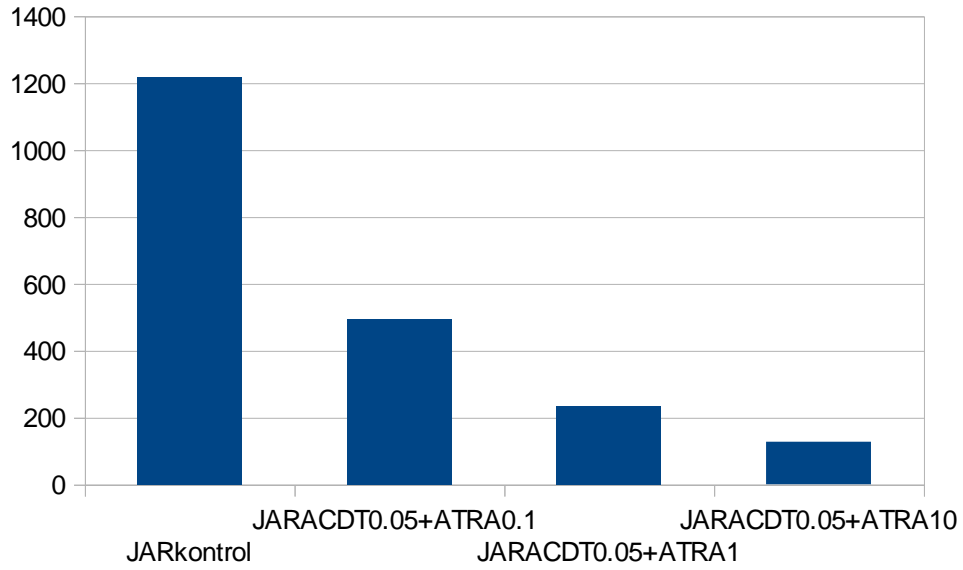
4.7. Act-D 0.05 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apoptotik etkileri



Şekil 24. Act-D 0.05 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 18. Act-D 0.05 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JAR	Act-D 0.05+ATRA 0.1 Act-D 0.05	Act-D 0.05+ATRA 1 Act-D 0.05+ATRA 0.1	Act-D 0.05+ATRA 10 Act-D 0.05+ATRA 1
Z	-1,572 (a)	-2,207 (a)	-2,207 (a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,116	,027	,027



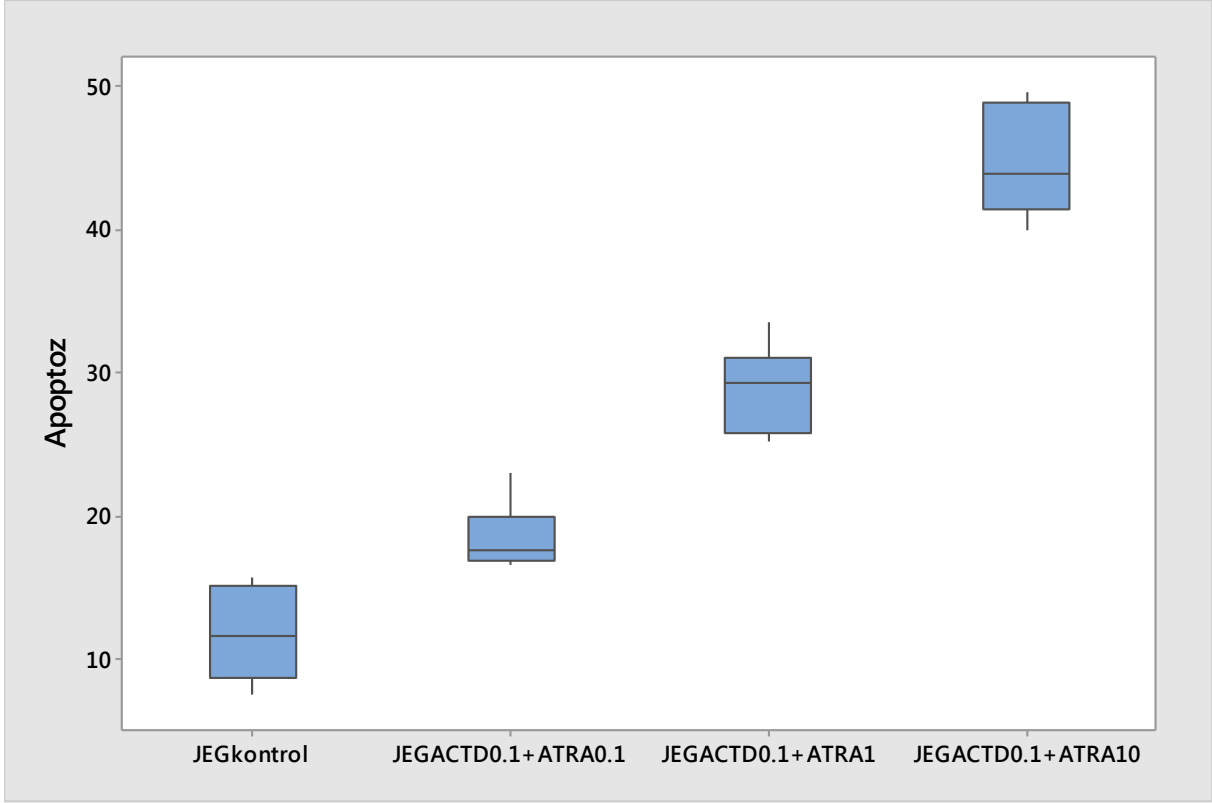
Şekil 25. Act-D 0.05 µM'lik dozu ile, ATRA'nın JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

Tablo 19. Act-D 0.05 µM'lik dozu ile, ATRA'nın JAR hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

	β-hCG
JAR Kontrol	1217
JAR Act-D 0.05 µM + ATRA 0.1 µM	494
JAR Act-D 0.05 µM + ATRA 1 µM	234
JAR Act-D 0.05 µM + ATRA 10 µM	127

24 saat muamele sonunda Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 µM'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %12'dir. Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %15'tir, Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %22'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik dozunda ve Act-D'nin 0.05 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lik dozlarında anlamlıdır. β-hCG düzeylerinde de ATRA'nın dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

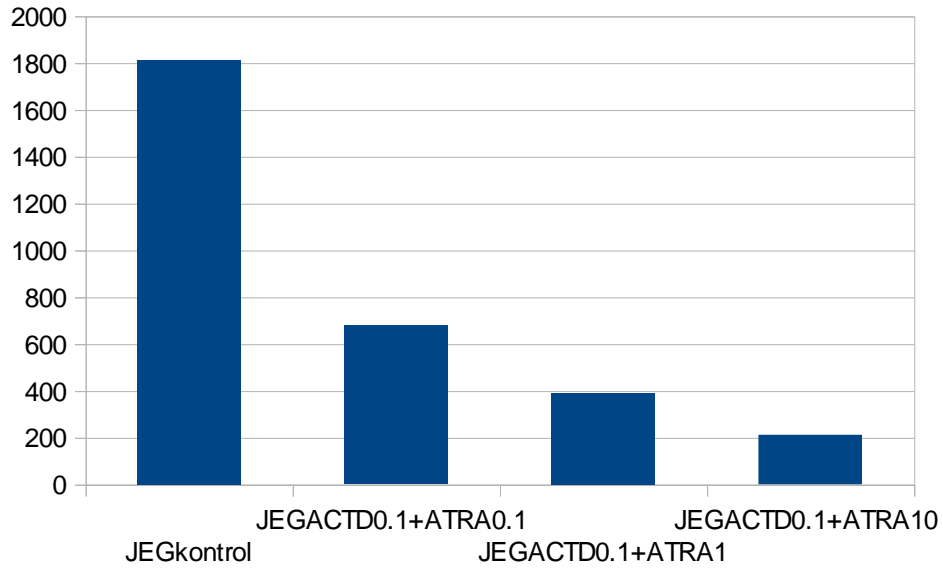
4.8. Act-D 0.1 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JEG-3 hücre hattı üzerine apoptotik etkileri



Şekil 26. Act-D 0.1 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 20. Act-D 0.1 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JEG-3	Act-D 0.1+ATRA0.1 Act-D 0.1	Act-D 0.1+ATRA 1 Act-D 0.1+ATRA0.1	Act-D 0.1+ATRA 10 Act-D 0.1+ATRA 1
Z	-1,787 (a)	-2,201 (b)	-2,201 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,074	,028	,028



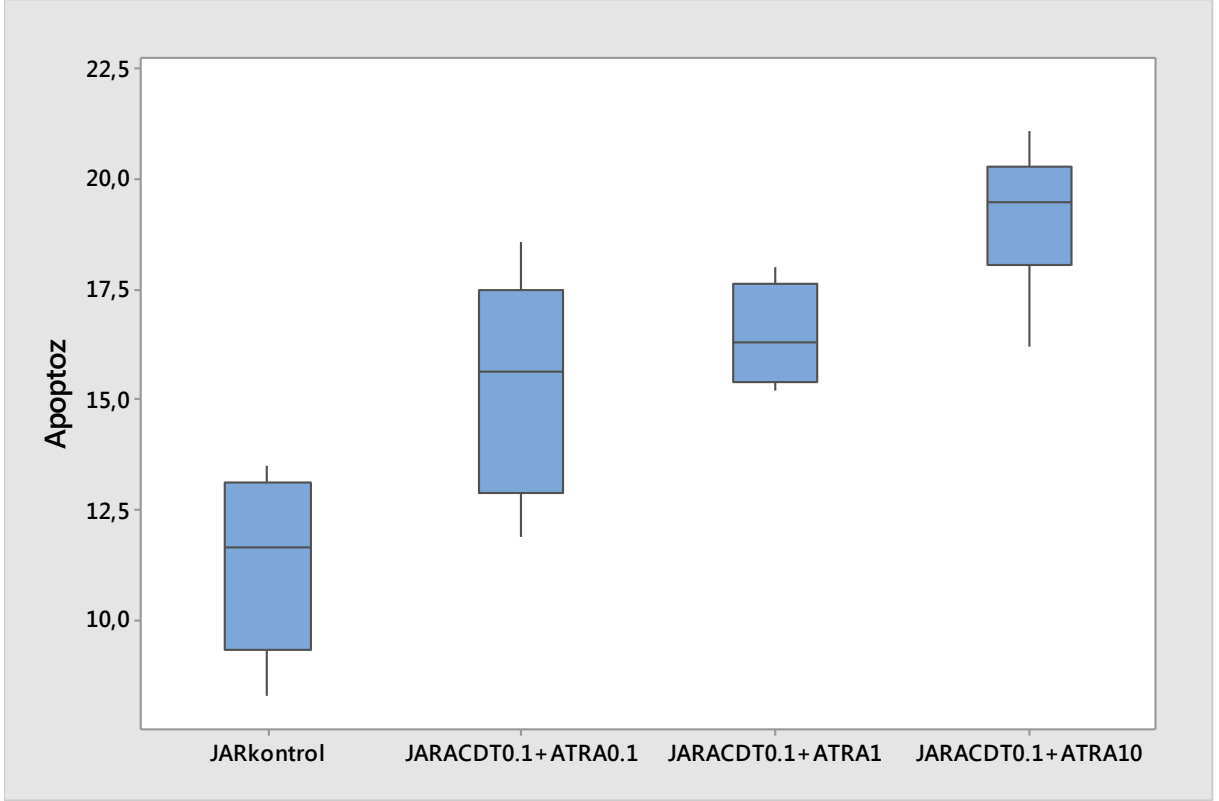
Şekil 27. Act-D 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

Tablo 21. Act-D 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücre hattında β-hCG düzeylerine olan etkisi

	β-hCG
JEG-3 Kontrol	1811
JEG-3 Act-D 0.1 µM + ATRA 0.1 µM	678
JEG-3 Act-D 0.1 µM + ATRA 1 µM	389
JEG-3 Act-D 0.1 µM + ATRA 10 µM	211

24 saat muamele sonunda Act-D'nin 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %18'dir. Act-D'nin 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %30'dur, Act-D'nin 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %47'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar Act-D'nin 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik dozunda ve Act-D'nin 0.1 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lik dozlarında anlamlıdır. β-hCG düzeylerinde de ATRA'nın dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

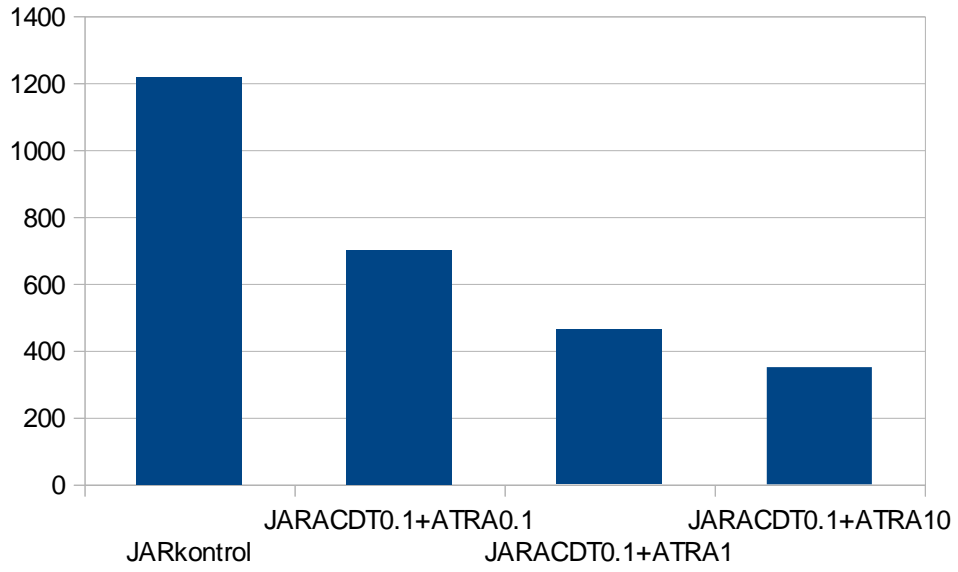
4.8. Act-D 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apoptotik etkileri



Şekil 28. Act-D 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 22. Act-D 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JAR	Act-D 0.1+ATRA0.1 Act-D 0.1	Act-D 0.1+ATRA 1 Act-D 0.1+ATRA0.1	Act-D 0.1+ATRA 10 Act-D 0.1+ATRA 1
Z	-2,207(a)	-1,367(a)	-2,201(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,027	,172	,028



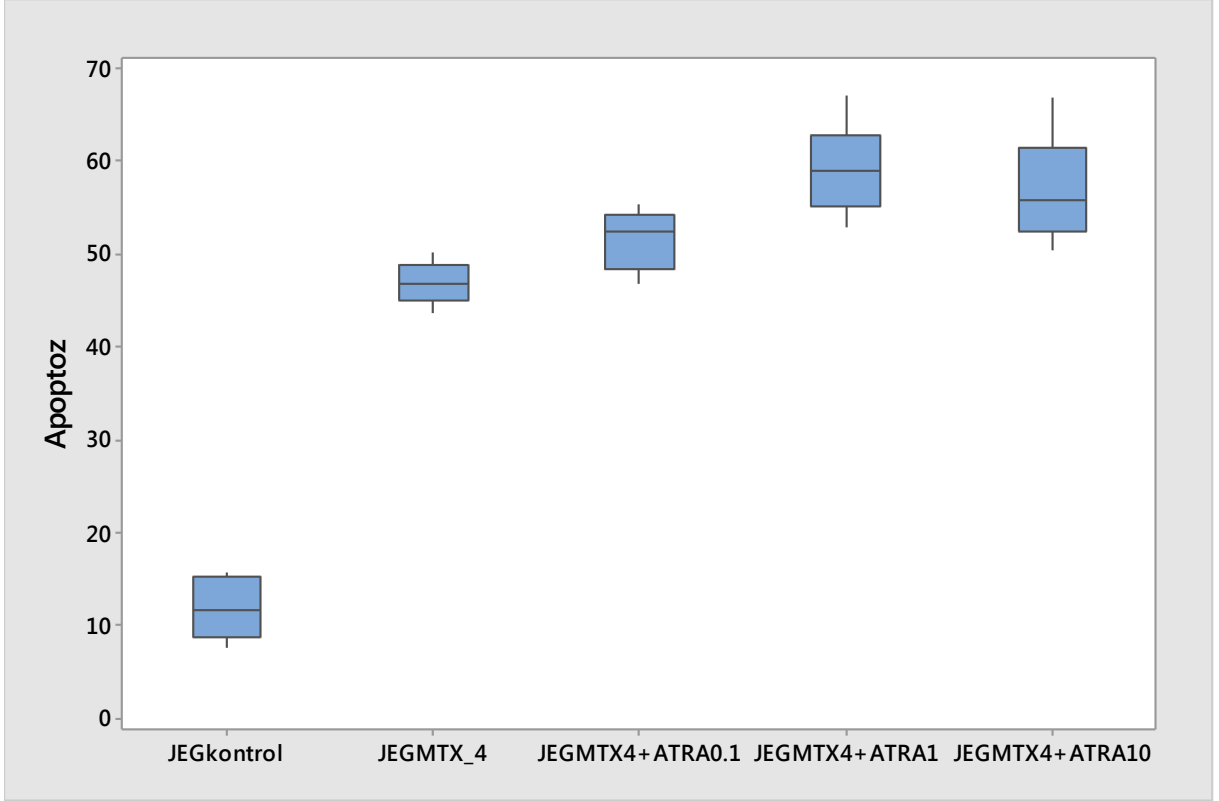
Şekil 29. Act-D 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücre hattında $\beta\text{-hCG}$ düzeylerine olan etkisi

Tablo 23. Act-D 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücre hattında $\beta\text{-hCG}$ düzeylerine olan etkisi

	$\beta\text{-hCG}$
JAR Kontrol	1217
JAR Act-D 0.1 μM + ATRA 0.1 μM	700
JAR Act-D 0.1 μM + ATRA 1 μM	463
JAR Act-D 0.1 μM + ATRA 10 μM	350

24 saat muamele sonunda Act-D'nin 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 μM 'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apopitoz oranı %14'tür. Act-D'nin 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 1 μM 'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apopitoz oranı %17'dir, Act-D'nin 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 10 μM 'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apopitoz oranı %19'dur. İstatistiksel olarak apopitoz oranlarındaki artışlar Act-D 'nin 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 μM 'lik dozunda ve Act-D 'nin 0.1 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 10 μM 'lik dozlarında anlamlıdır. $\beta\text{-hCG}$ düzeylerinde de ATRA'nın dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir.

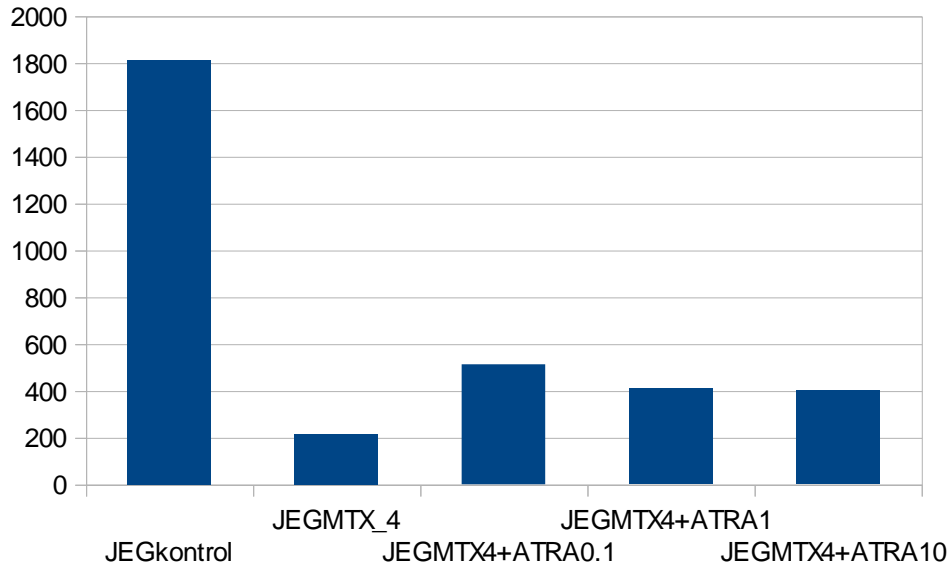
4.9. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JEG-3 hücre hattı üzerine apoptotik etkileri



Şekil 30. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 24. MTX 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JEG-3	MTX 4+ATRA 0.1 MTX 4	MTX 4+ATRA 1 MTX 4+ATRA 0.1	MTX 4+ATRA 10 MTX 4+ATRA 1
Z	-1,572 (a)	-1,992 (a)	-,314 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,116	,046	,753



Şekil 31. MTX 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin β-hCG değerlerine etkisi

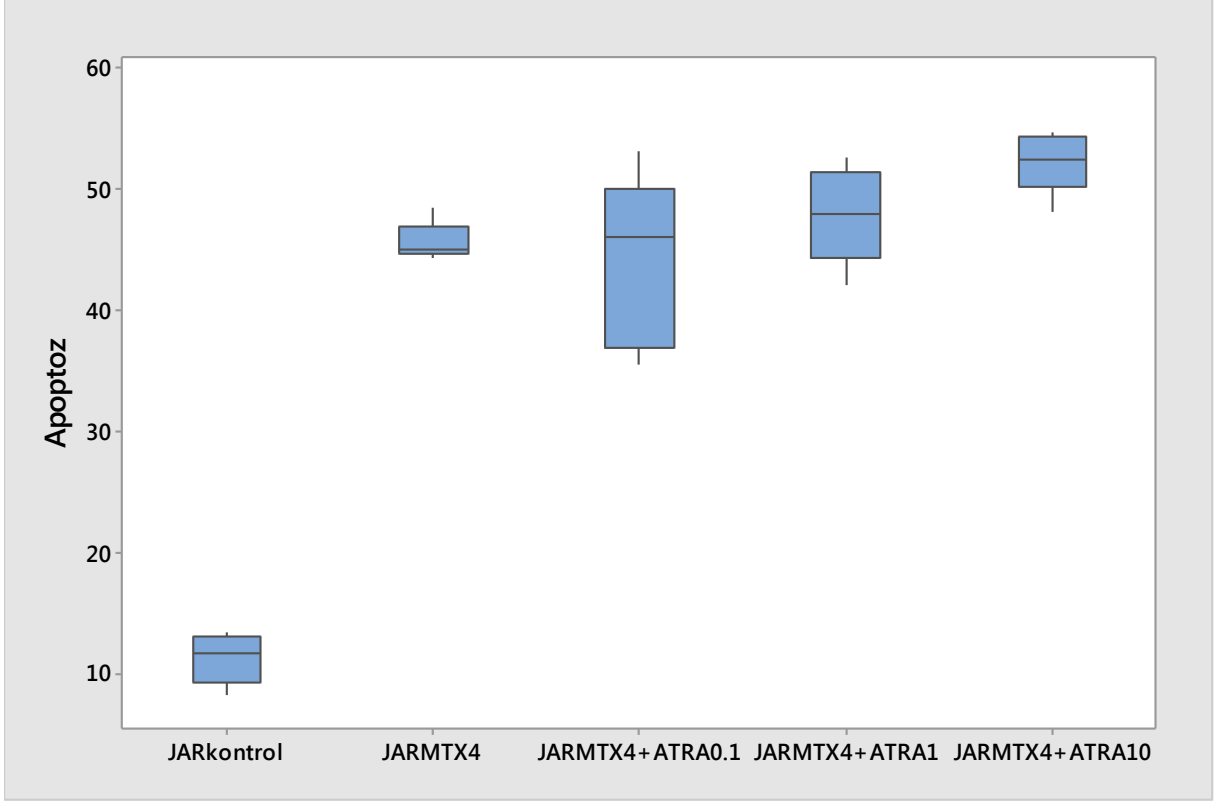
Tablo 25. MTX 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin β-hCG değerlerine etkisi

	β-hCG
JEG-3 Kontrol	1811
JEG-3 MTX 4 µM	214
JEG-3 MTX 4 µM + ATRA 0.1 µM	512
JEG-3 MTX 4 µM + ATRA 1 µM	409
JEG-3 MTX 4 µM + ATRA 10 µM	400

24 saat muamele sonunda MTX 4 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %48'dir. MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %52'dir, MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %62'dir, MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %58'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 µM'lik dozundan ve MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik dozuna geçişte anlamlıdır. MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lük

dozunun, MTX'in 4 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 1 μM 'lik dozuna göre istatistiksel olarak üstünlüğü yoktur. $\beta\text{-hCG}$ düzeylerinde de bu durum gözlenmektedir.

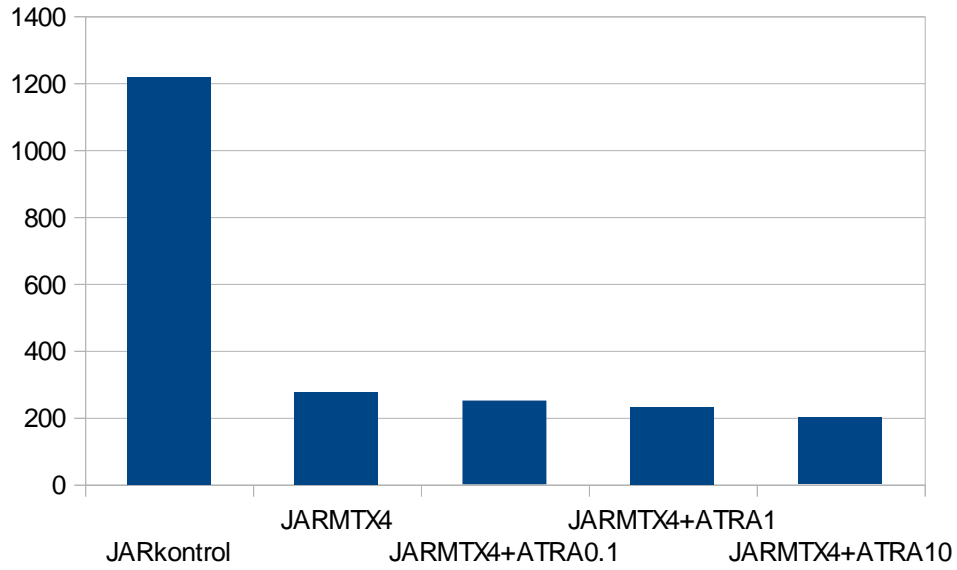
4.10. MTX 4 μM 'lik dozu ile ATRA'nın kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apoptotik etkileri



Şekil 32. MTX 4 μM 'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 26. MTX 4 μM 'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

JAR	MTX 4+ATRA 0.1 MTX 4	MTX 4+ATRA 1 MTX 4+ATRA 0.1	MTX 4+ATRA 10 MTX 4+ATRA 1
Z	-,526 (a)	-1,572 (b)	-2,023 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,599	,116	,043



Şekil 33. MTX 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin β-hCG değerlerine etkisi

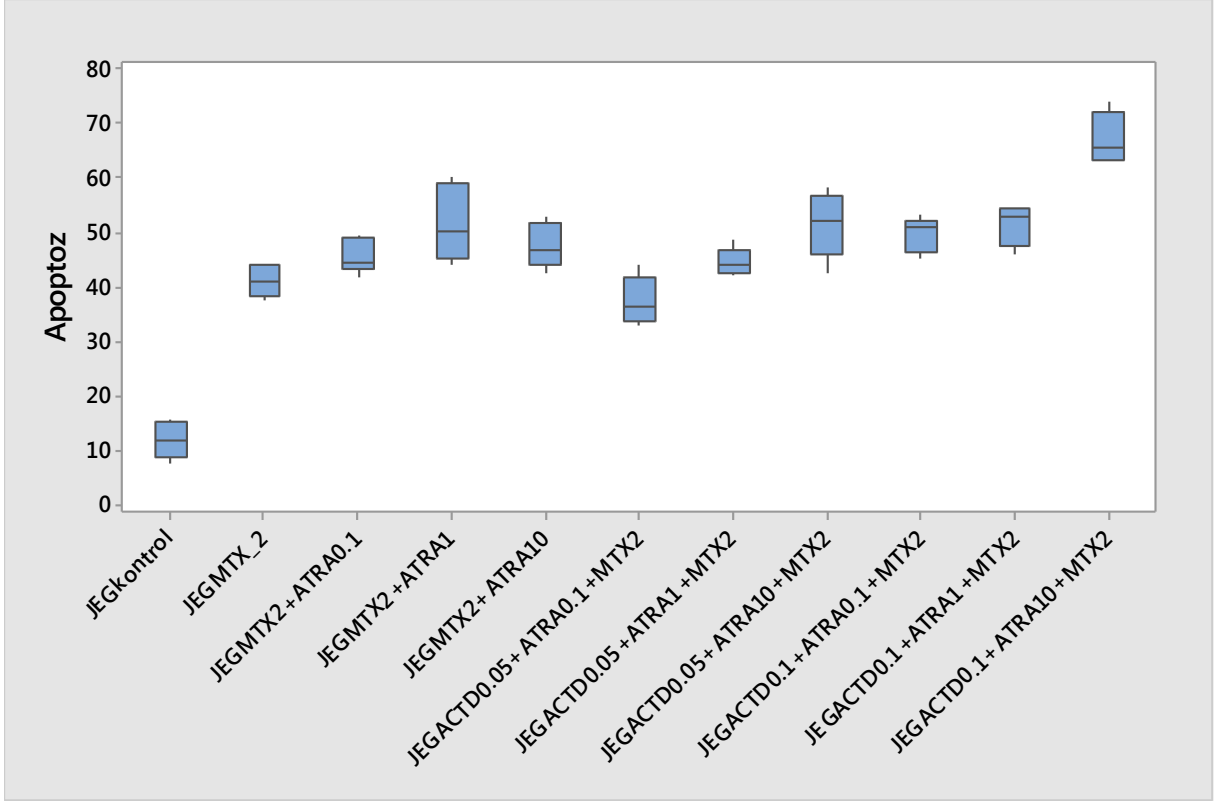
Tablo 27. MTX 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın JAR hücreleri üzerindeki etkisinin β-hCG değerlerine etkisi

	β-hCG
JAR Kontrol	1217
JAR MTX 4 µM	275
JAR MTX 4 µM + ATRA 0.1 µM	250
JAR MTX 4 µM + ATRA 1 µM	230
JAR MTX 4 µM + ATRA 10 µM	200

24 saat muamele sonunda MTX 4 µM'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %44'tür. MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 µM'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %45'dir, MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %47'dir, MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %51'dir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'lik dozundan ve MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 10 µM'lik dozuna geçişte anlamlıdır. MTX'in 4 µM'lik dozu ile ATRA'nın 1 µM'luk

dozunun, MTX'in 4 μ M'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 μ M'lik dozuna göre istatistiksel olarak üstünlüğü yoktur, β -hCG düzeylerinde de bu durum gözlenmektedir.

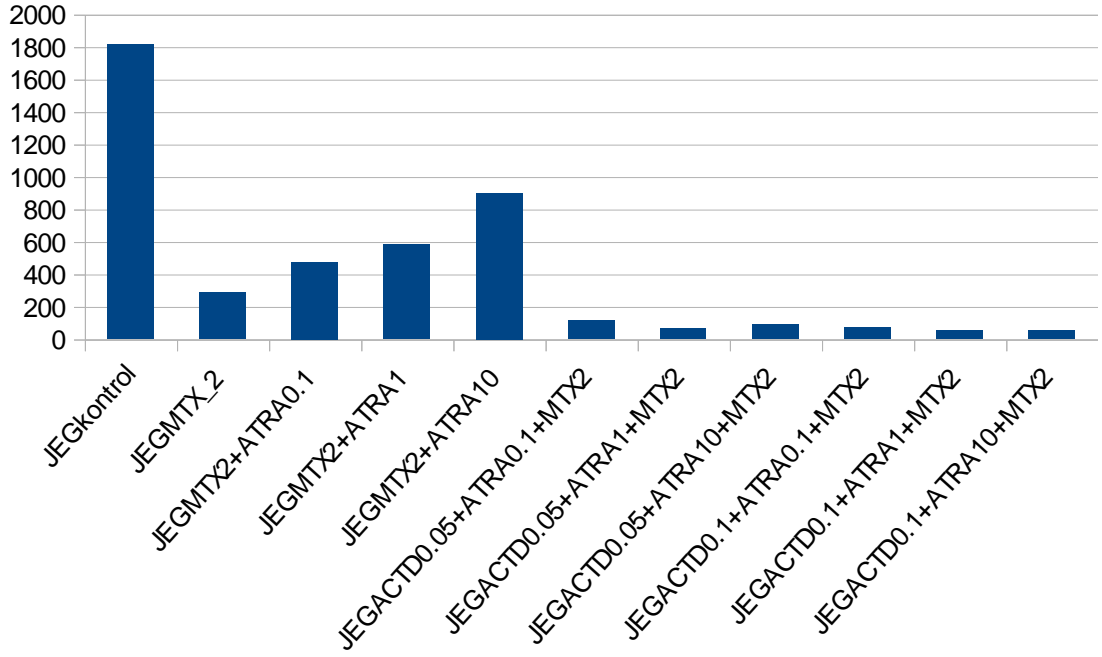
4.11. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücre hattı üzerine apopitotik etkileri



Şekil 34. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 28. MTX 2 μ M'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri $p < 0,05$

	MTX 2+ATRA 0.1	MTX2 +ATRA 1	MTX2+ATR A 10	Act-D 0.05+ATRA 0.1+MTX 2	Act-D 0.05+ATRA 1+MTX 2	Act-D 0.05+ATR A 10+MTX 2	Act-D 0.1+ATR A 0.1+MTX 2	Act-D 0.1+ATR A 1+MTX 2	Act-D 0.1+ATR A 10+MTX 2
JEG-3	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2
Z	-2,207(a)	-2,201(a)	-2,201(a)	-1,753(b)	-2,201(a)	2,201(a)	2,201(a)	2,201(a)	2,201(a)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,027	,028	,028	,080	,028	,028	,028	,028	,028



Şekil 35. MTX 2 µM'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin β-hCG değerlerine etkisi

Tablo 29. MTX 2 µM'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JEG-3 hücreleri üzerindeki etkisinin β-hCG değerlerine etkisi

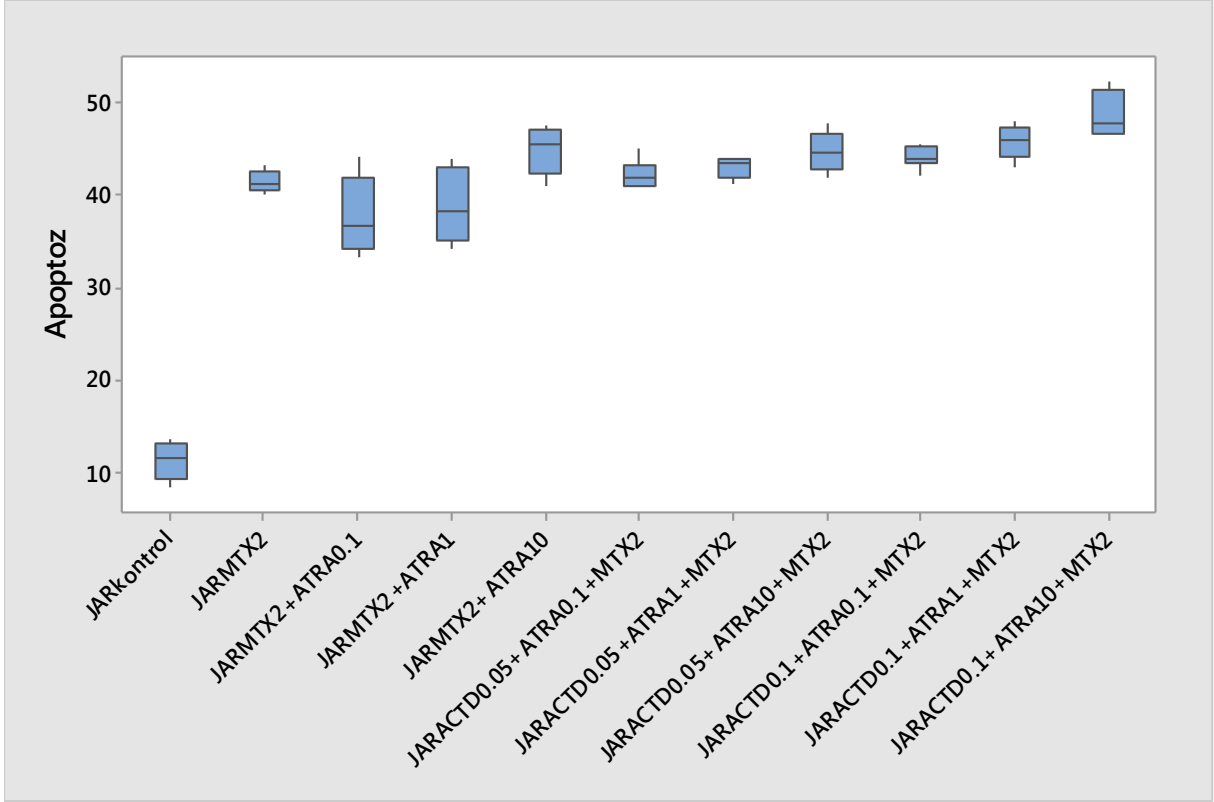
	β-hCG
JEG-3 Kontrol	1811
JEG-3 MTX 2 µM	285
JEG-3 MTX 2 µM + ATRA 0.1 µM	474
JEG-3 MTX 2 µM + ATRA 1 µM	582
JEG-3 MTX 2 µM + ATRA 10 µM	899
JEG-3 Act-D 0.05 µM + ATRA 0.1 µM + MTX 2 µM	112
JEG-3 Act-D 0.05 µM + ATRA 1 µM + MTX 2 µM	65
JEG-3 Act-D 0.05 µM + ATRA 10 µM + MTX 2 µM	89
JEG-3 Act-D 0.1 µM + ATRA 0.1 µM + MTX 2 µM	72
JEG-3 Act-D 0.1 µM + ATRA 1 µM + MTX 2 µM	54
JEG-3 Act-D 0.1 µM + ATRA 10 µM + MTX 2 µM	51

24 saat muamele sonunda MTX 2 μM 'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %42'dir. MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 μM 'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %44'tür, MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 1 μM 'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %49'dur, MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 10 μM 'lik doz uygulaması sonucu JEG-3 hücrelerindeki apoptoz oranı %51'dir. β -hCG düzeylerinde ise ATRA'nın dozu ile orantılı bir artış izlenmektedir. Bu bulgu apoptoz bulgusu ile ters düşmektedir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 μM 'lik dozundan ve MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 1 μM 'lik dozuna geçişte anlamlıdır. MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 10 μM 'luk dozunun, MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 1 μM 'lik dozuna göre istatistiksel olarak üstünlüğü yoktur.

Act-D 0.05 μM ve MTX 2 μM dozları ile ATRA'nın 0.1, 1 ve 10 μM 'lik kombinasyonlarının MTX 2 μM 'lik dozu ile karşılaştırıldığında ise ACTD 0.05 μM , MTX 2 μM ve ATRA'nın 0.1 μM 'lik kombinasyonunun MTX 2 μM 'lik dozuna göre %40'a göre %35'lik apoptoz oranlarına bakıldığında istatistiksel olarak üstünlüğü yoktur. Ancak Act-D 0.05 μM , MTX 2 μM ve ATRA'nın 1 μM ile ATRA 10 μM , Act-D 0.05 μM , MTX 2 μM ve ATRA'nın 0.1 μM 'lik kombinasyonunun MTX 2 μM 'lik kombinasyonunun MTX 2 μM 'lik dozuna göre %40'a göre %45 ve %55'lik apoptoz oranlarına bakıldığında istatistiksel olarak üstünlüğü vardır.

Act-D 0.1 μM ve MTX 2 μM dozları ile ATRA'nın 0.1, 1 ve 10 μM 'lik kombinasyonlarının MTX 2 μM 'lik dozu ile karşılaştırıldığında ise tüm kombinasyonların MTX 2 μM 'lik dozuna göre %40'a göre %54, %57 ve %68'lik apoptoz oranlarına bakıldığında istatistiksel olarak üstünlüğü vardır. Ayrıca Act-D 0.1 μM , MTX 2 μM ve ATRA'nın 10 μM 'lik kombine dozlarının MTX 2 μM ile Act-D 'nin 0.05 μM ve 0.01 μM 'lik dozları ile yapılan diğer kombinasyonlarına göre de %44, %49 ve % 51'e göre %68'lik apoptoz oranlarına bakıldığında istatistiksel olarak üstünlüğü vardır. β -hCG düzeylerinde de ATRA'nın dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir. Act-D 0.1, ATRA 10 ve MTX 2 μM 'lik dozun en etkili doz olduğunu göstermektedir.

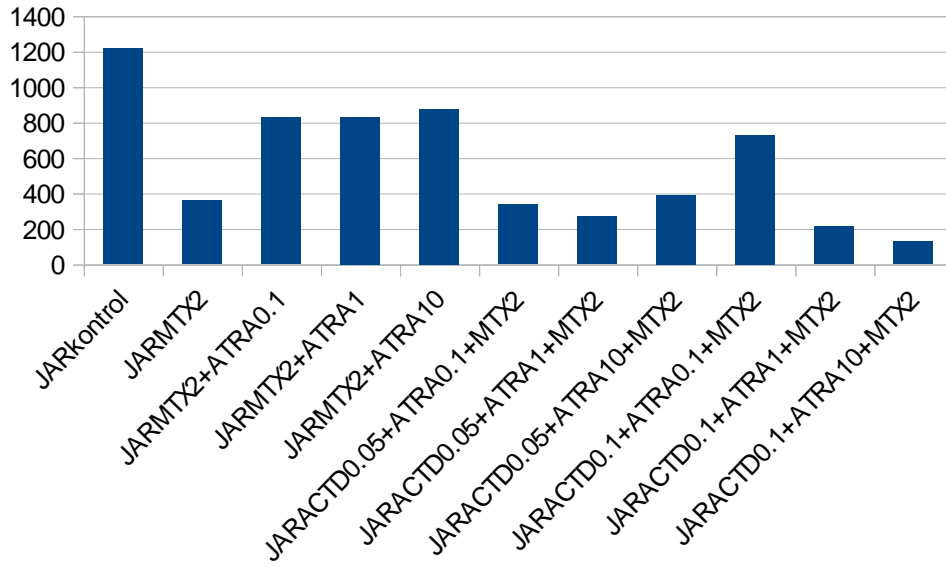
4.12. MTX 2 µM'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D'nin kombinasyonlarının JAR hücre hattı üzerine apoptotik etkileri



Şekil 36. MTX 2 µM'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D'nin kombinasyonlarının JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi

Tablo 30. MTX 2 µM'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D'nin kombinasyonlarının JAR hücreleri üzerindeki etkisinin Annexin testi ile değerlendirilmesi, Anlamlılık değeri p<0,05

JAR	MTX 2+ATRA 0.1	MTX 2 +ATRA 1	MTX 2+ATRA 10	Act-D 0.05+ATR A 0.1+MTX 2	Act-D 0.05+ATR A 1+MTX 2	Act-D 0.05+ATR A 10+MTX 2	Act-D 0.1+ATRA 0.1+MTX 2	Act-D 0.1+ATRA 1+MTX 2	Act-D 0.1+ATRA 10+MTX2
	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2	MTX 2
Z	-1,572 (a)	-1,572 (a)	-2,032 (b)	-,736 (b)	-1,787 (b)	-1,997 (b)	-2,201 (b)	-2,201 (b)	-2,201 (b)
Asymp. Sig. (2-tailed)	,116	,116	,042	,462	,074	,046	,028	,028	,028



Şekil 37. MTX 2 µM'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JAR hücreleri üzerindeki etkisinin β-hCG değerlerine etkisi

Tablo 31. MTX 2 µM'lik dozu ile ATRA'nın, Act-D 'nin kombinasyonlarının JAR hücreleri üzerindeki etkisinin β-hCG değerlerine etkisi

	β-hCG
JAR Kontrol	1217
JAR MTX 2 µM	360
JAR MTX 2 µM + ATRA 0.1 µM	827
JAR MTX 2 µM + ATRA 1 µM	829
JAR MTX 2 µM + ATRA 10 µM	874
JAR Act-D 0.05 µM + ATRA 0.1 µM + MTX 2 µM	464
JAR Act-D 0.05 µM + ATRA 1 µM + MTX 2 µM	234
JAR Act-D 0.05 µM + ATRA 10 µM + MTX 2 µM	127
JAR Act-D 0.1 µM + ATRA 0.1 µM + MTX 2 µM	728
JAR Act-D 0.1 µM + ATRA 1 µM + MTX 2 µM	210
JAR Act-D 0.1 µM + ATRA 10 µM + MTX 2 µM	125

24 saat muamele sonunda MTX 2 μM 'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %43'tür. MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 μM 'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %37'dir, MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 1 μM 'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %38'dir, MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 10 μM 'lik doz uygulaması sonucu JAR hücrelerindeki apoptoz oranı %47'dir. β -hCG düzeylerinde de ATRA'nın dozu ile orantılı bir artış izlenmektedir. İstatistiksel olarak apoptoz oranlarındaki artışlar MTX'in 2 μM 'lik dozundan ATRA'nın 10 μM 'lik dozuna geçişte anlamlıdır. MTX'in 2 μM 'lik dozu ile ATRA'nın 0.1 ve 1 μM 'lik dozunun, MTX'in 2 μM 'lik dozuna göre istatistiksel olarak üstünlüğü yoktur.

Act-D 0.05 μM ve MTX 2 μM dozları ile ATRA'nın 0.1, 1 ve 10 μM 'lik kombinasyonlarının MTX 2 μM 'lik dozu ile karşılaştırıldığında ise ACTD 0.05 μM , MTX 2 μM ve ATRA'nın 0.1 ve 1 μM 'lik kombinasyonunun MTX 2 μM 'lik dozuna göre %40'a göre %41'lik apoptoz oranlarına bakıldığında üstünlüğü istatistiksel olarak yoktur. Ancak Act-D 0.05 μM , MTX 2 μM ve ATRA'nın 10 μM 'lik kombinasyonunun MTX 2 μM 'lik dozuna göre %40'a göre %43 ve %44'lük apoptoz oranlarına bakıldığında istatistiksel olarak üstünlüğü vardır.

Act-D 0.1 μM ve MTX 2 μM dozları ile ATRA'nın 0.1, 1 ve 10 μM 'lik kombinasyonlarının MTX 2 μM 'lik dozu ile karşılaştırıldığında ise tüm kombinasyonlarda MTX 2 μM 'lik dozuna göre %40'a göre %43, %45 ve %48'lik apoptoz oranlarına bakıldığında istatistiksel olarak üstünlüğü vardır. Ayrıca Act-D 0.1 μM , MTX 2 μM ve ATRA'nın 10 μM 'lik kombine dozlarının MTX 2 μM ile Act-D 'nin 0.05 μM ve 0.01 μM 'lik dozları ile yapılan diğer kombinasyonlarına göre de %36, %38 ve % 46'ya göre %48'lik apoptoz oranlarına bakıldığında istatistiksel olarak üstünlüğü vardır. β -hCG düzeylerinde de ATRA'nın dozu ile orantılı bir düşüş izlenmektedir. Act-D 0.1, ATRA 10 ve MTX 2 μM 'lik dozun en etkili doz olduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Hücre kültürleri, yeni ilaç adaylarının etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yeni ilaç adaylarının bilinen ya da etki etmesi düşünülen moleküler hedefler üzerinde neden oldukları etkiler böylece belirlenebilmektedir. Geliştirilmiş kanser ilaç bileşenlerinin hücre fenotipinde meydana getirdiği değişiklikler nedeni ile yenilenen tümör büyümesi, klinik uygulamalarda beklenmeyen sonuçların alınmasına neden olmaktadır. Klinikte görülen bu sonuçların nedenlerinin tahmin edilebilmesi için insan tek tabakalı kanser hücre hatlarının kullanımı oldukça yaygındır ve önemli bir belirleyicidir. 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 (145).

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).

ATRA, 9-cis retinoik asit gibi vitamin A analogları, klinikte birçok dermatolojik, hematopoitik ve kanser tedavilerinde kullanılmaktadırlar

Kemoterapötik ajan olarak kullanılabilen ATRA'nın;

- AP-1 (aktivasyon protein-1) aktivitesini represe edilerek,
- TGF- β gibi supresör büyüme faktörlerini indükleyerek,
- G1 fazına spesifik olan gen ekspresyon düzenlemelerini yaparak, etki ettiği bilinmektedir (146).

Retinoik asitler epitelyal dokularda gelişim ve onarımdan sorumludur. Bazı kanser hücrelerinde de çoğalmayı ve hücre gelişimini engellemektedirler. Retinoik asitler akciğer, lösemi, cilt, göğüs, prostat, over kanseri gibi birçok

kanser türünde hem tedavi hem de koruma amaçlı kullanılmaktadır. Ancak retinoik asitlerin kanser hücre büyümesini nasıl inhibe edebildiği tam olarak anlaşılamamıştır (147).

Retinoik asitler anti tümör etkilerini tümör hücrelerinin farklılaşmasını indükleyerek göstermektedirler. Farklılaşmayı nükleustaki retinoik asit reseptörleri ve retinoid X reseptörleri aracılığı ile ya da sitoplazmada bulunan hücrel retinoik asit bağlayıcı proteinler üzerindeki gen ekspresyonlarına etki ederek gerçekleştirmektedirler. Böylece metabolizmaları ve hücreye alınımaları değişmektedir.

Retinoidlerin etkilediği birçok reseptör ve gen ekspresyon yolları, retinoidlerin birçok hücrel süreçte etkin olarak rol aldığına göstergesidir.

RL92-2 (Endometriyum kanser hücre hattı) ile yapılan çalışmada retinoik asitlerin tirozin fosfatlayıcı proteinleri inhibe ettiğini rapor ettiği bulgularına dayanarak sinyal iletiminden sorumlu tirozin kinazların anti-kanser ilaç gelişiminde hedef olarak alınabileceği rapor etmişlerdir (148).

MCF-7 (göğüs kanseri hücre hattı) ve MGC80-3 (mide kanseri hücre hattı) hücre hatlarında ATRA'nın hücrelerin büyümesini inhibe ettiğini Fields ve ark. saptamışlardır. Yine aynı çalışmada ATRA ile muamele edilen hücrelerde apoptoz belirtileri olan, nükleus kondensasyonunun ve kromatin fragmentasyonunun açık olarak görüldüğünü bildirmişlerdir (149).

Bununla beraber ATRA güçlü bir antioksidandır ve süperoksit dismutazın etkisini arttırarak serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasını engeller ve böylece oksidatif stres azaltılmış olur (99). Ayrıca oksidatif stresin de HM etiopatogenezinde önemli bir rola sahip olduğu çeşitli çalışmalarla saptanmıştır (46; 47; 48). Bu çalışmalar GTH etiopatogenezinde oksidatif stresin önemini göstermektedir. Bu bilgiler ışığında ATRA'nın oksidatif stresi azaltarak GTH üzerinde etki edebileceği düşünülebilir.

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

apoptotik sinyal yollarının apoptotik yollar üzerine hakim bir konuma geçmesidir. Bu nedenle, ATRA, MTX ve Act-D'nin kombine kullanımına bağlı olarak gözlenen sinerjistik sitotoksitenin apoptotik mekanizmaların aktivasyonu ile gerçekleşip gerçekleşmediğinin araştırılması son derece önemlidir. Bu çalışmada JAR ve JEG-3 hücrelerinde apoptozun derecesi FCM ile belirlendi.

0.1 μ M, 1 μ M ve 10 μ M ATRA JEG-3 ve JAR hücre hattına tek başına uygulandığında sırasıyla %15, %19, %30 ve %14, %17, %24'lük bir apoptoz oranı saptanırken, 2 μ M, 4 μ M ve 8 μ M MTX JEG-3 ve JAR hücre hattına tek başına uygulandığında sırasıyla %40, %48, %53 ve %40, %45, %49'lük apoptoz oranı saptandı. 0.05 μ M, 0.1 μ M ve 0.2 μ M Act-D JEG-3 ve JAR hücre hattına tek başına uygulandığında sırasıyla %17, %23, %36 ve %14, %15, %24'lük bir apoptoz oranı saptandı. İstatistiksel olarak da bulgularda da bahsedildiği gibi kontrol grubuna göre anlamlıydı.

Ancak çalışmamızın asıl önemli çıkarımı olan bulgu ise kombine dozlarda MTX, Act-D ve ATRA'nın apoptoz oranlarına etkisiydi. Üç ilacın da düşük dozlarının kombinasyonu ile elde edilen apoptoz oranı JEG-3 ve JAR hücre hatlarında sırasıyla %54 ve %43 idi ve bu oranlar MTX'in 2 μ M dozunda elde edilen apoptoz oranları olan %40'tan fazlaydı. İstatistiksel olarak anlamlıydı.

İnsan Koryokarsinom hücre hattı modelleri olan JAR ve JEG-3 üzerinde ATRA, MTX ve Act-D kombinasyon uygulaması her iki hücre hattında birden literatürde ilk kez yapılmıştır. Elde edilen bu sinerjistik apoptotik veriler, ATRA, MTX ve Act-D kombinasyonunun Koryokarsinom tedavisinde karşılaşılan çoklu ilaç direnciyle mücadelede kullanılabilecek seçeneklerden biri olabileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmada vitamin A türevlerinden olan ATRA'nın, tek başına JAR ve JEG-3 hücre hattında doza bağlı olarak etki gösterdiği saptanmıştır. MTX ve Act-D ile kombinasyonunda JAR ve JEG-3 hücrelerinde doza bağlı olarak apoptoza neden olmuştur.

Sonuçlar ATRA'nın klasik kemoterapötiklerin başarısız olduğu koşullar için ATRA'nın MTX ve/veya Act-D ile oluşturulacak çoklu ilaç kombinasyon tedavisi için iyi bir seçenek olduğunu 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. 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.
3. Elston CW. Gestational trophoblastic disease. In Fox H Eds. *Obstetrical and Gynaecological Pathology*. 4th Ed., Edinburgh: Churchill Livingstone 1995; 1597-1640.
4. 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.
5. Bleyer WA, Poplack DG. Prophylaxis and treatment of leukemia in the central nervous system and other sanctuaries [Review]. *Semin Oncol* 12: 131–148 (1985).
6. 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).
7. Sathasivam S. Steroids and immunosuppressant drugs in myasthenia gravis. *Nat Clin Pract Neurol*. 2008 June; 4(6): 317-27. Epub 2008 May 20.
8. 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.
9. 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.
10. Conaghan PG, Brooks P. Disease-modifying antirheumatic drugs, including methotrexate, gold, sulfasalazine, antimalarials, and D-penicillamine. *Curr Opin Rheumatol* 1996; 8(3): 176–82.
11. 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.
12. 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.
13. Chytil F. Retinoids in lung development. *FASEB J*. 1996; 9: 986-92.
14. Singh S, Padmanabhan R, Singh G, Kaur G. Effect of maternal hypervitaminosis A during late gestation on pre- & postnatal lung maturation in rat. *Indian J Exp Biol*. 1983; 3:103-7.
15. Packer, L. (1990). *Methods in Enzymology*, "Retinoids" Episode A, Academic Press, San Diego, 13, 16, 43-50.
16. Miller, W.H. (1998) The emerging role of retinoids and retinoic acid metabolism blocking agents in the treatment of cancer. *Cancer*, 83, 1471-1482.
17. Effect of all-trans retinoic acid on tissue dynamics of choriocarcinoma cell lines: an organotypic model Chiu PM, Feng HC, Benbrook DM, Ngan HY, Khoo US, Xue WC, Tsao SW, Chan KW, Cheung AN. *J Clin Pathol*. 2006

- Aug;59(8):845-50. Epub 2006 Feb 6.
18. Palmer JR. Advances in the epidemiology of gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 1994;39:155-162 .
 19. Semer DA, Macfee MS. Gestational trophoblastic disease: Epidemiology. *Semin Oncol*. 1995;22:109-113.
 20. Özalp S, Yalçın ÖT, Tanır HM. Hydatidiform mole in Turkey from 1932 to 2000. *Int J Gynaecol Obstet* 2001; 73:257-8.
 21. 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.
 22. Harma M, Harma M, Yurtseven S, Gungen N. Gestational trophoblastic disease in Sanliurfa, southeast Anatolia, Turkey. *Eur J Gyneacol Oncol* 2005; 26: 306-8.
 23. Özalp S, Yalçın OT, Tanır 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.
 24. Özalp S, Yalçın OT, Elmas E. Elli iki yaşında mol hidatidiform olgusu. *Jinekoloji ve Obstetrik Bülteni*. 2000;9(1):26-28.
 25. Sand PK, Lurain JR, Brewer JI. Repeat gestational trophoblastic disease. *Obstet Gynecol*. 1984;63:140-5.
 26. Oge T, Ozalp SS, Güngör T, Yildirim Y, Sancı M, Dogan A, Ertas IE, Yetimalar H, Dilek S, Celik C. Hydatidiform mole in Turkey: results from six centers. *J Reprod Med*. 2012 May-Jun;57(5-6):259-61.
 27. Özalp S, Yalçın OT, Tanır HM, Etiz E. Recurrent molar pregnancy: report of a case with seven consecutive hydatidiform moles. *Gynecol Obstet Invest* 2001;52(3):215-6.
 28. Kösebay D., Demirkıran F.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda epidemiyoloji, içinde: GTH özel sayısı, Özalp S. (Ed.), *Kadın doğum dergisi*, 2005; Ek 2:96-105.
 29. Bracken MB, Brinton LA, Hayashi K. Epidemiology of hydatidiform mole and choriocarcinoma. *Epidemiol Rev*. 1984;6:52-75.
 30. Grimes DA. Epidemiology of gestational trophoblastic disease. *Am J Obstet Gynecol*. 1984;150:309.
 31. 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.
 32. 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. .
 33. Parazzini F., La Vecchia C, Mangili G, et al. Dietary factors and risk of trophoblastic disease. *Am Obstet Gynecol* 1988;158:93-99.
 34. 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.
 35. Wolf NG, Lage JM: Genetic analysis of gestational trophoblastic disease: A review. *Semin Oncol*, 22:113, 1995.
 36. Weaver DT, Fisher RA, Newlands ES, Paradinas FJ. Amniotic tissue in complete hydatidiform moles can be androgenetic. *J Pathol* 2000; 191:67-70.
 37. Öner Ü. Paşaoğlu Ö.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda Patoloji,

- Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar Özel sayısı, Özalp S.(ed.), Kadın Doğum Dergisi,2005;Ek 2:110-127.
38. 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.
39. Özalp S. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Eğitim Sağlık ve Bilimsel Araştırma Çalışmaları Vakfı Yayınları No. 76, Anadolu Üniversitesi Basım Evi, 1989.
40. 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.
41. Reedline RW, Abdulkarim FW. Pathology of gestational trophoblastic disease.Semin Oncol. 1995;22:96-103.
42. Öner Ü. Komplet ve parsiyel mol hidatidiformda patolojik bulgular. In. Özalp S. ed. Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklar. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi, 1997:39-58.
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 argine 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 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.
47. 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.
48. Harma M, Harma MI, Erel O: Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. Swiss Med Wkly 2003,133: 563-566.
49. Harma M, Harma MI, Kocyigit A, Erel O (2005) Increased DNA damage in patients with complete hydatidiform mole. Mutat Res 583: 49–54.
50. 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.
51. 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.
52. Özalp S.: Gestasyonel trofoblastik hastalıklarda izlem. T Klinikleri Jinekoloji ve obstetri, 14(3):182-186, 2004.
53. L.A. Cole Immunoassay of human chorionic gonadotropin, its free subunits, and metabolites Clin. Chem., 43 (1997), pp. 2233–2243.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. L.A. Cole O-glycosylation of proteins in the normal and neoplastic trophoblast Trophobl. Res., 2 (1987), pp. 139–148.
58. 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.
59. 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.
60. Tyrey L. Human Chorionic Gonadotropin: Properties and assay methods. Semin Oncol. 1995;22:121-129.43.
61. Berkowitz RS, Goldstein DP. Gestational trophoblastic neoplasia. Practical Gynecologic Oncology. Berek JS, Hacker NF, ed, Lippincott Williams and Wilkins, USA, 2000, s. 615-638.
62. Goldstein DP, Berkowitz RS. Prophylactic chemotherapy of complete molar pregnancy. Semin Oncol 1995;22: 157-160.
63. 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. basım yeri bilinmiyor : Gynecol Oncol. 2009;114: 299-305.
64. Ayhan A, Özalp S. Benign trofoblastik Hastalıklar (Hydatidiform mole) 100 olgunun klinik incelenmesi. Hacettepe Tıp / Cerrahi Bülteni. 1982;15(1):56-62.
65. Özalp S, Hassa H, Şener T, Minsin T. Elli dokuz mol hidatidiform olgusunun değerlendirilmesi. Jinekoloji ve Obstetrik Bülteni. 1998;7(2):51-56.
66. Lurain JR, Brewer JI, Torok EE, Halpem B. Natural history of hydatidiform mole after primary evacuation. Am J Obstet Gynecol. 1983;145:591-5.
67. 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.
68. Kohorn EI. Negotiating a staging and risk factor scoring system for gestational trophoblastic neoplasia: a progress report. J Reprod Med 2002;47:445-450.
69. Gestational Trophoblastic Disease: World Health Organization. Technical Report Series 692, WHO, Geneva, 1983.
70. 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.
71. Soper JT. Surgical therapy for gestational trophoblastic disease. JRM. 1994;39:168-74.
72. Özalp S.: Gestasyonel Trofoblastik Hastalıklarda Cerrahi yaklaşım. Jinekolojik ve obstetrikal cerrahi. Güneş Kitapevi, Ankara, 2005, 995-1000.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
 76. 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.
 77. 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.
 78. Homesley HD. Single-agent therapy for nonmetastatic and low-risk gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 1998;43: 69-74.
 79. Osborne R, Gerulath A. What is the best regimen for low-risk gestational trophoblastic neoplasia? A review. *J Reprod Med* 2004;49: 602-16.
 80. Fleisher M. Antifolate analogs: mechanism of action, analytical methodology, and clinical efficacy. *Ther Drug Monit* 1993;15: 521-6.
 81. Treon SP, Chabner BA. Concepts in use of high-dose methotrexate therapy. *Clin Chem* 1996;42: 1322-9.
 82. Matsui H, Iitsuka Y, Suzuka K, Yamazawa K, Mitsuhashi A, Sekiya S. Salvage chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic tumor. *J Reprod Med* 2004;49: 438-42.
 83. 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.
 84. Gordon AN, Gershenson DM, Copeland LJ. High-risk metastatic gestational trophoblastic disease: further stratification into clinical entities. *Gynecol Oncol* 1989;34: 54-56.
 85. Shimizu T, Yaegashi N. Gestational trophoblastic tumors and recent clinical information. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29: 1363-70.
 86. 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.
 87. 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.
 88. 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.
 89. Lurain JR, Nejad B. Secondary chemotherapy for high-risk gestational trophoblastic neoplasia. *Gynecol Oncol* 2005;97: 618-23.
 90. 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.
 91. 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.
 92. 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.
93. 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.
94. 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.
95. Schorge JO, Goldstein DP, Bernstein MR. Recent advances in gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 2000;45: 692-700.
96. Berkowitz RS, Tuncer ZS, Bernstein MR. Management of gestational trophoblastic diseases: subsequent pregnancy experience. *Semin Oncol* 2000;27: 678-685.
97. 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.
98. SIGMA-ALDRICH,(2013), All trans Retinal
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r2500?lang=en®ion=TR>.
99. Ahlemeyer B., E. Bauerbach, M. Plath, M. Steuber, C. Heers, F. Tegtmeier et al. Retinoic acid reduces apoptosis and oxidative stress by preservation of SOD protein level *Free Radic Biol Med*, 30 (2001), pp. 1067–1077.
100. Huang ME, Ye YC, Chen SR, et al. Use of all trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1988; 72: 567-572.
101. Siddikuzzaman, Guruvayoorappan C, Berlin Grace VM (2011) All trans retinoic acid and cancer. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33: 241-249.
102. Ortiz, M.A., Bolan, Y., Hernandez, F.J. ve Piedrafita, F.J. (2002), Retinoids in combination therapies for the treatment of cancer: mechanism and perspectives, *Drug Resistance Updates*, 5, 162-175.
103. Alique, M., Herrero, H.J. Lucia C: All-trans retinoic acid induces COX-2 and prostoglandin E2 synthesis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells: involment of retinoic acid receptors and extracellular-regulated kinase1/2, 2007, *J Neuroinflammation*, 4, 1-9. .
104. Low molecular weight heparin-all-trans-retinoid acid conjugate as a drug carrier for combination cancer chemotherapy of paclitaxel and all-trans-retinoid acid, *Carbohydr. Polym.*, 86 (2011), pp. 1157–1166. L. Hou, Y. Fan, J. Yao, J. Zhou, C. Li, Z. Fang, Q. Zhang.
105. Mandili, G., Marini, C., Carta, F., Zanini, C., Prato, M., Khadjavi, A., Turrini, F. Giribaldi, G.: Identification of phosphoproteins as possible differentiation markers in all-trans-retinoic acid-treated neuroblastoma cells, *PLoS One*, 6 (2011), p. e18254.
106. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 1. Cilt. 11. baskı. Ankara. Hacettepetas Yayıncılık 2005. 317- 347.
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. 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.
113. McEvoy GK, ed. Methotrexate. Bethesda, MD:AHFS drug information 2004. American Society of Health-System Pharmacists; 2003:1082-9.
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. SIGMA-ALDRICH,(2013),Actinomycin D,
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/6/a1410dat.Par.0001.File.tmp/a1410dat.pdf>.
116. Goldberg, I.H., Rabinowitz, M., Reich, E., 1962, Basis of Actinomycin Action, I. DNA Binding and Inhibition of RNA-Polymerase Synthetic Reactions by Actinomycin, *Biochemistry*, 48, 2094-2099.
117. Sawicki, S.G., Godman, G.C., 1971, On the Differential Cytotoxicity of Actinomycin D, *The Journal of Cell Biology*, 50, 746-761.
118. Abd El-Aal H, Habib E, Mishrif M (2005). "Wilms' Tumor: The Experience of the Pediatric Unit of Kasr El-Aini Center of Radiation Oncology and Nuclear Medicine (NEMROCK)". *J Egypt Natl Canc Inst* 17 (4): 308–11.
119. Jaffe, N.; Paed, D.; Traggis, D.; Salian, S.; Cassidy, J. R. (1976). "Improved outlook for Ewing's sarcoma with combination chemotherapy (vincristine, actinomycin D and cyclophosphamide) and radiation therapy". *Cancer* 38 (5): 1925–1930.
120. Turan T, Karacay O, Tulunay G, Boran N, Koc S, Bozok S, Kose M (2006). "Results with EMA/CO (etoposide, methotrexate, actinomycin D, cyclophosphamide, vincristine) chemotherapy in gestational trophoblastic neoplasia". *Int J Gynecol Cancer* 16 (3): 143.
121. Khatua S, Nair C, Ghosh K (2004). "Immune-mediated thrombocytopenia following dactinomycin therapy in a child with alveolar rhabdomyosarcoma: the unresolved issues". *J Pediatr Hematol Oncol* 26 (11): 777–9.
122. Kleeff, J., Kormann, M., Sawhney, H., Korc, M., 2000, Actinomycin D Induces Apoptosis and Inhibits Growth of Pancreatic Cancer Cells, *International Journal of Cancer*, 86, 399-407.
123. Hepatocytes sensitized to tumor necrosis factor- alpha cytotoxicity undergo apoptosis through caspase-dependent and caspase-independent pathways, 2000, *Journal of Biological Chemistry*, 275 (1), 705-712. Jones, B.E., Lo, C.R., Liu, H., Srinivasan, A., Streetz, K, Valentino, K.L., Czaja, M.J.
124. Leist, M., Gantner, F., Naumann, H., Bluethmann, H., Vogt, K., Brigelius-flohe, R., Nicotera, P., Volk, H., 1997, Tumor Necrosis Factor-Induced Apoptosis During the Poisoning of Mice With Hepatotoxins, *Gastroenterology*, 112, 923-934.
125. Burrows, M. T. The cultivation of tissues of the chicken embryo outside the

- body. (1910) JAMA 55, 2057.
126. Gey, G. O., Coffman, W. D. and Kubicek, M.T. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 12, 364-365.
127. Akbaba, G., Sunay, Ç., Hayvan Deneyleri Yararsız ve Acımasız Çalışmaları, Sağlığımız İçin Önemli Bir Gereksinim mi? *Bilim ve Teknik*, Mayıs 2000.
128. Helfrich, M.H., Ralston, S.H., Bone research protocols, Humana Press Inc., Totowa, 2003.
129. Brauner, A., Kaden, P., Human gingival fibroblast cultures for biological intra-oral material testing. *Z. Stomatol.*, 86(8), 533-8., 1989.
130. Topal, Ş.R., Hücre kültür teknikleri-II Uygulamalar, Cemturan Ofset Matbaası, İstanbul, 138-140. 2004.
131. 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.
132. 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.
133. An improved β -lactamase reporter assay: multiplexing with a cytotoxicity readout for enhanced accuracy of hit identification, 2007, *Journal of Biomolecular Screening*, 12, 635-644. Halis, T.M., Kop, L.A., Gibson, J., Lebakken, S.C., Hancock, M., Kramer, H.K. ve Etienne, T.T.
134. Weyermann, J., Lochmann, D. ve Zimmer, A. (2005), A practical note on the use of cytotoxicity assays, *International Journals of Pharmaceutics*, 288, 369-376.
135. 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.
136. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-259.
137. Mayall, B.H., Casperion, T.O.: selected publications, *Cytometry* 5:314, 1984.
138. Kamensky, L.A., Memaled, M.R.: Spectrophotometric cell sorter *Science* 156:1364, 1967.
139. Kamensky, L.A., Memaled, M.R., Dierman, H.: Spectrophotometer: New instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* 150:630. 1965.
140. Tung JW, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin Lab Med.* 2007; 27(3): 453-68.
141. 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.
142. Meers P and Mealy T: Phospholipid determinants for annexin V binding sites and the role of tryptophan. 1994, *Biochemistry* 33 (19): 5829-37.
143. Morrone S (2007) Annexin V. *Purdue Cytometry CD-ROM Series*, volume 4.
144. 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.
145. Phenotype based drug screening in primary ovarian carcinoma cultures identifies intracellular iron depletion as a promising strategy for cancer treatment, *Biochemical Pharmacology*, 82, 139-47. Gullbo, J., Fryknä, M., Rickardson, L.,

- Darcy, P., Hägg, M., Wickström, M., Hassan, S., Westman, G., Brnjic S., Nygren, P., Linder, S. ve Larsson, R. 2011.
146. Sherman, H., Gutman, R., Chapnik, N., Meylan, J., Coutre, J. ve Froy, O. (2011). All trans retinoic acid modifies the expression of clock and disease marker genes, *Journal of Nutritional Biochemistry*.
147. Um, J.S., Lee, S.Y., Kim, E.J., Han, H.S., Koh, Y.M., Hong, K.J., Sin, H.S. ve Park, J.S. (2001), Antiproliferative mechanism of retinoid derivates in ovarian cancer cells, *Cancer Letters*, 174, 127-134.
148. Carter, A.K. ve Bellido, T. (1999), Decrease in protein tyrosine phosphorylation is associated with F-actin reorganization by retinoic acid in human endometrial adenocarcinoma (RL95-2) cells, *Journal of Cellular Physiology*, 178, 320-332.
149. Fields, A.L., Soprano, D.R. ve Soprano, K.J. (2007), Retinoids in Biological Control and Cancer, *Journal of Cellular Biochemistry*, 102, 886-889.

8. Ekler

8.1. Ek 1 Etik kurul kararı



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

20

TOPLANTI TARİHİ : 17/04/2012
TOPLANTI NO : 2012/09

KARARLAR :

- 4- Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Müge HARMA'nın sorumluluğunda yapılacak olan 2012-56-03/04 Protokol no'lu "All-trans Retinoik asit, Metotreksat ve Aktinomisin D Kemoterapilerinin Farklı Koryokarsinom Hücre Kültür Modelleri Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması" konulu çalışmanın Etik Kurallara uygunluğuna,

Oy birliği 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