

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PARASETAMOL VE RESVERATROL'ÜN MDAH-2774
İNSAN OVER KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
GEMSİTABİN'LE SİTOTOKSİSİTELERİ VE
PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. A. Şenol ERTÜRKOĞLU

Dr. Şule AYLAK

İSTANBUL 2007

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PARASETAMOL VE RESVERATROL'ÜN MDAH-2774
İNSAN OVER KANSERİ HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE
GEMSİTABİN'LE SİTOTOKSİSİTELERİ VE
PROLİFERASYON ÜZERİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

**Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından desteklenmiştir.**

Proje No: Yeni Sağlık Kod: T-704/30062005

Tez Danışmanı : Prof. Dr. A. Şenol ERTÜRKOĞLU

Dr. Şule AYLA

İstanbul-2007

ÖNSÖZ

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı uzmanlık eğitimim süresince, her türlü yardımı esirgemeyen ve çalışmalarımı destekleyen Sayın Prof.Dr. A.Şenol Ertürkoğlu'na,

Bilimsel çalışmalara olan inancı, çalışmak ve öğrenmek isteyen öğrencilerine karşı gösterdiği sınırsız destek ve bitmek tükenmek bilmeyen çalışma azmiyle bana araştırma laboratuvarının kapılarını açan, beni hücre kültürü ile tanıştıran ve hep ileriye bakmamı sağlayan Sayın hocam Prof.Dr. Ayhan Bilir'e,

Ayrıca bana destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. İsmail Seçkin, Sayın Prof.Dr. Hüseyin Oktar, Sayın Prof.Dr. Mustafa Taşyürekli, Sayın Prof.Dr. Faruk Alkan, Sayın Prof.Dr. Oktay Arda'ya,

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalının Elektron mikroskobunun kapılarını açan Sayın Prof.Dr. Serap Arbak'a,

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve hücre kültürü laboratuvarında bana yardımcı olan Füsun Öncü ve Selahattin Ünal'a, elektron mikroskobu çalışanları ile tüm mensuplarına ve tezimi hazırlarken bana yardımcı olan sevgili Mine Ergüven'e ve Dr. Şebnem Batur'a,

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı elemanlarına ve asistan arkadaşlarıma,

Bana onkolojiyi sevdiren, bilgi ve dostluğunu esirgemeyen sevgili arkadaşım Yrd.Doç.Dr. Gülperi Öktem'e,

Sevgi ve ilgileri ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Boğaçhan Ayla ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Dr. Şule AYLA

2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
GİRİŞ ve AMAÇ	1
A.GENEL BİLGİLER	2
1.Over Embriyolojisi.....	2
2.Over Histoloji.....	3
3.Over Kanseri.....	4
4.Projede Kullanılan İlaçlar.....	6
a.Gemsitabin.....	6
b.Parasetamol.....	8
c.Resveratrol.....	11
5.Hücre Kültürü.....	12
a.Hücre Siklusu (Döngüsü).....	13
b.Hücre Siklusu Kantitatif Analizi.....	13
6.İmmünohistokimya.....	14
7.Bromodeoxyuridine (BrdU).....	15
GEREÇ VE YÖNTEM	16
A.HÜCRE KÜLTÜRÜ	16
B.DENEY PROTOKOLLERİ	16
1.Doz Belirleme Deneyi.....	16
2.Tutunma (Proliferasyon) Deneyi ve Canlılık Tayini.....	17
3.İki Boyutlu Kültürlerde BrdU İle İmmunhistokimyasal İşaretleme.....	17
4.İki Boyutlu Kültürlerin Elektron Mikroskopik Değerlendirme İçin Hazırlanması.....	18
C.İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	19
BULGULAR	20
A.DENEY SONUÇLARI	20
1.Hücre Proliferasyonunun Kinetik Deneylerinin Bulguları.....	20
2.Sitotoksosite Verileri.....	21
3.İki Boyutlu Kültürlerde BrdU İşaretleme İndeksi.....	22
4.İki Boyutlu Kültürlerin Elektron Mikroskopik Değerlendirilmesi.....	29

TARTIŞMA	36
SONUÇ	42
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	48

KISALTMALAR

ATCC	: Amerikan Tip Kùltür Koleksiyonu
BrdU	: Bromodeoksiüridin
BrdU-LI	: BrdU- İşaretleme indeksi
DNA	: Deoksiribonùkleik asid
dFdC	: 2,2-difluorodeoksisitidin
dFdCDP	: 2,2-difluorodeoksisitidin difosfat
dFdCTP	: 2,2-difluorodeoksisitidin trifosfat
dFdCU	: 2',2'-difluorodeoksiüridin
ELISA	: Eliza (enzim-linked immunosorbent assay)
FCS	: Fötal Sığır Serumu
LI	: Labeling İndeks (İşaretleme İndeksi)
NSAII	: Steroid olmayan inflamatuvar ilaç
Nf-κB	: Nùkleer Faktör Kapa B
ID50	: İnkübe edilen hücrelerin %50'sinin öldüğü değer
PBS	: Fosfat Tampon
RNA	: Ribonùkleik asid
RES	: Resveratrol
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa

ŞEKİL, TABLO ve RESİM DİZİNLERİ

Şekil Listesi

Şekil 1. Gemsitabin

Şekil 2. Parasetamol

Şekil 3. Resveratrol

Tablo Listesi

Tablo 1. Zamana Bağlı Hücre Çoğalma Verileri (cell survival fraction)

Tablo 2. Zamana Bağlı Hücre Sitotoksosite Verileri

Tablo 3. İki boyutlu tümörlerde BrdU ile işaretleme grafiği

Resim Listesi

Resim1. Kontrol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim 2. Kontrol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim 3. Resveratrol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim 4. Resveratrol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim 5. Parasetamol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim 6. Parasetamol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı

Resim 7. Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı

Resim 8. Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim 9. Resveratrol + Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim10. Resveratrol + Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim11. Parasetamol + Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim12. Parasetamol + Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat BrdU ile işaretli ışık mikroskop fotoğrafı.

Resim13. Kontrol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat sonu elektron mikrografi.

Resim14. Kontrol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat sonu elektron mikrografi.

Resim15. Resveratrol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat sonu elektron mikrografi.

Resim16. Resveratrol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat sonu elektron mikrografi.

Resim17. Parasetamol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat sonu elektron mikrografi.

Resim18. Parasetamol grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat sonu elektron mikrografi.

Resim19. Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat sonu elektron mikrografi.

Resim 20. Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat sonu elektron mikrografi.

Resim 21. Resveratrol + Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat sonu elektron mikrografi.

Resim 22. Resveratrol + Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat sonu elektron mikrografi.

Resim23. Parasetamol + Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 24.saat sonu elektron mikrografi.

Resim24. Parasetamol + Gemsitabin grubu, iki boyutlu kültürlerde MDAH-2774 over tümör hücrelerinde 96.saat sonu elektron mikrografi.

ÖZET

Çalışmamızda, doğal bir polifenolik bileşik olan resveratrol, deoksisitidin analogu nükleozid yapıda bir antimetabolit olan Gemsitabin ve para-aminofel türevi Parasetamolün ayrı ayrı ve bir arada kullanıldıklarında MDAH-2774 over tümörü hücre soyu üzerine etkileri iki boyutlu tümör hücre kültürü modelleri kullanılarak incelendi. Kültürde üç ilacın etkileri 24, 48, 72 ve 96. saatlerde hücre çoğalması, hücre sitotoksitesi (tripan mavisi testi), hücre siklusu sentez fazı ve hücre yapısı açısından değerlendirildi.

Resveratrol, iki boyutlu kültürlerde hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösterdi ve hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde azalma meydana getirdi ($p<0,05$). Elektron mikrograflarda yapısal değişiklikler izlendi.

Gemsitabin, iki boyutlu kültürlerde hücre çoğalmasını azaltıcı etki gösterdi ve hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde diğer ilaç gruplarına göre daha belirgin bir azalma meydana getirdi ($p<0,05$). Elektron mikrograflarda izlenen yapısal değişiklikler, resveratrol grubuna göre daha bozuk bulundu.

Parasetamol, iki boyutlu kültürlerde hücre çoğalmasını kontrol grubuna göre daha azaltıcı etki gösterse de ($p<0,05$), diğer ilaç gruplarına göre artırdı. Hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde ise kontrol grubu ile parasetamol arasında benzer etkiler görüldü. Elektron mikrograflarda izlenen yapısal değişikliklerde parasetamol ve kontrol grubu arasında fark görülmedi.

Kombinasyon gruplarında, iki boyutlu kültürlerden elde edilen bulgular gemsitabin ve resveratrol grubunun tek tek uygulamaları ile elde edilen bulgulardan daha güçlü olmak üzere benzerdi.

Sonuç olarak; gemsitabin, resveratrol ve parasetamol kombinasyonunun MDAH-2774 over tümörü hücreleri üzerine etkileri iki boyutlu kültür modellerinde incelendiğinde, bu maddelerin hücre siklusunda, sentez fazındaki hücrelerin sayısını azalttığı, hücre proliferasyonunu önlediği ve hücre yapısında bozulmaya yol açtığı gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Gemsitabin, Resveratrol, Parasetamol, MDAH-2774 over tümör hücresi, hücre kültürü

SUMMARY

Cytotoxicity of Paracetamol and Resveratrol with Gemcitabine and effect on cell proliferation in MDAH 2774 Human Ovarian Cancer Cell Line

In this study, effects of resveratrol as a natural polyphenol compound, gemcitabine as an antimetabolite which has nucleoside structure, analogous of deoxycytidine and para aminophenol derivated paracetamol were investigated with single and combined applications in monolayer MDAH-2774 human ovarian cancer cell line. Drugs were evaluated in cell culture with respect to cell proliferation, cell cytotoxicity (trypan blue dye exclusion test), synthesis phase of cell cycle and cell structure in 24, 48, 72, 96 h.

Resveratrol has diminished both cell proliferation and cell cycle synthesis phase indication in monolayer cell cultures ($p < 0,05$). Structural changes were also observed in electron micrographs.

Gemcitabine has demonstrated a decreasing effect in cell proliferation and marked reduce according to other drug groups were observed in cell cycle synthesis phase indication in monolayer cell cultures ($p < 0,05$). Structural changes observed in electron micrographs showed more impairment in respect to resveratrol.

Even paracetamol has shown a decreasing effect in cell proliferation compared to control group in monolayer cell cultures ($p < 0,05$), this effect increased with respect to other drugs. Similar effects were observed in both control and paracetamol group in cell cycle synthesis phase indication. No structural changes were observed in electron micrographs in both the control and paracetamol group.

All combination groups showed similar effects that were mainly more effective in respect to single usage of resveratrol and gemcitabine in monolayer cell culture.

As a result, the effects of gemcitabine, resveratrol and paracetamol were investigated in monolayer MDAH-2774 human ovarian cancer cell line and a decrease in cell number in cell cycle synthesis phase, prevention of cell proliferation and destruction of cell structure were observed.

Keywords: Gemcitabine, Resveratrol, Paracetamol, MDAH-2774 human ovarian cancer cell line, cell culture.

GİRİŞ VE AMAÇ

Over kanserleri jinekolojik kanserler arasında çok yüksek mortalite oranına sahiptir. Evre III tümörlerde 5 yıllık yaşam süresi % 28 olarak bilinmektedir ve hastaların % 60'ın da tümör son evresinde teşhis edilebilmektedir. Cerrahi ve sitotoksik tedavinin sınırlı başarısı nedeniyle, toksik olmayan, over kanser hücresinde duyarlılık yaratacak sitotoksik ajanlar tedavide adres olmuştur (1). Over kanserinin büyüme ve metastazı, diğer solid tümörlerde olduğu gibi, hücreler arası yapının bozulması, hücrel yapışma, hücre göçü, invazyon, çoğalma ve yeni damar oluşumunu içeren ve tümör çevresinde gelişen bir dizi olaylar zincirini gerektirir (2).

Gemsitabin (2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine monohydrochloride, Gemzar®) deoksisitidin analogu, pirimidin nükleozidi yapısında bir antimetabolittir. Gemsitabin, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde, etopozid ve cisplatin kombinasyonuna eşdeğer düzeyde tümör inhibisyonu sağlar. İlerlemiş ve cisplatine direnç kazanmış over kanserli hastaların %20'si gemsitabin tedavisine yanıt vermektedir (3). Gemsitabin başlıca etkisini, DNA polimeraz ve ribonükleotid redüktaz enzimleri üzerinden DNA sentezini engelleyerek gösterir (4).

Parasetamol, Para-aminofel türevi nonsteroid (steroid olmayan) antiinflamatuvar (NSAI) ve narkotik olmayan, ağrı kesici (analjezik) ve ateş düşürücü (antipiretik) etkisi yüksek olan bir ilaçtır, antiinflamatuvar ilaçların analjezik etkisini artırmak için onlarla birlikte kullanılabilir, ancak trombositik etkinliği zayıftır; kanama süresini değiştirmez (5).

Resveratrol (3,4,5 trihidroksistilben) üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan polifenol yapıda doğal bir antioksidan maddedir. Resveratrolün antioksidan, antitümör ve östrojenik etkiye sahip olduğu yolunda bir çok literatür bulunmaktadır (6, 7). Kanser tedavisinde çeşitli doğal veya sentetik maddeler, hücre poliferasyonunu engellemesi ve apoptozu tetiklemesi nedeniyle kullanılmaktadırlar. Polifenolik bileşiklerden resveratrolün de hücre sinyal kaskatında çeşitli mekanizmalarla kanseri önleyici aktivitesi gösterilmiştir (8).

Biz de bu çalışmamızda, Gemsitabin, parasetamol ve resveratrolün MDAH-2774 hücre soyunda, hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerine in vitro etkilerini doz ve zamana bağlı olarak araştırmayı amaçladık.

A.GENEL BİLGİLER

1. Over Embriyolojisi

Cinsiyetin farklanması, bir kısmı da otozomal olan birçok geni içine alan kompleks bir süreçtir. Cinsiyetin ikiye ayrılmasındaki anahtar, seksü belirleyen bölgesinde, testis belirleyici faktör genini taşıyan Y kromozomudur. Bu faktörün varlığı veya yokluğu, gonadal farklanma üzerinde doğrudan etkilidir ve aynı zamanda bir şelale gibi Y kromozomundan aşağı doğru, birçok başka genin de rudimenter cinsiyet organlarının kaderini tayin etmek için harekete geçmesini sağlayacak olan düğmeyi çevirir (9).

Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan daha fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildirler (10).

Gonadlar başlangıçta bir çift uzunlamasına, sölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş, genital veya gonadal kabarıklık halinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına kadar genital kabarıklıklar içinde germ hücreleri mevcut değildir.

Primordiyal germ hücreleri, insan embriyosunda gelişimin erken evrelerinde, yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler. Ameboid hareketlerle, son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada da genital kabarıklıkları işgal ederler. Kabarıklıklara ulaşamadıkları takdirde, gonadlar gelişemez. Gonadların over veya testise farklanmasında, primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır (9).

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşılmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabarıklığın sölomik epitel proliferasyonu olur ve epitel hücreleri altındaki mezenşim doku içine girerler. Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen irregüler şekilli kordonları oluştururlar. Hem erkek, hem de dişi embriyolarında bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir. İşte bu devredeki gonad, farklılaşmamış gonad olarak bilinir (9).

Farklılaşmamış gonadın kortikal bölgesi, başlangıçta primer seks kordonları içerir. Bu kordonlar, sölom epitelinden mezenşim içine uzanır (11).

Y kromozomu olmayan ve XX cinsiyet kromozom komplemanına sahip olan dişi embriyolarda, primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır. Primitif germ hücreleri grupları içeren bu kümeler, daha çok overin medullar kısmında yerleşmişlerdir. Daha sonra, bunlar kaybolur ve yerlerini over medullasını oluşturan vasküler bir stromaya bırakırlar.

Dişi gonadın yüzeyel epitelyumu, erkeklerdekinin aksine çoğalmaya devam eder. Yedinci haftada bunlardan, alttaki mezenşim içine girmesine rağmen, gene de yüzeye yakın kalmaya devam eden ve kortikal kordonlar adı verilen ikinci nesil kordonlar gelişir. Dördüncü ayda, bu kordonlar her biri bir veya daha çok sayıdaki primitif germ hücrelerini çevreleyen izole hücre topluluklarına ayrılırlar. Bu germ hücreleri zamanla oogoniaya dönüşürken, yüzey epitelinden aşağıya göçen ve germ hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden de folliküler hücreler meydana gelir.

Embriyonun cinsiyetinin fertilizasyon sırasında belirlenir ve tümüyle spermatositin X veya Y kromozonuna sahip olup olmamasına bağlıdır. XX cinsiyet kromozomuna sahip bir embriyoda, gonadın meduller kordonları geriler ve kortikal kordonların sekonder generasyonu oluşur. XY cinsiyet kromozomu taşıyan embriyolarda ise, meduller kordonlar, testis kordonlarına dönüşür ve sekonder kortikal kordonlar gelişemez (9).

2. Over Histoloji

Over ortalama 3 cm uzunluk, 1.5 cm genişlik ve 1 cm kalınlıkta badem şeklindedir. Gevşek bağ dokusu içinde damardan zengin bir yapı gösteren **meduller bölge** ile oosit içeren over foliküllerinin bol miktarda bulunduğu **kortikal bölge**den meydana gelir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır görülmez.

Korteks bölgesinin stroması karakteristik iğsi şekilli fibroblastlardan meydana gelir. Over yüzeyi **germinal epitel** ismini alan tek katlı yassı ya da kübik epitel ile örtülüdür. Germinal epitel altında, stroma, **tunika albuginea** denen sınırları belirsiz bir tıkkız bağ dokusu tabakası oluşturur. Tunika albuginea ovaryumun açık renkte görünmesini sağlar (12).

Ovaryumun fonksiyonları:

- 1- Dişi gametin üretimi
- 2- Östrojen ve progesteron salgılanması
- 3- Sekonder seks karakterlerinin gelişimi(11).

3. Over Kanseri

Dünyada over kanserleri kadınlarda altıncı, batı dünyasında beşinci ve kanser mortalitesinde dördüncü sırada yer alır. A.B.D’de kanser ölümlerinin %5’ini oluşturur. Bu ülkede gelişim oranı %1,4 olup, ülkelere göre farklılık gösterir. Japonya’da %0,45, İsviçre’de %1,7’dir (13). ABD’de 40 yaş üzeri kadınlarda over kanseri görülme oranı %0,12 iken bunların sadece %0,2-3’ü tedavi edilebilmektedir. Hastaların çoğu, tekrarlayan tümörlerin bağırsak yüzeyine yapışması sonucu gelişen tıkanıklık ve beslenme bozukluğu sonucu ölmektedir (14).

Uzun zamandan beri over kanserine ailevi yatkınlık bilinmekte birlikte, ancak son yıllarda genetik etkenler belirlenebilmiştir. Ailevi over kanserlerinin % 90’ının BRCA1 (meme kanseri geni 1) ve BRCA2 (meme kanseri geni 2) gen mutasyonlarıyla ilgili olduğu saptanmıştır. BRCA gen mutasyonu taşıyıcısı bir kadında yaşam boyu over kanseri gelişme riskinin %15-60 arasında olduğu tahmin edilmektedir (15).

Over kanseri ileri yaş hastalığıdır. Epidemiyolojik verilere göre, 40 yaş altında insidans oldukça düşük olmasına rağmen, ellili yaşlarda görülme sıklığında belirgin bir artış izlenmektedir ve ilerleyen yaşla birlikte prognoz kötüleşmektedir (16).

Doğum kontrol hapı kullanımının over kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir. İnfertilite tedavisi, erken menarş ve geç menapoz, hormon yerine koyma tedavisi, diyet ve obesite etyopatogeneizde yer aldığı düşünülen, ancak net olarak ispatlanmamış etkenler arasındadır (16).

Yüzey epiteli kökenli tümörler over tümörlerinin büyük bir bölümünü (ortalama %70), bu tümörlerin malign tipleri ise tüm over kanserlerinin yaklaşık % 90’ını oluşturmaktadır.

Epitelyal over tümörleri, fallop tüp epiteli, endometriyum, endoserviks, ya da ürogenital traktusun epitel özelliklerini taşıyabilirler ve histolojik olarak şu şekilde sınıflandırılırlar (16).

- Seröz tümörler
- Müsinöz tümörler
- Endometrioid tümörler
- Berrak hücreli tümörler
- Brenner tümörleri

- İndiferansiye karsinomlar
- Mikst epitelyal tümörler

Overin epitelyal tümörlerinde histolojik değerlendirme (grade), prognozla ilişkili olduğundan çok önemlidir ve değerlendirme göz önüne alındığında over kanserleri şu şekilde sınıflandırılır (17).

- G1: iyi diferansiye
- G2 : orta derecede diferansiye
- G3: az diferansiye

Tüm kanserlerde olduğu gibi, over kanserlerinde de tedavinin başarısı erken tanıya bağlıdır. Ancak erken evrede semptomların belirgin olmaması, hastaların genellikle ellili yaşlarda olmaları ve bu yaş grubundaki hastaların utanma duygusuyla daha az doktora gitmeleri tanıyı zorlaştıran etkenlerdendir. İleri evrede artan asit oluşumuna bağlı batın gerginliği, genelde hastaların doktora ilk başvuru şikayetidir ve buna bağlı olarak, tüm epitelyal over kanserlerinin üçte ikisi tanı anında evre III ya da evre IV'tür (17).

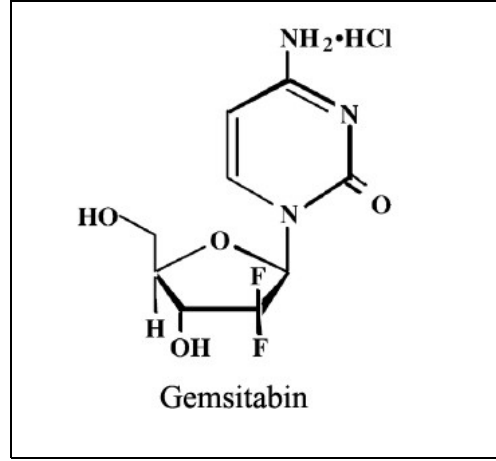
Over kanserlerinin taranmasında tümör belirteçleri ve ultrasonografinin değeri ileriye yönelik çalışmalarda henüz kesin olarak belirlenmiş değildir. Son yıllarda transvajinal ultrasonografideki ilerlemelerle birlikte, erken evre over kanserlerinin saptanmasında %95 başarıya ulaşılmıştır (14)

Ca 12.5, tümör belirteçlerinden biri olmakla birlikte, asıl kullanım alanı, tanısı konulmuş tümörün takibi ve tedaviye yanıtının değerlendirilmesi şeklindedir. İdeal tümör belirtecinin tümöre özgün olması ve seviyesinin tümör varlığı ve büyüklüğü ile artması gerekir. Ancak bu özellikler, over kanserleri için, Koryokarsinom'daki β -HCG ve Yolk Kesesi tümörlerindeki AFP hariç, Ca 12.5 de dahil olmak üzere, hiçbir belirteç için tam olarak sağlanamamıştır (18).

Over kanserinin tanısı laparotomi ile konulur (18). İleri evre kabul edilen olgularda en uygun ' tümör küçültücü cerrahi ' uygulanmalıdır. Tümör küçültücü cerrahi, tanım olarak, mümkün olan tüm tümörün çıkarılmasını, eğer tümörün tamamını çıkarılamıyorsa arta kalan tümör boyutlarının 1-2 cm'den küçük olmasını hedefler. Kemoterapi protokollerine en duyarlı tümörlerden biri olmasına rağmen, over kanserinde ölüm oranı halen yüksektir. Radyoterapi, immünoterapi ve hormon tedavisi, cerrahi ve kemoterapi sonrası uygulanabilen tedaviler arasındadır (14).

4. Projede Kullanılan İlaçlar

a.Gemsitabin:



Şekil 1: Gemsitabin

Gemzar® ; 200 mg gemsitabine eşdeğer gemsitabin hidroklorür içerir. Gemsitabin (2,2-difluorodeoksisitidin, Gemzar®) deoksisitidin analogu nükleozid yapıda bir antimetabolittir.

Nükleozid analogları örneğin arabinozil sitozin akut myeloid lösemi'nin indüksiyon tedavisinde ana elemanı temsil eder ve gemsitabin de arabinozil sitozinde (Ara-C) yapılmış bir moleküler modifikasyonla solid tümörlerde de aktif hale geçirilmiş, yeni bir antineoplastik ajandır (19).

Gemsitabin (dFdC: 2,2-difluorodeoksisitidin) deoksisitidin analogu pirimidin antimetaboliti'dir. Gemsitabin, hücre içerisinde nükleozid kinazlar tarafından, aktif difosfat (dFdCDP: 2,2-difluorodeoksisitidin di fosfat) ve trifosfat (dFdCTP: 2,2-difluorodeoksisitidin trifosfat) nükleozidlere metabolize olur. Gemsitabin sitotoksik etkisini, dFdCDP'nin iki etkisiyle DNA sentezini inhibe ederek gösterir. Önce dFdCDP'nin, DNA sentezinde kullanılan deoksinükleozid trifosfatların oluşmasıyla sonuçlanan reaksiyonlardan tek katalizör olarak sorumlu bulunan *ribonükleotid*

redüktaz'ı inhibe eder. Bu enzimin dFdCDP tarafından inhibisyonu, genelde deoksitükleosid ve özellikle de dCTP konsantrasyonlarının azalmasına neden olur(4).

Gemsitabin DNA yapısına direkt olarak da konjuge olur. Hücre içerisindeki dCTP konsantrasyonunun azalması, dFdCTP'nin DNA yapısına daha da fazla girmesine neden olur. DNA polimeraz epsilon temelinde, gemsitabini uzaklaştırabilme ve uzamakta olan DNA bantlarını onarabilme yeteneğine sahip değildir. Gemsitabin DNA yapısına girdikten sonra, büyümekte olan DNA bantlarına sadece tek bir nükleotid eklenir. Bu eklenmeyle DNA sentezinin daha fazla ilerlemesi tamamen durdurulur (maskeli zincir terminasyonu). Ardından gemsitabin, DNA'nın yapısına girdikten sonra apoptoz olarak bilinen programlanmış hücre ölümü sürecini başlatır.

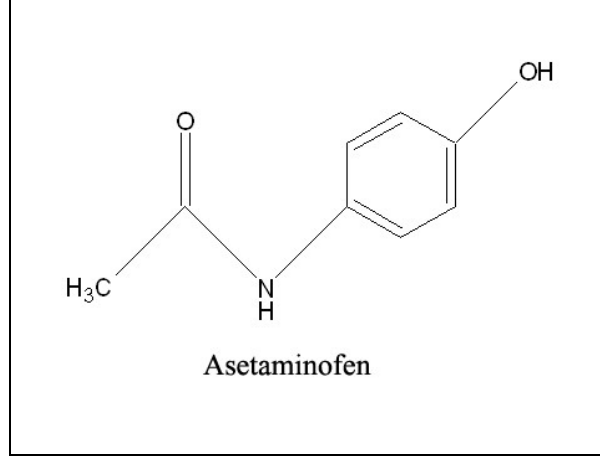
Gemsitabin, karaciğerde, böbrekte, kanda ve diğer dokularda bulunan sitidin deaminaz tarafından dFdU (2,2-difluoro-deoksiüridin) oluşturacak şekilde metabolize edilir. Gemsitabin metaboliti olan dFdU dokulara yaygın bir şekilde dağıtılır ve daha ileri transformasyona uğramaksızın idrara çıkarılır(4).

Farmokinetik özelliklerin hastanın yaşından etkilendiği gözlemlenmektedir. Otuz dakikalık infüzyondan (100mg/m²'lik tek doz) hemen sonra elde edilen plazma gemsitabin pik konsantrasyonları, 10-40 µg/ml arasında değişir. Gemsitabin plazma konsantrasyonlarını en iyi, terminal yarılanma ömrü 17 dakika olan çift aşamalı bir eğri ile tanımlar. En çok 1.1 saat süreli infüzyonlarla verilen 1000-2500 mg/m²'lik tek dozlardaki yarılanma ömrü 11-26 dakikadır. Daha uzun süreli infüzyonları takiben (3.6-4.3 saat) 2500-3600 mg/m²'lik tek gemsitabin dozlarının yarı ömürleri 18.5-57.1 dakika arasında gerçekleşir. Çoğul dozlardan sonraki gemsitabin yarılanma ömrü, infüzyon süresinden bağımsız olarak tek dozlarla gözlenenenden daha uzundur. Çok aşamalı tedavilerle uygulama, gemsitabin dağılımında değişikliğe neden olmaz. Gemsitabin ortalama böbrek atılımı, 2-7 L/saat/m² arasında değişir.

Gemsitabin dozunun her hafta tekrarlanması durumunda bir sonraki dozdan hemen önce ölçülen plazma konsantrasyonları, mililitrede 0.007-1.2 µg arasında değişir ve tekrarlayan dozlarla vücutta birikim oluşmaz. Aktif metabolit olan dFdCTP, periferik kandaki mononükleer hücrelerden ayrıştırılabilir. Bu hücrelerden elde edilen dFdCTP'nin son eliminasyon yarı ömrü 0.7-12 saat arasında değişmektedir. Hücre içi dFdCTP konsantrasyonları 35-350 mg/m²/30 dakika arasında değişen infüzyon hızlarında gemsitabin dozuyla orantılı olarak artar ve bu durum 0.4 µg/mL ile 5µg/mL arasında değişen en yüksek plazma konsantrasyonlarıyla sonuçlanır. 1000 mg/m²/30 dakikalık bir gemsitabin dozundan sonra ilk 30 dakika boyunca 5 µg/mL'nin üzerinde

kalan plazma gemitabin konsantrasyonlarının, bundan sonraki 1 saat boyunca 0.4 µg/mL'nin üzerinde olması beklenir (4).

b.Parasetamol (Asetaminofen)



Şekil 2: Asetaminofen

Para-aminofenol türevi non-steroid antiinflamatuvar (NSAI) veya narkotik olmayan analjeziklerdendir. Ağrı kesici (analjezik) ve ateş düşürücü (antipiretik) etkisi yüksek olan ancak antiinflamatuvar etkinliği yok denecek kadar düşük olan bir ilaçtır(20).

Asetaminofen antiinflamatuvar ilaçların analjezik etkisini artırmak için onlarla birlikte kullanılabilir. Ancak antitrombotik etkinliği zayıftır; kanama süresini değiştirmez. Asetaminofen, benzeri diğer analjezik ilaçlardan farklı olarak, hipotalamus ve omurilik gibi peroksitlerden fakir ortamda prostaglandin sentezini inhibe edebilir; antipiretik ve analjezik etkileri, hipotalamus ve omurilik arka boynuzunda prostaglandin sentezini inhibe etmesi ile ilişkilidir (5).

Ağız yolundan alındığında asetaminofen, çabuk absorbe edilir ve etkisi erken başlar; plazma düzeyi ½-1 saat içinde maksimuma erişir. Absorpsiyonu besinler tarafından azaltılır. Bir dozdan sonra analjezik etkisi 3-4 saat kadar devam eder.

Asetaminofenin büyük kısmı karaciğerde gluküronik asitle ve sülfatla konjuge edilir ve böbreklerden bu şekilde itrah edilir. Mutad dozda eliminasyon yarılanma ömrü 2.4 saattir; doğrusal olmayan eliminasyon kinetiği göstermesi nedeniyle aşırı dozda 7.3 saate kadar çıkabilir (5).

Ağrı yapıcı etkenler, dokudaki tahriş ve zedeleme, immünolojik reaksiyonlar; ve kanserli hücreler lokal araşidonik asitden (eikosatetraenoik asitden), prostasiklin ve prostaglandinlerin sentezini artırır. Bu sırada siklik endoperoksitler denilen PGG₂ ve PGH₂ maddelerinin, tromboksan A₂ (TxA₂)'nin ve trombosit aktive edici faktör (PAF) maddesinin oluşumu artar. Bu maddelerin kendilerinin, veya prostasiklin (PGI₂) ve TxA₂ gibi labil prostanooidlerin, akut ve kronik iltihap dokusunda ve eksüdalarda varlığı gösterilmiştir.

Ayrıca iltihaplı dokuda, araşidonik asitden lipooksijenaz enzimleri tarafından oluşturulan hidroperoksi yağ asitlerinin (HPETE yani hidroperoksieikosatetraenoik asid), monohidroksi yağ asitlerinin (HETE yani hidroksieikosatetraenoik asid) ve lökotrienlerin (LTB₄, LTC₄, LTD₄ VE LTE₄) miktarları da artar (5).

Araşidonik asid hücre membranındaki fosfolipidlerden esas olarak **fosfolipaz A₂** enzimi aracılığı ile koparılır. Antiinflamatuvar analjezikler **siklooksijenaz** enzimini inhibe ederler; böylece sadece siklooksijenaz ürünlerinin değil, aynı zamanda lipooksijenaz ürünlerinin sentezini de azaltırlar. Bu nedenle glukokortikoidler narkotik olmayan analjeziklerin yaptığından daha kapsamlı inhibisyon yaparlar (5).

Siklooksijenaz ya da prostaglandin endoperoksit sentaz (PGHS), biyosentetik prostaglandin yolunun çalışmasını düzenleyen ve sınırlayan ilk enzimdir. Siklooksijenazın dokularda iki farklı izoformu olduğu ve bu izoformların değişik şekilde regüle edildiği iyi araştırılmıştır. Siklooksijenaz-1 (COX-1) beyin, böbrek, uterus gibi dokularda yapıcı bir ekspresyon göstermekte ve fizyolojik fonksiyonlarda prostaglandin sentezinde rol almaktadır. Siklooksijenaz-2 (COX-2 veya PGHS-2) ise pro-inflamatuvar forbol esterleri, büyüme faktörleri, interlökin-1, endotoksin ve hormonlar gibi değişik agonistler tarafından geçici süre indüklenmektedir (1).

Siklooksijenaz enzimini baskılayan NSAII'lar tümör hücrelerinde membran araşidonik asit havuzunu artırmakta, bu da sfingomyelinden hücre içinde bir ölüm sinyali gibi değerlendirilen seramid oluşumunu hızlandırmaktadır (21). Ancak apoptozis indükleyici hücre içi enzimler olan kaspazların aktiflenmesi (22), ya da büyüme faktörlerinin hücre içindeki uyarıcı etkilerinin de azalması da NSAII'nın kanserde durdurucu etki sağlayan mekanizmaları arasındadır, örneğin epidermal büyüme faktörü

tarafından uyarılan kalsiyum deşarjını azaltarak, kolon kanseri hücre çoğalmasını yavaşlatmakta olduğu gibi (23).

Bir başka önemli hedef ise IkappaB kinaz (IKK) ve Nükleer Faktör kappaB (Nf- κ B) sistemidir. Nf- κ B, hücre stresinde apoptozis'e karşı koyan, hücre çoğalmasını hızlandıran ve hormona duyarsız tümörlerde örneğin prostat kanserlerinde yapısal olarak yüksek düzeylerde aktif olan bir transkripsiyon faktörüdür(24). Bu aktivasyonun sebebi de onu kontrol eden proteinin (IkappaB: Nükleer faktör kappaB inhibitörü) parçalanmasına yol açan IkappaB kinaz (IKK)'lardır (25).

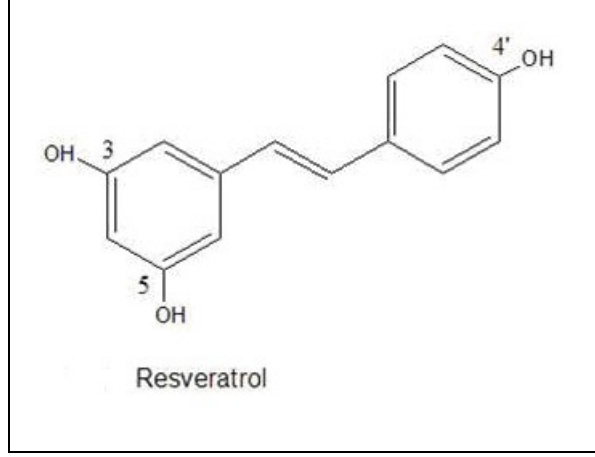
Sitokinler, bir inflamatuvar reaksiyon esnasında (yara, yanık iyileşmesi, radyasyon hasarı gibi) hem primer hasarın bulunduğu doku, hem de bölgeye göç eden immün hücrelerin sentezlediği ve salgıladığı protein yapılı moleküllerdir. Bu moleküller, bölgedeki hücrelerin bölünerek, doku rejenerasyonu oluşması, bölgenin beslenmesi için yeni kan damarlarının sağlanması, bölgeye gelmesi gereken immün hücrelerin kan damarlarına yanaşması (recruitment), tutunması (adhesion) ve damar bariyerlerini aşarak dokuya girmesi (invasion) için gereken yönlendirici/trofik sinyalleri oluşturur. Son yıllarda ortaya konulduğu üzere, tümör hücrelerinin lokal büyüme, invazyon ve metastazında işte böyle bir inflamatuvar süreci bizzat uyardıkları, gelen bağışık hücrelere karşı TGF- beta gibi sinyallerle direnç sağladıkları, ama bölgede salınan molekülleri kendi lehlerinde değerlendirdikleri anlaşılmıştır (26).

Yapılan çalışmalar kortizon türevleri gibi steroid yapılı ve immün sistemi bir üst basamaktan ve tümüyle felç eden ilaçlar için olmasa da ılımlı düzeyde inflamatuvar reaksiyonu baskılayan non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAII) için, bir antitümöral potansiyeli desteklemektedir. Gerçekten de sitokin sentezi COX-2 sentezine bağımlıdır ve COX-2, NSAII'ın durdurduğu ana hedeflerden biridir(27).

Asetaminofen, ilk kez 1998'de Harvard Tıp Okulu'nda yapılan epidemiyolojik çalışmalarla over kanserinde risk düşürücü bir faktör olarak tanımlandı. Nedeni tam olarak açıklanamasa da, asetaminofen oksidatif mekanizmayla dönüştüğu toksik metabolitlerin, daha çok tümöral yönde farklılaşan over hücrelerinde birikerek, selektif olarak bu hücreleri ortadan kaldırmasının bir mekanizma olabileceği düşünölmektedir (28).

Aspirinin insan kolon kanserindeki indirgeyici etkisinin keşfiyle, non-steroid anti inflamatuvar ilaçların tümör gelişimi, apoptoz ve anjiyogenez üzerindeki düzenleyici rolü dikkatle incelenmektedir (1).

c.Resveratrol:



Şekil 3: Resveratrol

Resveratrol (RES) (3,4,5-trihidroksistilben) üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan polifenol yapıda doğal bir antioksidan maddedir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar Güney Fransa'da yağlı diyet ve sigara kullanımının fazla olmasına rağmen bol tüketilen şarap nedeniyle koroner kalp hastalığı insidansının diğer bölgelere göre daha düşük bulunmasına yol açmış, bu tabloya 'Fransız Paradoksu' adı verilmiştir. Bu konuda yapılan yayınlar paradoksa neden olarak kırmızı şarap içinde bol miktarda bulunan resveratrolu işaret etmiştir (6).

İlk olarak 60 yıl önce Michio Takaoka tarafından *Veratum grandiflorum* (False Hallebore)'un reçinesinden, daha sonra 1977 yılında Langcake tarafından *Vitis Vinifera*'da keşfedilmiştir(29).

Sadece 6 yıl önce bilimsel olarak dikkati çekmesine karşın, günümüzde antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen özellikleri nedeni ile bilim adamları için ilgi çekici bir araştırma konusu olmuştur. RES özellikle siyah üzümün kabuğunda bol miktarda bulunmasına karşın, yabani sümbül, kızcılık ve dut gibi çeşitli meyvelerde de bulunmaktadır(30).

Jang ve arkadaşları kanserin üç önemli evresi olan başlatma (initiation), yükseltme (promotion), ilerleme (progression) evreleri ile ilgili olayların inhibisyonuna ve *in vitro* olarak birçok farklı kanser hücre tipinde apoptotik hücre ölümüne neden olduğunu ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini tanımlamışlardır (31). Bazı araştırmacılar tarafından RES, NSAI ajanlara benzetilmektedir, tıpkı aspirin, indometazin ve sulindac gibi siklooksijenaz aktivitesini inhibe edici rolleri vardır ve buna ek olarak RES'in nükleer transkripsiyonel faktör olarak (Nf- κ B) ve Aktivatör protein 1 (AP-1)'in de inhibitörü olduğu gösterilmiştir, aslında Nf- κ B'nin transkripsiyonel pozitif regülasyonu (düzenlenmesi) apoptotik hücre ölümünü baskılaması yoluyla tümörogeneze yol açmaktadır. RES, Tümör Nekrozis Faktör Alfa (TNF- α) , hidrojen peroksit (H₂O₂) tarafından indüklenen Nf- κ B aktivasyonunu inhibe etmektedir (32).

5. Hücre Kültürü

Hücre kültürleri hücrelerin tek hücreyi dahi kapsayabilecek şekilde, doku olarak düzenlenmeden *in vitro* çoğalmasdır. Organizmadan doğrudan doğraya alınan organ, doku veya hücrelerden üretilen kültürler primer kültürler adı verilir. Primer kültürler, buldukları yerde çoğalıp başka bir yere bölünerek aktarıldıktan (hücre pasajı) sonra hücre soyu (cell line) adını alırlar.

Primer hücre kültürlerinden veya hücre soylarından özel seçim veya klonlama yöntemi ile belirleyici bazı özellikleri olan hücreler elde edilir. Bu hücrelerin kültürde yaşamları süresince belirleyici özellikleri devam eder; hücrelerin pasaj yapılmış olması, onların belirleyici özelliklerini etkilemez.

Hücre suşları ve hücre soyları diploid veya heteraploid olabilirler, hücrelerin heteraploid oluşları onların habis hücreler oldukları veya *in vitro* çoğalmalarının sınırsız olduğu anlamına gelmez. Hücre kültürlerinde sınırsız çoğalan hücre soy veya suşları, devamlı hücre soyları (established cell line) şeklinde tanımlanarak, yaşam süreleri sınırlı diploid veya heteraploid hücre soylarından ayrılırlar. Üç gün ara ile en az 70 defa pasajı yapılabilen hücre soyları “ devamlı hücre soyu” olarak kabul edilmektedirler.

Günümüzde, hücre kültürleri esas olarak iki yolla üretilmektedir: Tek tabak hücre kültürleri ve süspansiyon halinde hücre kültürleri. Tek tabaka hücre kültürleri, cam veya plastik zemin üzerine tutunarak yaşayan, işlevlerini sürdüren ve üreyen hücrelerdir. Süspansiyon halindeki hücre kültürlerinde, hücreler hayatsal işlev ve üremelerini süspansiyon halinde buldukları ortamda sürdürebilir. Doku kültürü ve yöntemleri kullanarak, hücre yapısı, fizyolojisi, patojen hücre ilişkileri, iyonlaştırıcı ışınların hücre

düzeyinde incelenmesi ve çeşitli radyobiyojik problemlere bağlı olarak tümör büyümesinin açıklığa kavuşturulmasına çalışılır. Hücre kültürlerinde, *in vivo* şartlarda mümkün olmayan, kısa zaman aralığında gerçekleştirilmesi istenen fiziksel ve kimyasal etkenler incelenebilir (33).

a. Hücre Siklusu (Döngüsü)

İki yavru hücre ortaya çıkarmak üzere birbirini izleyen iki mitoz bölünme arasındaki aralık hücre döngüsü olarak tanımlanır. Hücre döngüsü, geleneksel olarak iki aşamaya ayrılır: 1.İnterfaz ve 2.Mitoz (M fazı olarak da bilinir). İnterfazın en belirgin olayı S fazında gerçekleşir, burada çekirdekdeki DNA iki katına çıkar (replikasyon). S fazı, G1 fazı adı verilen bir aralığın ardından gelir. Mitozdan önce G2 fazı gelir ki, burada hücre, mitoz başlamadan önce DNA'nın iki katına çıkarıldığından emin olmak ister. G1 ve G2 fazlarının diğer bir önemi de mitoz öncesi ve sonrası hücreye büyüme zamanı kazandırmalarıdır. Hücre bölünmesine hazırlık aşamasında hücre kütesinin iki katına çıkarılması için hücrenin büyümesi gerekir.

G1 aşamasındaki hücreler ya DNA çoğalması için S fazına girerler ya da girmezler. Eğer bir hücre S fazına girmezse G0 (G sıfır) fazı denir ve tekrar hücre döngüsüne dönmeye kadar önce günlerce, aylarca, hatta yıllarca kalacağı dinlenme dönemine girer (11).

b. Hücre Siklusunun Kantitatif Analizi

Aynı cins hücrelerden oluşan bir hücre popülasyonundaki bütün hücrelerin, hücre siklusu süreleri tam olarak aynı değildir. Birçok değişik ve karmaşık faktörlere bağlı olarak, bu hücrelerin hücre siklusu süreleri arasında büyük varyasyonlara rastlanır. Bir hücre popülasyonundaki hücrelerin hücre siklusları ile ilgili kantitatif verilerin elde edilmesi amacı ile, basit olarak iki ölçüm yapılabilir.

Bunlardan birincisi, popülasyondaki mitoz bölünme yapan hücrelerin sayısının saptanması ve bu sayının tüm hücrelere oranının hesaplanmasıdır. Bu değere “Mitotik İndeks” (Mi) adı verilir. Eğer bir popülasyondaki hücrelerin tümünün bölündüğünü, hepsinin aynı hücre siklusu süresine sahip olduğunu ve bütün hücrelerin hücre siklusunun çeşitli fazlarına homojen olarak dağıldığını düşünürsek, mitotik indeks değerinden, aşağıdaki eşitliği çıkarabiliriz:

$$\text{Mitotik İndeks(Mi)} = T_M/T_C$$

Burada T_M mitoz fazının süresini, T_C ise, hücre siklusunun toplam süresini belirlemektedir.

Bu konudaki ikinci basit ölçüm ise, işaretlenmiş yani S fazındaki hücreleri sayarak bunların tüm hücrelere oranının saptanmasıdır. Bu değere “işaretleme indeksi” ya da “Labeling İndeks” (LI) denir.

$$\text{Labeling İndeks (LI)} = T_B/T_C$$

Burada T_B , S fazının süresini, T_C ise toplam hücre siklusu süresini göstermektedir.

Uygulamada bu iki yöntemle küçük miktarda ve tek bir örnekte mitotik indeks ve labeling indeks saptanarak hücre siklusuna kantitatif bir yaklaşımda bulunmak mümkündür. Bu olay özellikle insan dokuları ile yapılan çalışmalarda çok önemlidir (34).

6. İmmünohistokimya:

İşaretlenmiş antikorlar kullanılarak hücre ve doku antijenlerinin buldukları yerde gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir. İmmünohistokimya yöntemi gerek ışık, gerekse elektron mikroskopide; tek aşamalı (direkt) veya iki aşamalı (indirekt) olmak üzere iki şekilde uygulanabilir.

Direkt Yöntem: Bu yöntemde gösterilmek istenen antijene özgü antikor floresan boya, enzim, altın tanecikleri v.b. işaretler ile işaretlenir. İşaretli antikorun dokudaki antijenle reaksiyona girmesi sağlanır. Yöntem tek aşamalı olduğundan çabuk tamamlanır. Ancak primer antikor, işaretlendiği için antikorun reaksiyon gücünde bir azalmaya neden olabilmektedir. Yöntemin hassasiyeti düşük olduğundan nadiren kullanılmaktadır ve yerini iki aşamalı (indirekt) yönteme bırakmıştır (35).

İndirekt Yöntem: Bu yöntem de primer antikor işaretlenmez, ancak primer antikorun elde edildiği türün gama globulinine karşı oluşturulan sekonder bir antikor işaretlenerek ikinci bir aşama olarak uygulanır. Böylece;

1.aşamada, işaretsiz primer antikor antijene bağlanır.

2.aşamada ise işaretli sekonder antikor primer antikorun Fc bölgesi ile reaksiyona girer, böylece antijen iki aşamada indirekt olarak işaretlenmiş olur.

İndirekt yöntem direkt yönteme göre daha hassastır. Primer antikor ile birden fazla sekonder antikor bulunabilir ve daha güçlü bir işaretlenme elde edilebilir (35)

7. Bromodeoxyuridine (BrdU)

BrdU; DNA sentezini tayin etmek için timidin protokolüne eşdeğer bir alternatiftir. BrdU timidin analogudur ve DNA içine girer. Anti- BrdU monoklonal antikor ile boyanarak sayım yapılabilir veya ELİSA ile ölçülebilir (36).

GEREÇ VE YÖNTEM

A.HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmamız in vitro koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında ışık mikroskobu ve hücre kültürü laboratuvar imkanları kullanılarak gerçekleştirildi. Araştırmada Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından sağlanan MDAH 2774 (CRL no: 10303) hücre soyu kullanıldı. MDAH 2774 over tümör hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 FCS, 0,2 mM glutamin, 100 IU/ml penilisin ve 100 µg/ml streptomisin içeren RPMI-1640 (Biological Industries) medyumunu kullanıldı. Hücreler bu besi ortamını içeren 25 cm² ve 75 cm²lik flasklarda, iç ortamı %5 CO₂ , %95 nem içeren, 37°C olan inkübatör (Sanyo) içinde haftada 2 kez rutin pasaj yapılarak üretildi. Hücre pasajları laminar akım kabini (Tezsan), hücre kültürleri incelemeleri invert mikroskop (Leitz), cam malzeme sterilizasyonu otoklav (Victor Recker), stokların -20°C de depolanması derin dondurucu (Arçelik) kullanıldı. Elektron mikroskopik incelemeler taramalı (Scanning) elektron mikroskobu Jeol (JMS 5200) kullanılarak Marmara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji A.B.D' da gerçekleştirildi.

B.DENEY PROTOKOLLERİ

1. Doz Belirleme Deneyi

Hücrelerin toplanması aşamasında flasklardaki üst medyum döküldü ve üzerine %0,05 tripsin eklendi. İnkübatörde 5-10 dakika bekletilerek hücrelerin flaskın yüzeyinden ayrılması sağlandı.

Hücreler flasklardan 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerlerine tripsinin etkisini ortadan kaldırmak için eşit miktarda medyum eklendi. Hücreler 5 dk. 1500rpm'de santrifüj edildi ve medyum-tripsin karışımı uzaklaştırıldı. Hücrelerin üzerine medyum konarak süspansiyon haline getirildi ve hemasitometrede sayıldı. Deneylerde 6 kuyucuklu kültür kapları (six-well-plate) kullanıldı. Kapların her kuyucuğuna %100 canlı 500.000 MDAH-2774 hücresi 5 ml RPMI 1640 medyumunu içinde ekildi.

Gemcitabine ve resveratrolün her biri için 0,1; 1; 10; 100 µg/ml konsantrasyonlarda olacak şekilde steril bidistile suda hazırlanmış taze çözeltileri 100'er µl'lik eşit hacimlerde hücrelere verildi. Parasetamol 40 µg/ml dozu hazırlandı.

Her ilacın her bir dozu için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Tüm gruplar 24, 48,72 ve 96. saatler için ekildi ve 37°C'de %5 CO₂ hava karışımında rutubetli ortamda inkübe edildi. Tüm saatlerin sonunda kuyucuklarda bulunan hücreler %0,05 tripsin ile ayrı ayrı toplanıp santrifüj edildi. Süpernatant kısımları atıldıktan sonra 1 ml medyum ile süspansiyon haline getirilip sayma kamarasıyla (hemasitometre) sayıldı. Toplam hücre sayıları kaydedildi. ID50 (İnhibition dose %50) değeri, Gemcitabine için 10 µgr/ml, Resveratrol için 10mM/ml, Parasetamol için 40 µgr/ml olarak saptandı.

2. Proliferasyon (Tutunma) deneyi ve canlılık tayini

6'lı kültür kaplarının her bir kuyucuğuna 500.000 hücre 5 ml medyum içerisine ekildi. Gruplar şöyleydi:

- Kontrol
- Gemcitabine
- Resveratrol
- Parasetamol
- Gemcitabine+ Resveratrol
- Gemcitabine+ Parasetamol

Her bir grup için 3'er kuyucuğa ekim yapıldı. Bu gruplar 24,48,72 ve 96. saatler için ayrı ayrı ekildi. Süre sonlarında hücreler santrifüj tekniğiyle toplanarak sayma kamarasında sayıldı ve hücre sayıları kaydedildi.

%0,1'lik tripan mavisi boyasıyla, hücre solüsyonu 1/1 oranında hazırlandı ve lam lamel arasına konarak mikroskopta sayıldı. Böylece canlı hücre oranları saptandı.

3. İki boyutlu kültürlerde bromodeoksiüridin ile immunhistokimyasal işaretleme

24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100 000 hücre lamel üzerine ekildi ve hücrelerin yapışması için 2 saat beklendi. Hücreler yapıştıktan sonra her bir kuyucuğa 1 ml medyum konuldu. Resveratrolün 10 µM/ml dozu, gemsitabinin 10 µg/ml dozu, parasetamolün 40 µg/ml kullanıldı. 24, 48, 72 ve 96.

saatlerin sonunda hücreler 1 saat BrdU ile 37°C de inkübe edildi. Üst medyum çekilip atıldıktan sonra PBS te 37°C etüvde 15 dakika bekletildi. PBS çekilip atıldıktan sonra %70 etanolde -20°C de 30 dakika bekletilerek hücreler tespit edildi. Etanol atıldıktan sonra oda ısısında kurutuldu.

İmmünohistokimya için lameller PBS te 10 dk bekletildikten sonra metanolde hazırlanmış % 0.5 H₂O₂ de 20 dk karanlıkta tutuldu. 30 dk 4 N HCl de bekletilip, distile su ile çalkalandıktan sonra PBS ile 3 kez yıkandı. 15 dk Ultra-V-block'un ardından 1 saat primer antikorda, (NCL-BrdU Mouse monoclonal) nemli ortamda oda ısısında tutuldu. PBS ile yıkadıktan sonra sekonder antikorda (Biotinylated Goat Anti-Mouse) 30 dk, tekrar yıkamadan sonra, streptavidin peroksidazda yine 30 dk nemli ortamda tutuldu. PBS ile yıkamanın ardından substrat-kromojende (AEC Substrate System) 20 dk bekletildi ve distile su ile yıkandı. Mayer Hematoksilen ile zemin boyası yapıldıktan sonra kesitler kapatıcı (Ultramount) ile kapatıldı. Işık mikroskopunda sayım yapılarak işaretlenme oranı belirlendi.

4. İki boyutlu kültürlerin elektron mikroskopik değerlendirme için hazırlanması

24 kuyucuklu kültür kaplarına yuvarlak lameller konularak kuyucuk başına 100 000 hücre lamel üzerine ekildi ve hücrelerin yapışması için 2 saat beklendi. Hücreler yapıştıktan sonra her bir kuyucuğa 1 ml medyum konuldu. Resveratrolün 10 µM/ml dozu, gempitabinin 10 µg/ml dozu, parasetamolün 40 µg/ml dozu kullanıldı. 24 ve 96. saatlerin sonunda üst medyum çekilip atıldıktan sonra, üzerine % 2,5'luk gluteraldehit eklenerek 4°C de 30 dk. bekletilerek tesbit edildi. Fosfat tamponu ile 2 kez yıkandıktan sonra OsO₄ te 4°C de 60 dk. bekletildi. Tekrar fosfat tamponunda 10 dk. yıkandıktan sonra %30 etanolde 10 dk, %50 etanolde 10dk, %70 etanolde 10 dk, %90 etanolde 10 dk, 2 kez %100 etanolde 10 dk, 1/3 oranında hazırlanmış amilasetat/alkol karışımında 10dk, 1/1 oranında hazırlanmış amilasetat/alkol karışımında 10dk, 3/1 oranında hazırlanmış amilasetat/alkol karışımında 10dk, saf amilasetatta 1 saat bekletildikten sonra parçalar kurutmaya alındı ve Jeol (JMS 5200) taramalı (Scanning) elektron mikroskopunda incelendi.

C.İSTATİKSEL YÖNTEM

Yapılan deneylerden elde edilen verileri değerlendirmede SPSS 10.0 istatistik programı kullanıldı. Ölçüm değerleri homojen dağılım göstermediği için non-parametrik testlerle çalışıldı. Gruplar arası farkın anlamlılığını değerlendirmede Kruskal- Wallis Varyans analiz testi kullanıldı. Anlamlı bulunan varyans analiz sonuçları Mann-Whitney U ile sorgulandı. Anlamlılık sınırı $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

A. DENEY SONUÇLARI

1. Hücre Proliferasyonunun Kinetik Deneylerinin Bulguları

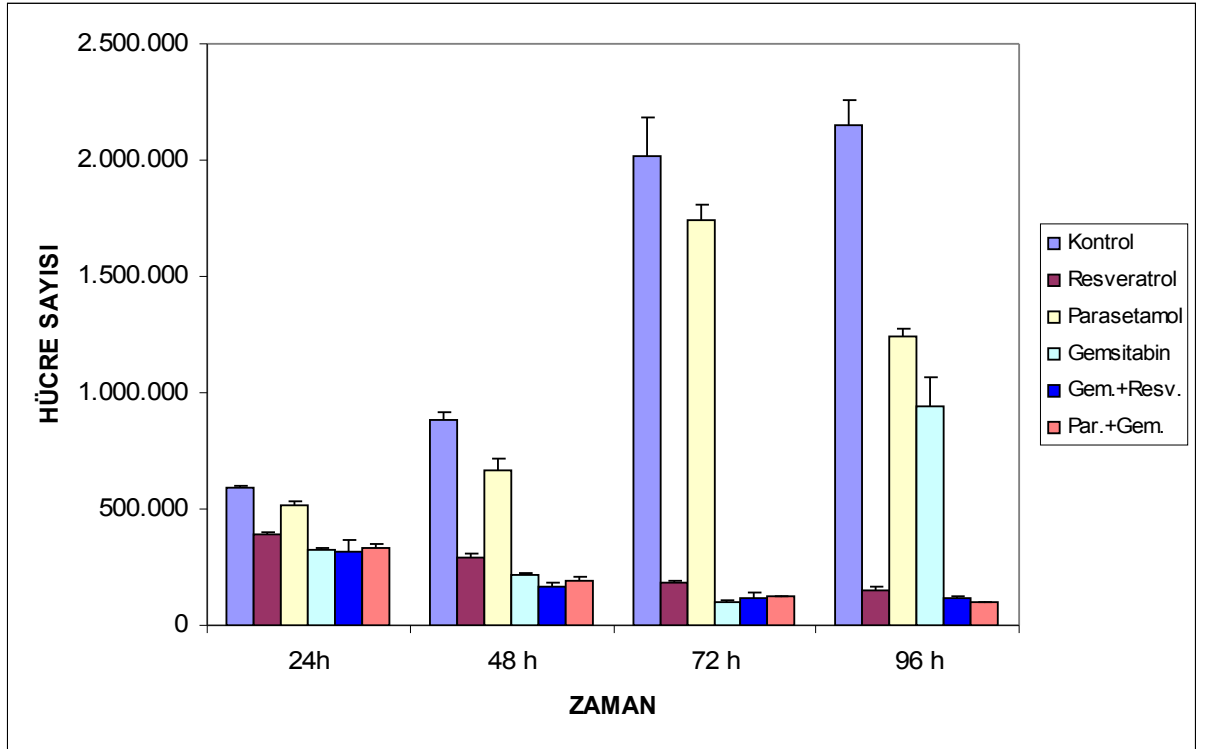
Kontrol grubunda 24. ve 96. saatler arasındaki zaman dilimi boyunca hücre sayısında, beklenildiği üzere sağlıklı bir yükseliş gözlemlendi.

Resveratrol grubu ilk 24 saat için hücre proliferasyonu üzerine etki etmedi ($p>0,05$). Ancak diğer tüm saatler için anlamlı ölçüde hücre tutunmasını azalttı (48, 24 ve 96. saatler için $p<0,05$).

Parasetamol grubu 24. ve 96. saatler arasında hücre sayısını azaltmak üzerinde anlamlı bir etki gösterdi (24, 48, 96. saatler için $p<0,05$).

Gemsitabin grubu 24. ve 96. saatler arasındaki tüm zaman dilimleri boyunca kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p<0,05$) hücre sayısında azalma gösterdi.

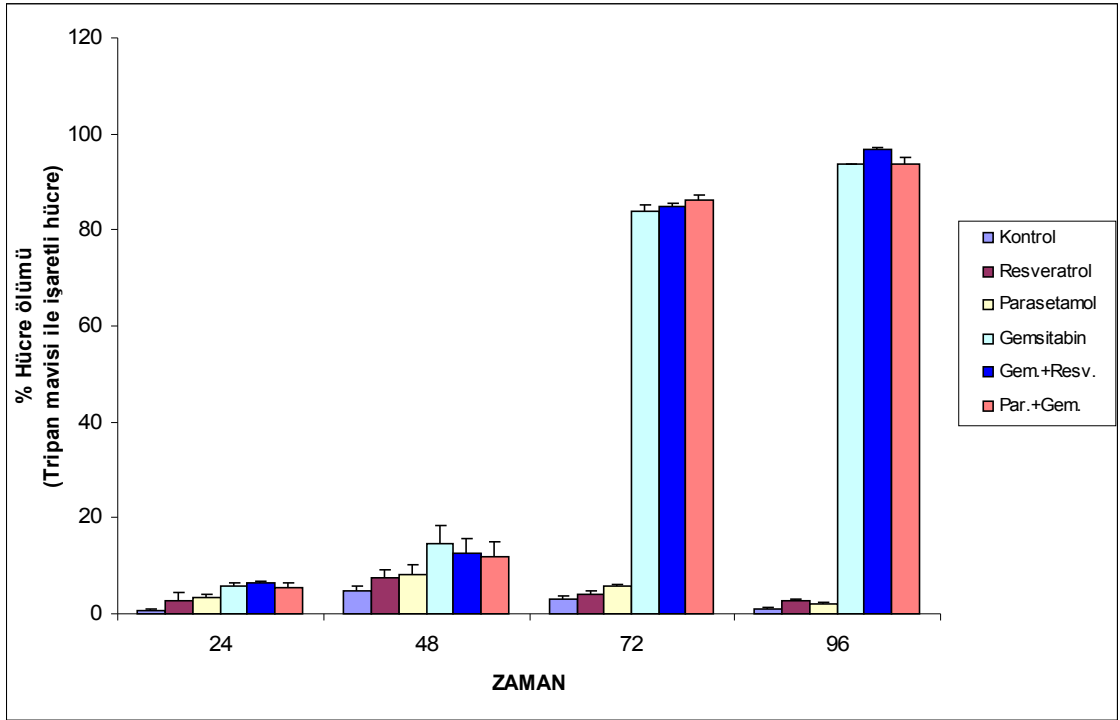
Gemsitabin + Parasetamol ve Gemsitabin + Resveratrol kombinasyon gruplarında bu ilaçların birlikte kullanılması kontrole göre tüm saatlerde hücre sayısını anlamlı bir şekilde azalttı ($p<0,05$).



Tablo 1: Zamana bağlı hücre çoğalma verileri.

2. Sitotoksosite verileri

İlk 24 saat için ilaçların tek tek ve birlikte kullanılmaları ilaçlara bağlı hücre ölümü (tripan mavisi pozitif) üzerinde anlamlı ($p>0,05$) bir değişiklik meydana getirmemiştir. Diğer yandan 48, 72 ve 96. saatlerde özellikle gemsitabin'nin tek başına ve resveratrol ve parasetamol ile birlikte kullanımları sonucunda, anlamlı hücre ölümleri gözlenmiştir ($p< 0,05$).



Tablo 2: Zamana bağlı hücre sitotoksosite verileri

3. İki boyutlu kültürlerde BrdU işaretlenme indeksi

Kontrol grubunda çok sayıda sentez fazında hücre BrdU ile işaretlendi (Resim 1). İki boyutlu hücre kültürlerinde BrdU-LI sonuçlarımıza göre kontrol grubu ilk 48 saatte yüksek, 72. ve 96. saatlerdeki değerlerde ise, her bir değer bir öncekine göre yaklaşık yarı yarıya azaldı, bu olgu hücre sayısındaki artışa rağmen hücrelerin aynı medyumda tutulmasına ve enerji kaynaklarının tükenmesine bağlı olarak değerlendirildi (Resim 2).

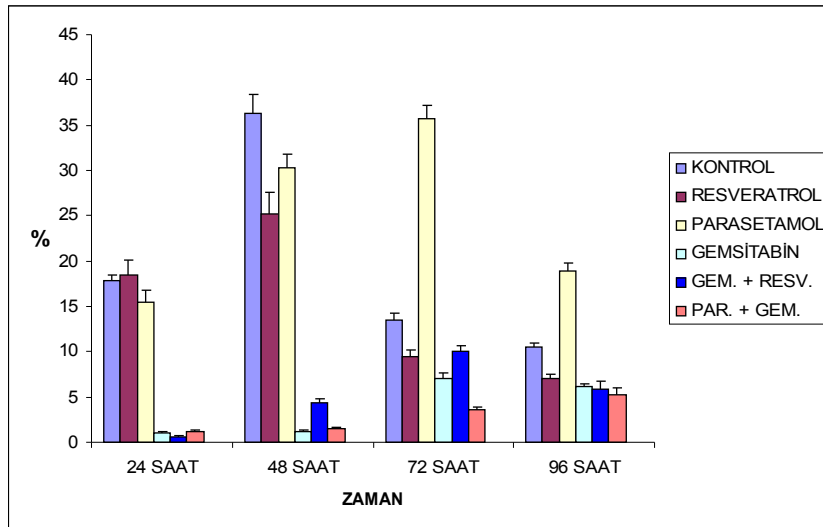
Resveratrol grubunda ilk 24. saatte BrdU-LI değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artış göstermesine karşın ($p>0,05$), 48. ve 72. saatlerde anlamlı bir azalma göstermiştir ($p<0,05$) (Resim 3, 4).

Parasetamol grubunda ilk 24. saatte BrdU-LI değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir azalma göstermesine karşın ($p>0,05$) (Resim 5), 48. saatte anlamlı bir azalma göstermiş ($p<0,05$), 72 ve 96. saatlerde ise işaretleme indeksini artırmıştır (Resim 6).

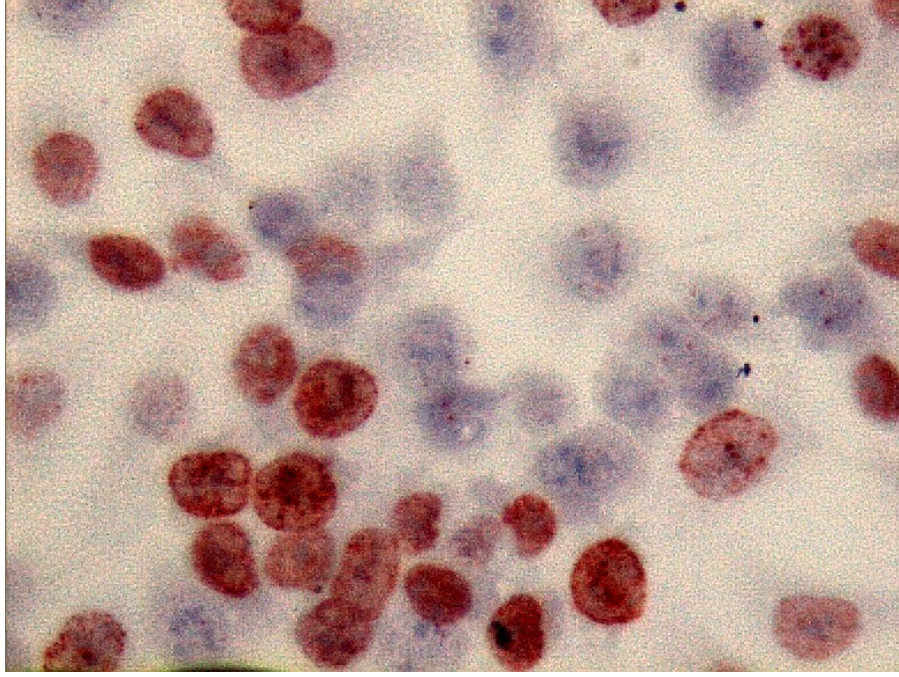
Gemsitabin grubunda 24. ve 96. saatler arasındaki tüm zaman dilimlerinde BrdU-LI değerleri kontrol grubuna göre ileri derecede azaldı ($p<0,05$) (Resim 7, 8).

Gemsitabin + Resveratrol kombinasyon grubunda ise 24. ve 96. saatler arasındaki tüm zaman dilimlerinde BrdU-LI değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldı ($p<0,05$) (Resim 9, 10).

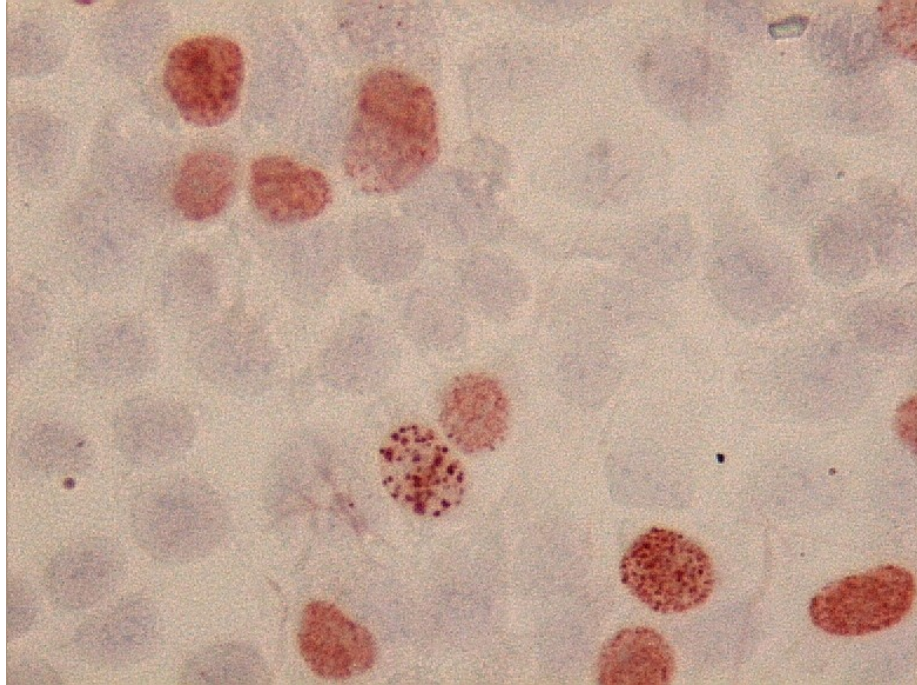
Gemsitabin + Parasetamol kombinasyon grubunda ise 24. ve 96. saatler arasındaki tüm zaman dilimlerinde BrdU-LI değerleri kontrol grubuna anlamlı derecede azaldı ($p<0,05$) (Resim 11, 12).



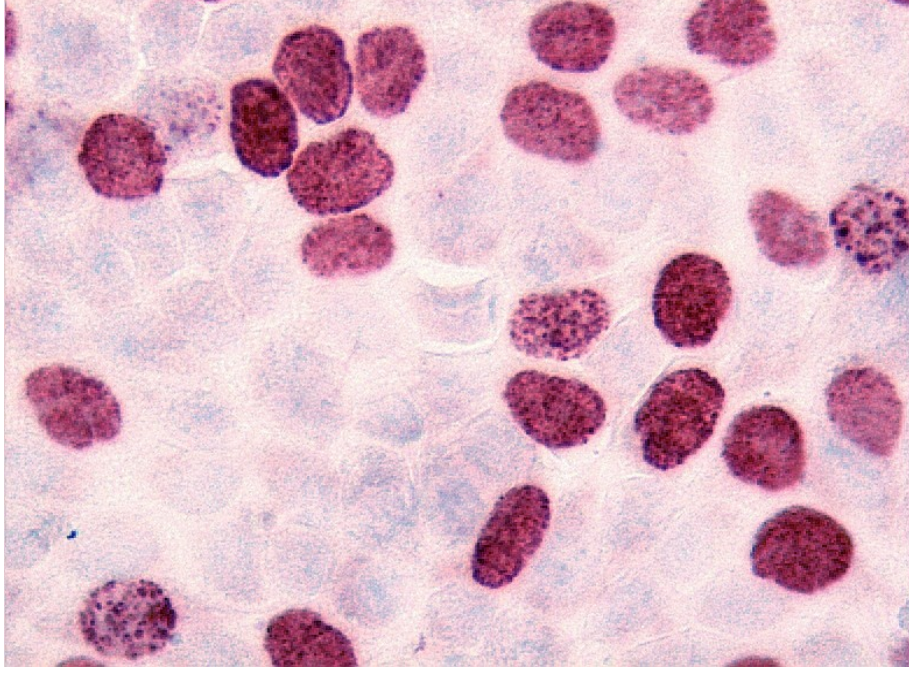
Tablo 3: İki boyutlu kültürlerde BrdU ile işaretlenme grafiği.



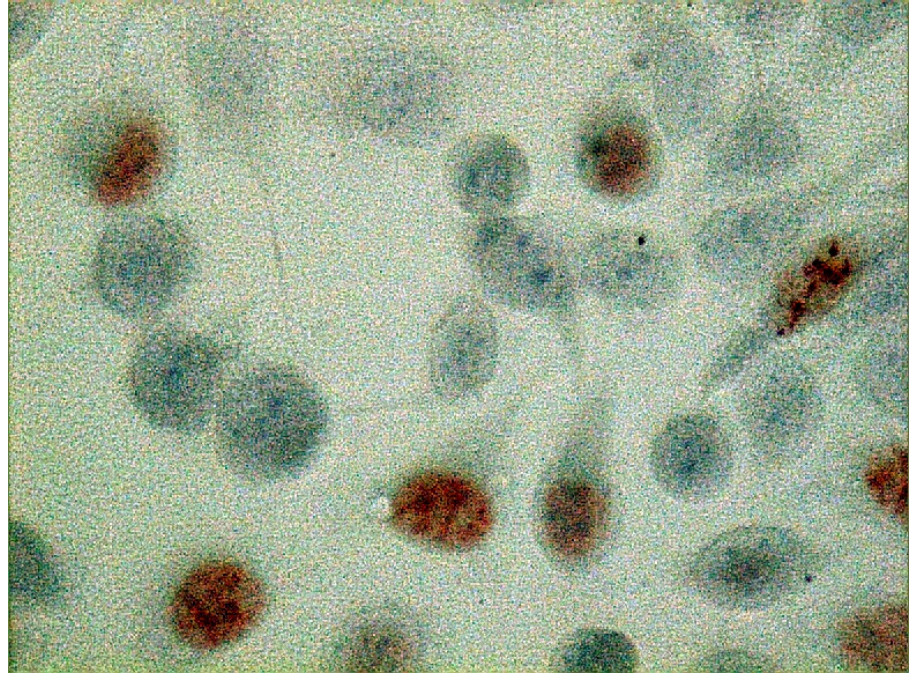
Resim 1: 24 saat Kontrol grubu; iki boyutlu kültürlerde 24.saatte çok sayıda MDAH 2774 over tümör hücresi Brdu ile işaretlenmiş (kırmızı renkli) olarak gözlemlendi. (işaretlenmeyen hücreler mavi renkli) x 40



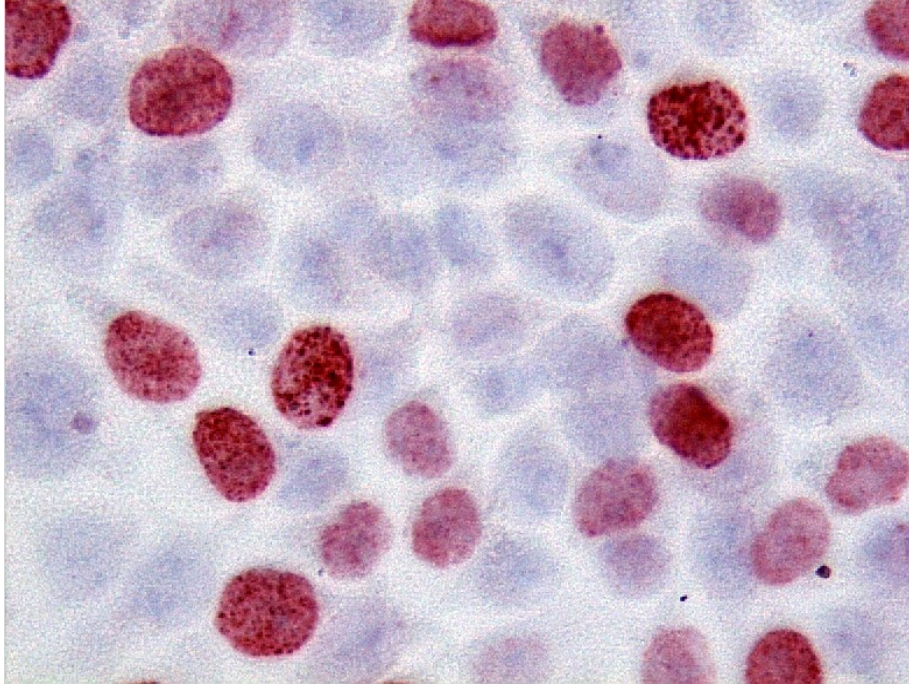
Resim 2: 96.saat Kontrol grubu, 24.saate benzer görünüm de çok sayıda MDAH 2774 over tümör hücresi Brdu ile işaretlenmiş (kırmızı renkli) olarak gözlemlendi. x 40



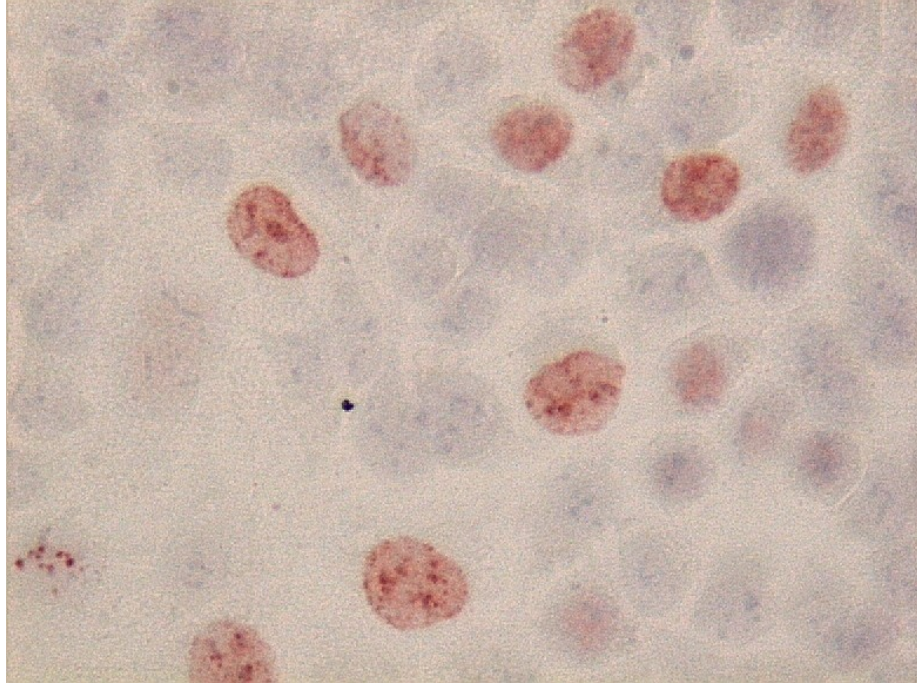
Resim 3: 24.saat Resveratrol grubu. Kontrol grubuna benzer çok sayıda Brdu ile işaretlenmiş tümör hücresi x 40



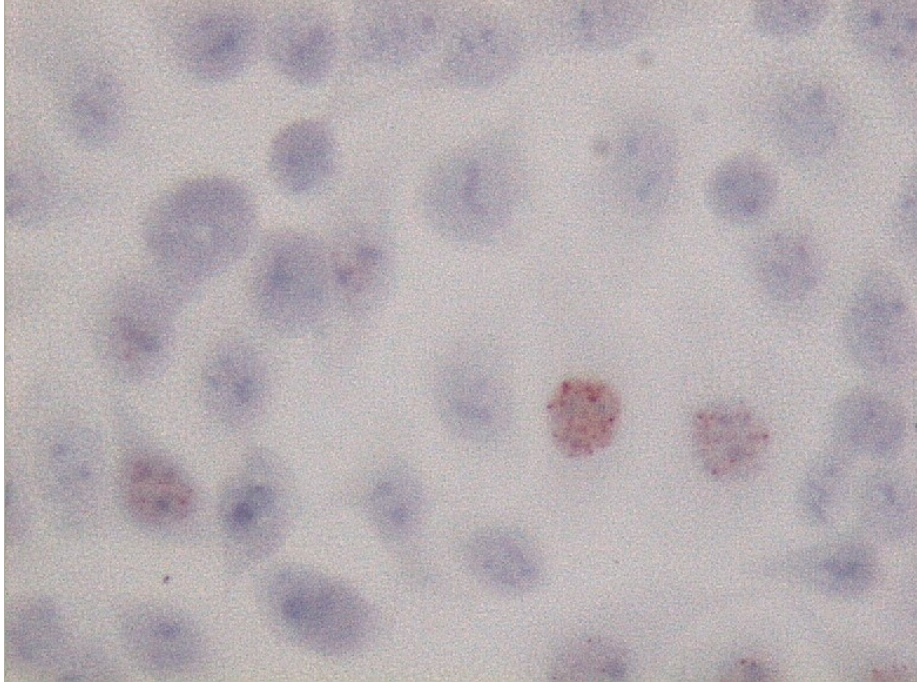
Resim 4: 96.saat Resveratrol grubu, 24.saate göre daha az işaretli hücreler x 40



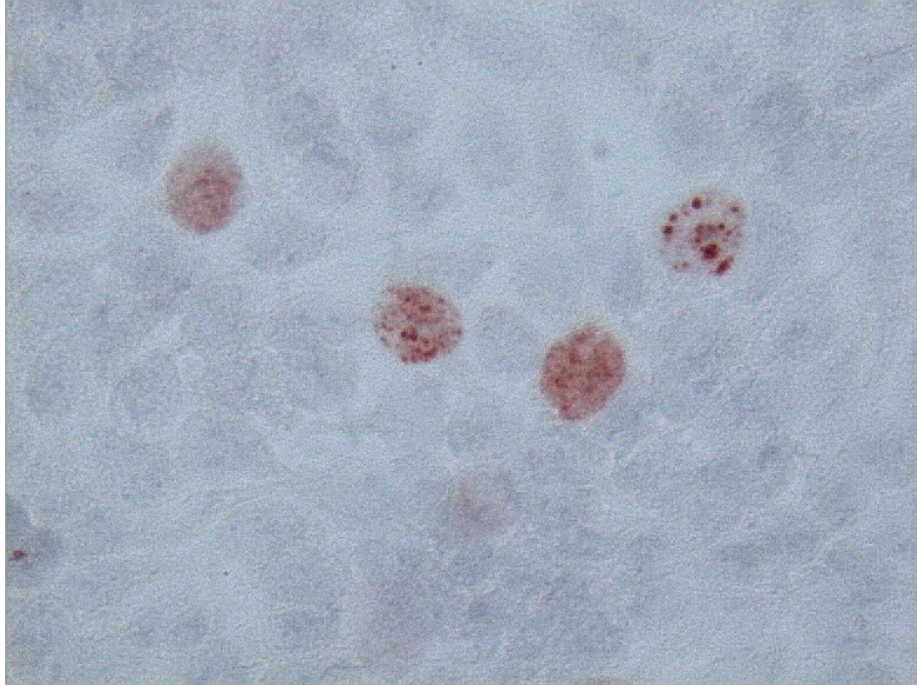
Resim 5: 24.saat Parasetamol grubu; kontrol grubuna benzer görünüm, çok sayıda işaretli hücre x 40



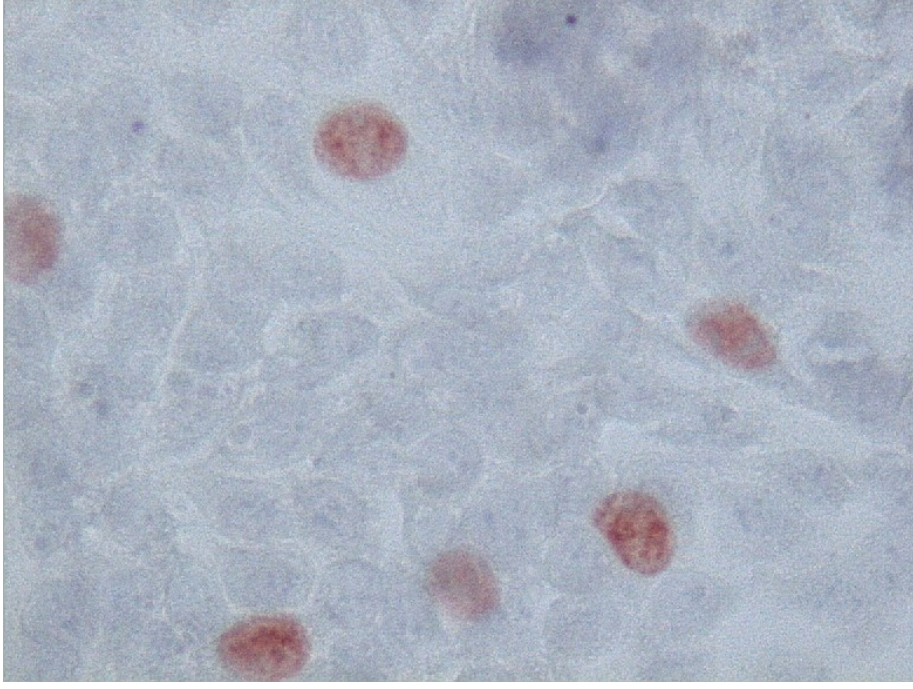
Resim 6: 96.saat Parasetamol grubu; çok sayıda işaretli hücre x 40



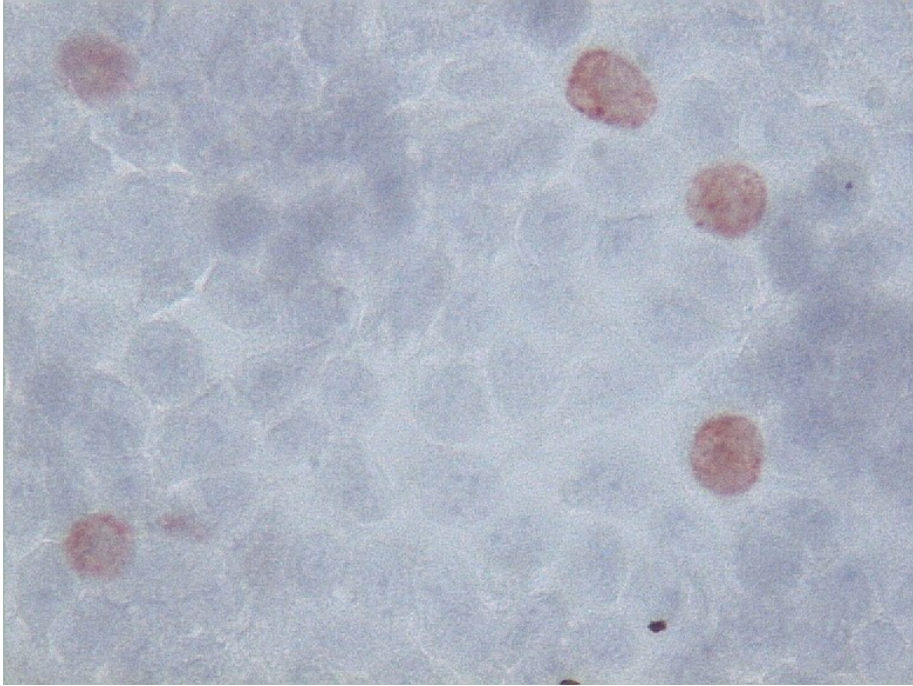
Resim 7: 24.saat Gemcitabin grubu; çok az işaretli hücreler x 40



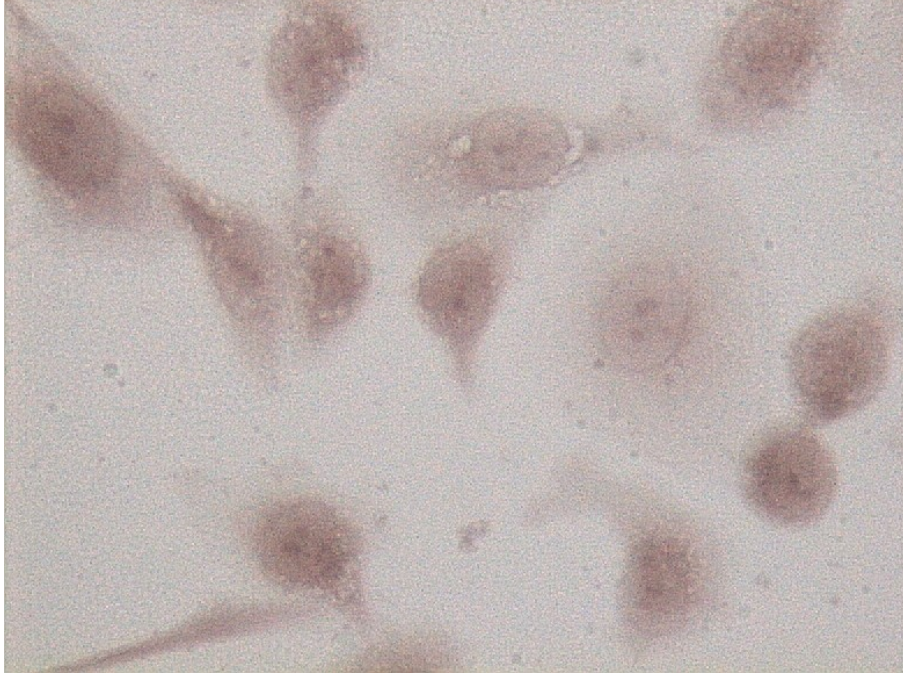
Resim 8: 96.saat Gemcitabin grubu; az işaretli hücreler x 40



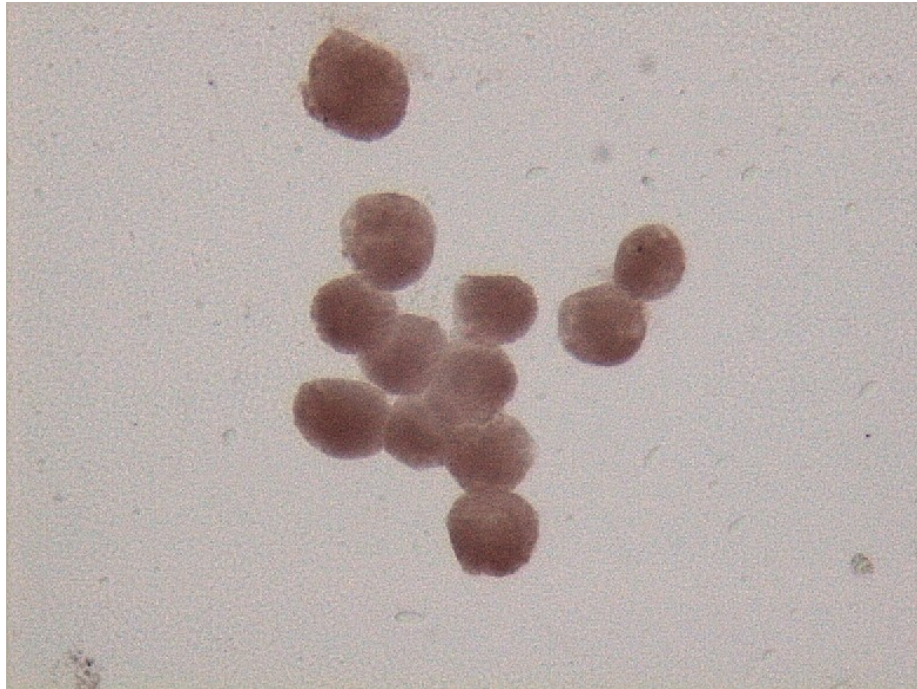
Resim 9: 24.saat Resveratrol + Gemcitabine grubu; çok az işaretli hücreler x 40



Resim 10: 96.saat Resveratrol + Gemcitabine grubu; az işaretli hücreler x 40



Resim 11: 24.saat Parasetamol + Gemsitabin grubu; iki boyutlu kültürlerde MDAH 2774 over tumor hücrelerinin 24. saatte Brdu ile işaretlenmediği gözlemlendi. x 40



Resim 12: 96.saat Parasetamol + Gemsitabin grubu; hücre uzantılarını kaybetmiş, yuvarlak ve işaretlenmemiş hücreler x 40

4. İki boyutlu kültürlerin elektron mikroskopik değerlendirilmesi

Kontrol grubu hücrelerinde, genel yapı doğaldı ve hücreler birbirleriyle bütünlük içerisindeydi (Resim 13). Hücrelerin sitoplazmik uzantıları sağlıklı, membranlar düzenli idi, hücrelerde bol mitoz ve mikrovillus gözlemlendi. 96 saatte (Resim 14) ince uzun sitoplazmik uzantıları ile birbirleriyle ilişkili hücre grupları vardı.

Resveratrol uygulanan grupta, kontrol grubundaki hücre görünümüne benzer görüntüler gözlemlense de, 24 saatlik gruptaki hücrelerin sitoplazmik uzantılarında azalma ve mitozu tamamlayamamış hücreler gözlemlendi (Resim 15). 96. saatte ise zemine zayıf tutunmuş, hücre sitoplazmik uzantılarını bütünüyle kaybetmiş ve yuvarlak bir görünüm almış, proapoptotik görünümlü hücreler mevcuttu (Resim 16).

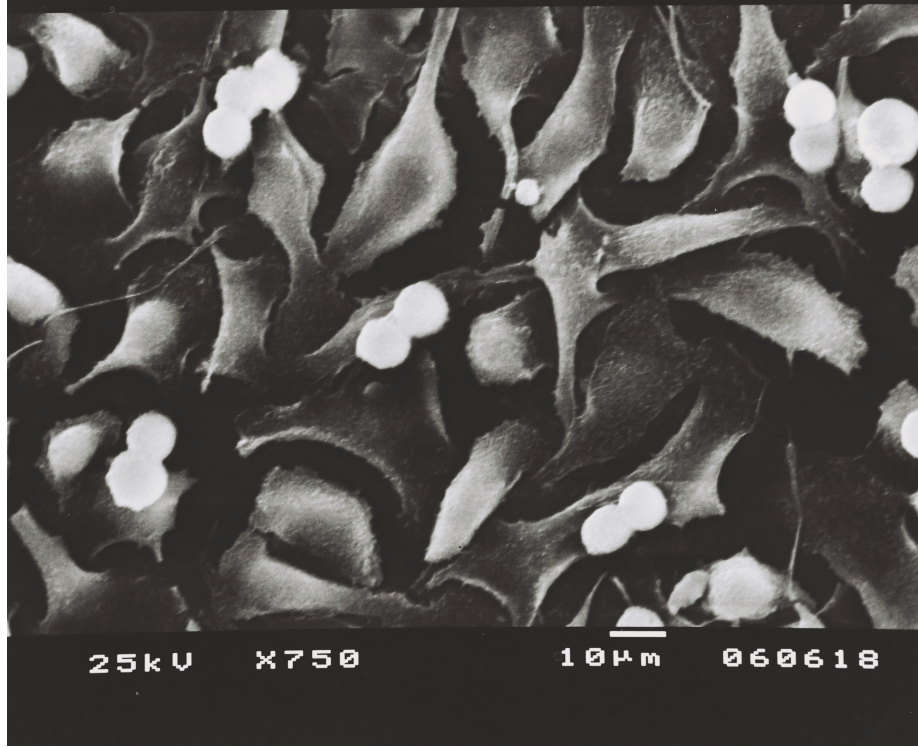
Parasetamol grubunda, kontrol grubuna yakın özellik gösteren hücre grupları vardı (Resim 17), hücrenin sitoplazmik uzantıları normaldi veya çok az azalma mevcuttu bu da hücre topluluğunun fazla olmasına bağlandı. Özellikle 96. saatte apoptotik özellik gösteren hücreler mevcuttu (Resim 18).

Gemsitabin uygulanan grupta, hücre yapısı bozuktur (Resim 19), kontrol grubuna göre hücrelerde villus kaybı veya daha kısa ve daha küt villus görünümlü, sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş hücre grupları gözlemlendi. Özellikle 96. saatteki hücrelerde belirgin şekil bozukluğu, yüzeyinde blebler oluşturmuş apoptoza giden hücreler gözlemlendi (Resim 20).

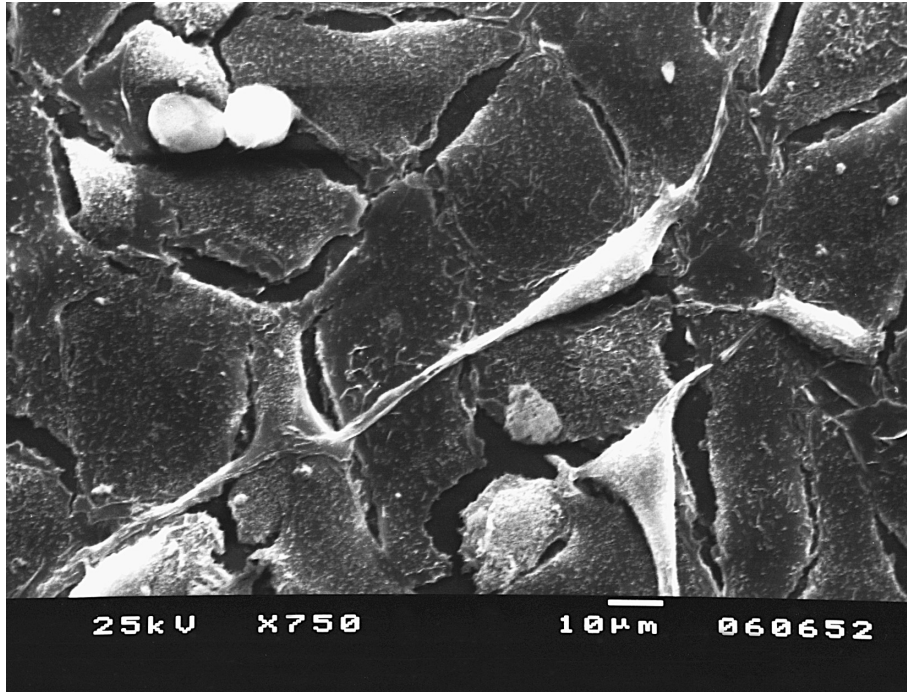
Resveratrol ve Gemsitabinin birlikte uygulandığı grupta, 24. saatte hücreler sitoplazmik uzantılarını kaybetmeye başlamış yaşamak için presferoid yapı oluşturmuşlardı (Resim 21). 96. saatte ise zemine zayıf tutunan, mitoz yapan hücre sayısı, kontrol grubuna göre daha az olan, sitoplazmik uzantılarını kaybetmiş, yuvarlaklaşmış ve kümeleşen hücre grupları gözlemlendi (Resim 22).

Parasetamol ve Gemsitabinin birlikte uygulandığı grupta, hücre yapısında büyük değişiklikler gözlemlendi (Resim 23). Hücrelerin büyük çoğunluğu mikrovilluslarını kaybetmişti, kontrol grubuna kıyasla apoptozisin daha sık olduğu ve hücrelerin birbirleri ile olan ilişkilerinin azalmış olduğu gözlemlendi, mitoz yapan hücre sayısı kontrol grubuna göre daha azdı (Resim 24).

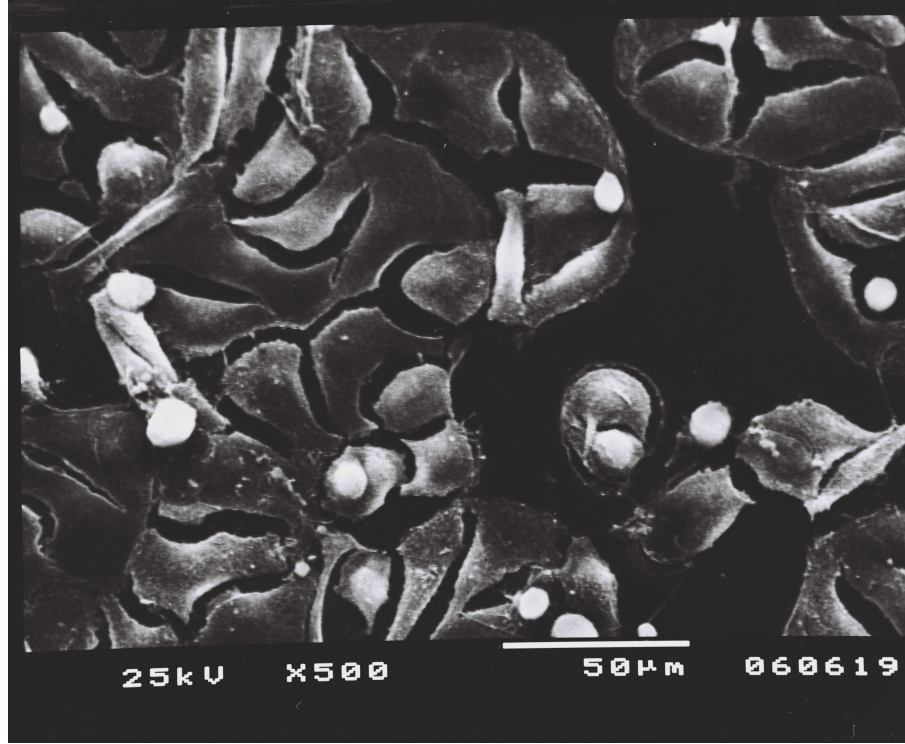
Sonuç olarak tüm deney grubu hücreleri, kontrol grubundaki hücelere oranla daha az sayıda mitoz, daha fazla sayıda apoptotik hücre ve daha az hücre sitoplazmik uzantıları içermekteydi. Özellikle kombinasyon grubundaki hücrelerde hücrenin yapısal bozuklukları ve apoptotik hücrelerin varlığı açısından gemsitabin ve resveratrol grubuna benzerlik göstermekteydi.



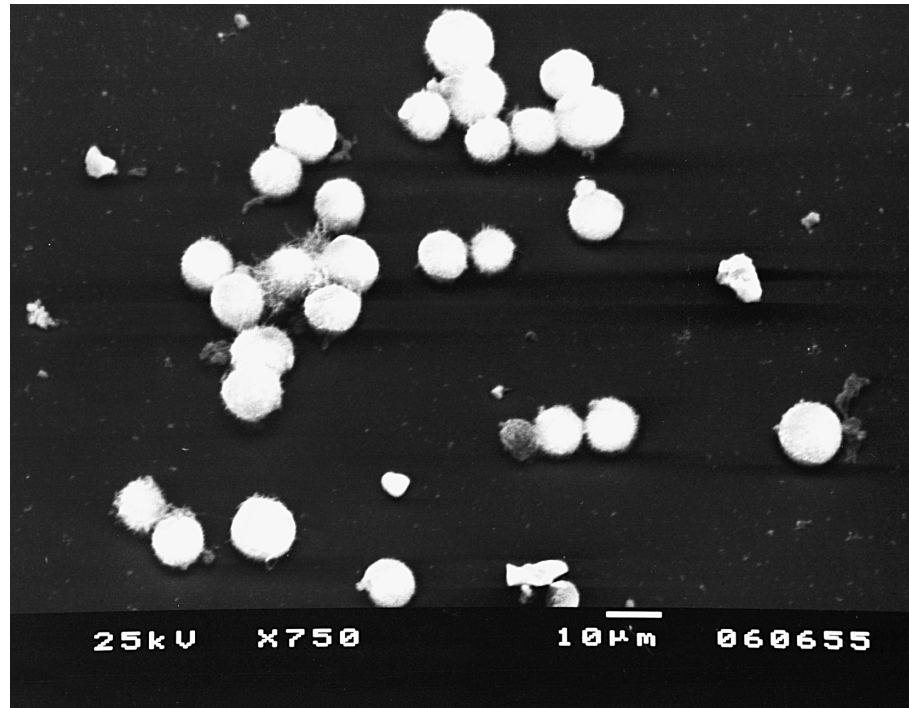
Resim 13: 24.saat Kontrol grubu; iki boyutlu kültürlerde MDAH 2774 over tümör hücrelerinin tipik (mitozda) 24.saat sonundaki elektron mikrografi x 750



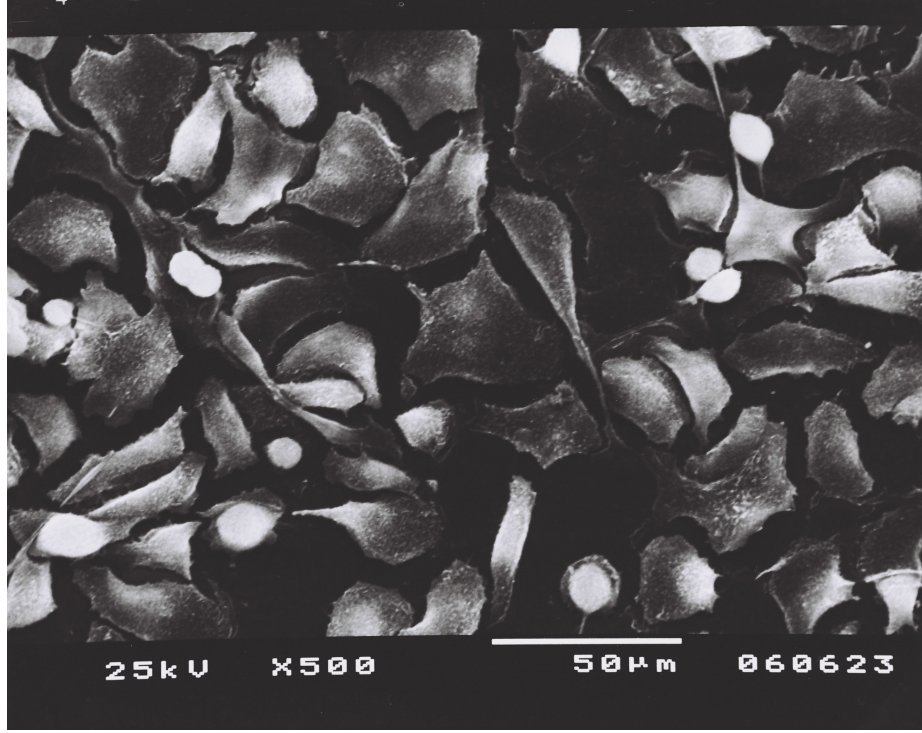
Resim 14: 96.saat kontrol grubu; 24.saate benzer görünümde 96.saat sonundaki elektron mikrografi x 750



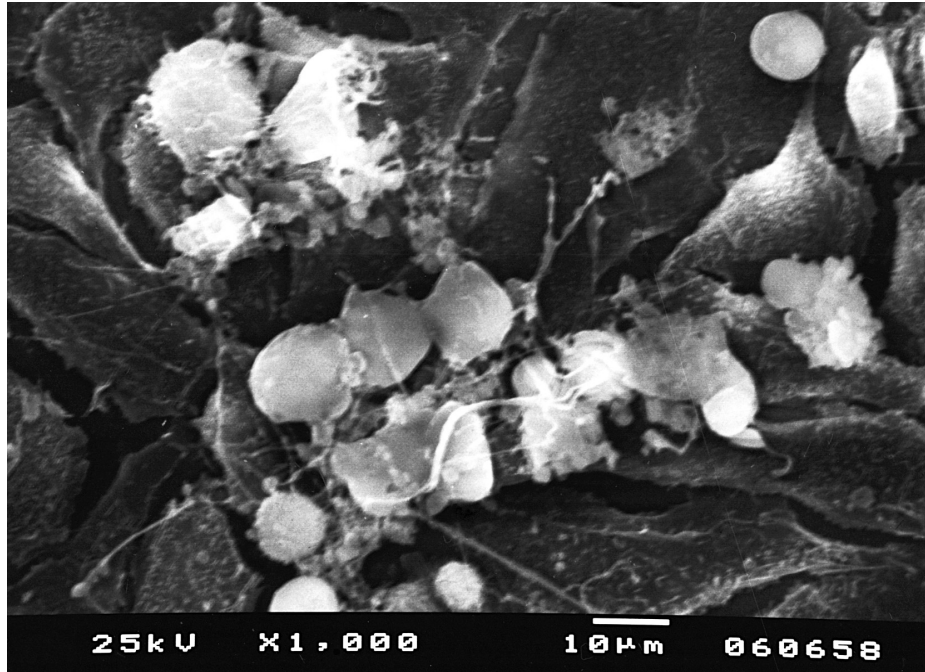
Resim 15: 24.saat Resveratrol grubu; iki boyutlu kültürlerde MDAH 2774 over tümör hücrelerinin kontrol grubuna benzeyen elektron mikrografi x 500



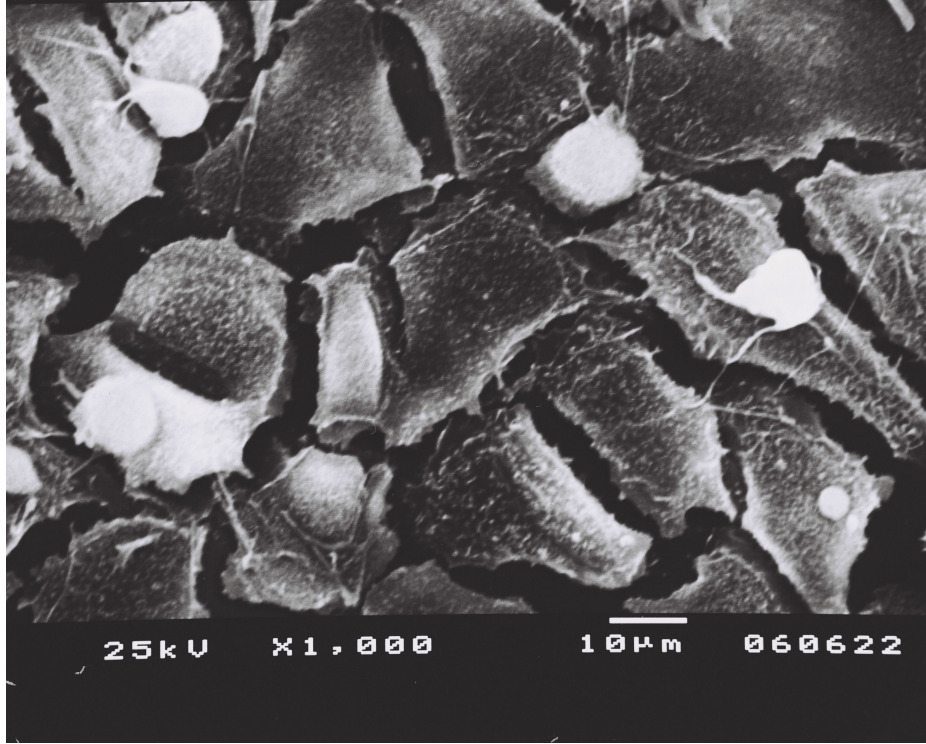
Resim 16: 96.saat Resveratrol grubu; yuvarlak görümlü dejenere tümör hücrelerinin elektron mikrografi x 750



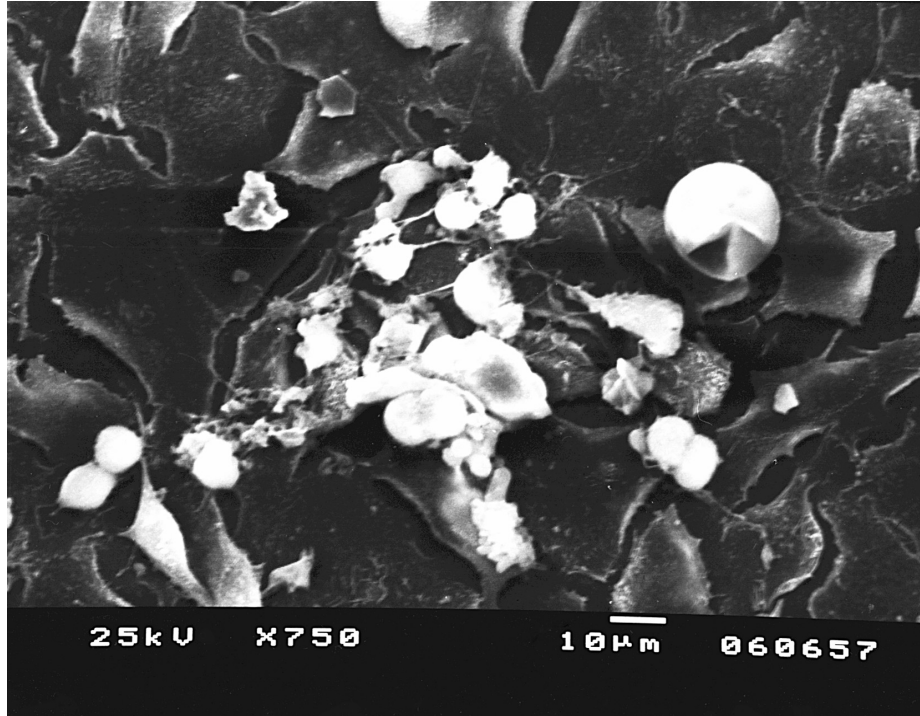
Resim 17: 24.saat Parasetamol grubu; kontrol grubuna benzer bir görünüm gösteren hücrelerin elektron mikrografi x 500



Resim 18: 96. saat Parasetamol grubu; 24. saate göre daha dejenere görünen hücrelerin elektron mikrografi x 1000



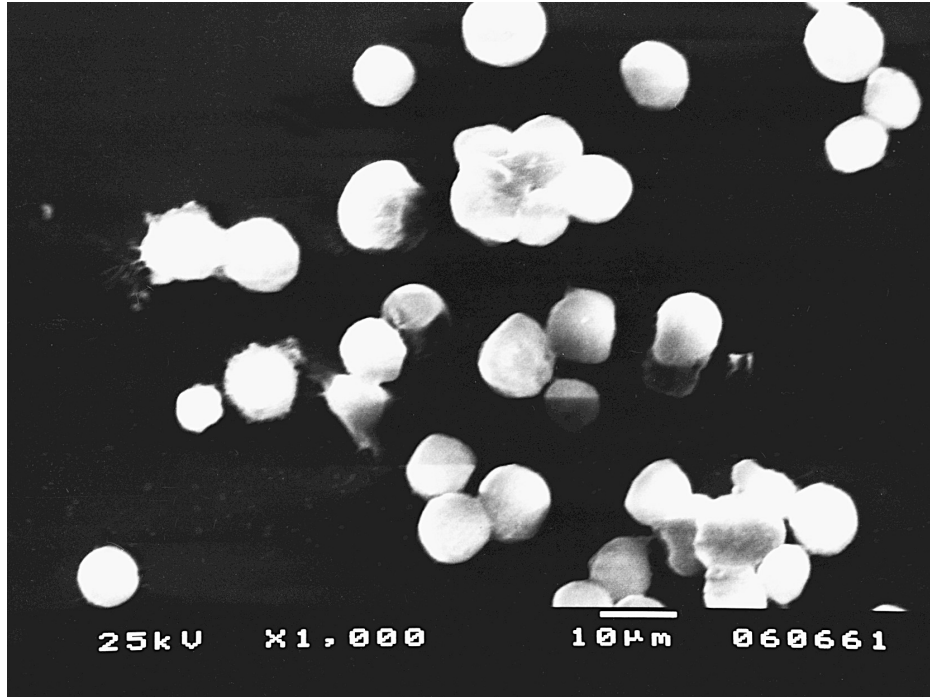
Resim 19: 24.saat Gemcitabin grubu; hücre yapısı bozuk tümör hücrelerinin elektron mikrografi x 1000



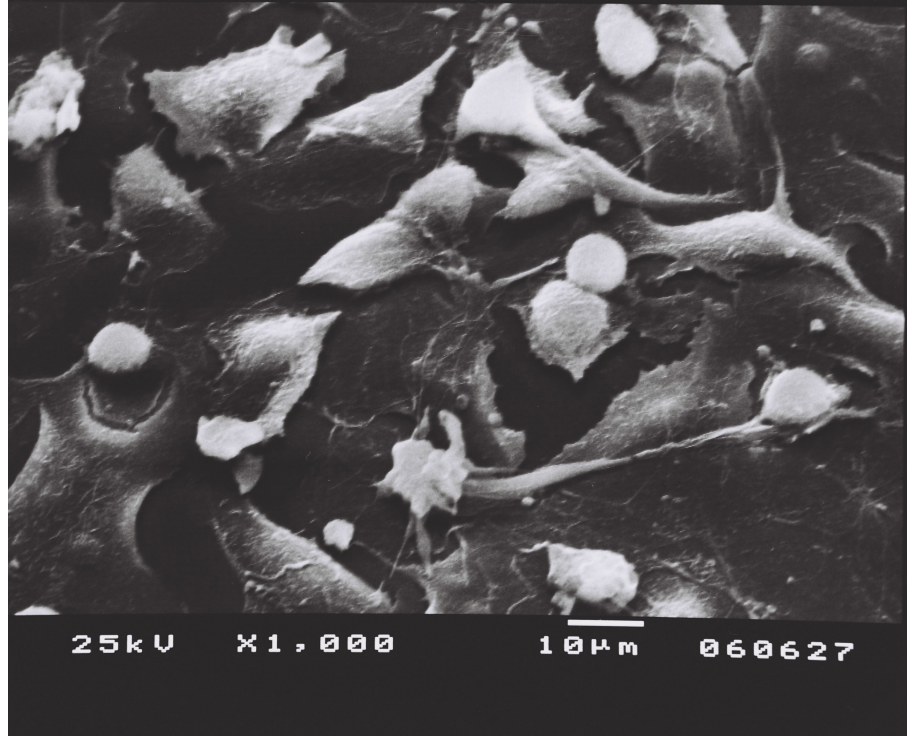
Resim 20: 96.saat Gemcitabin grubu; 24. saate göre daha bozuk tümör hücrelerinin elektron mikrografi x 750



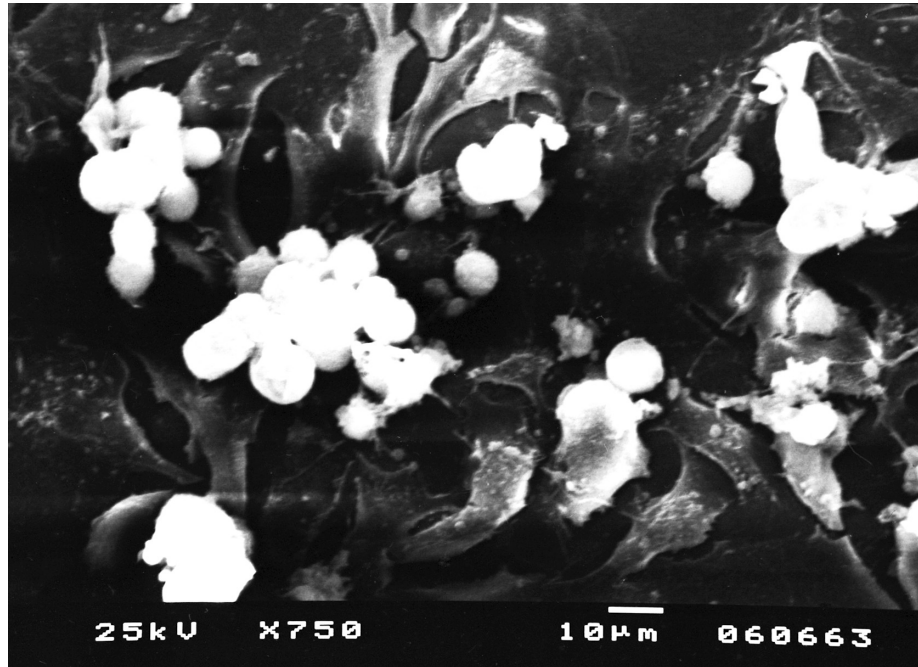
Resim 21: 24.saat Resveretrol + Gemitabin grubu; Proapoptotik özellik gösteren hücrelerin elektron mikrografi x 500



Resim 22: 96.saat Resveratrol + Gemitabin grubu; yuvarlak, yapıları bozulmuş hücrelerin elektron mikrografi x 1000



Resim 23: 24.saat Parasetamol + Gemcitabin grubu; hücre yapısı bozulmuş hücrelerin elektron mikrografi x 1000



Resim 24: 96.saat Parasetamol + Gemcitabin grubu; yapısı bozuk, yuvarlak, apoptotik hücrelerin elektron mikrografi x 750

TARTIŞMA

Over kanseri, kadın genital kanserleri içinde en çok ölüme neden olan kanserlerden biridir. Yine ölüme neden olma açısından genel kanserler içinde de meme, bağırsak ve akciğer kanserlerinden sonra dördüncü sırayı alır. Ayrıca endometriyum ve serviks kanserinin toplamından daha fazla ölüme neden olur. Çünkü hastalık ileri evrelere kadar ulaşmadan herhangi bir belirti vermemektedir (37,38).

Over kanseri tüm genital kanserlerin %20-25'ini oluşturur. Tüm kadınların %1-2'sinin hayatının bir döneminde over kanserine yakalanacağı hesaplanmıştır. Over kanserlerinin epidemiyolojik verileri ülkeler arasında farklılıklar gösterse de, sık rastlanan kadın genital kanserleri arasında her zaman ilk beş hastalık içinde yer almaktadır. Over kanserinin Türkiye' deki durumu elde çok az veri olduğundan sağlıklı olarak değerlendirilememekle birlikte, yapılan çalışmalarda genital kanserler arasında ilk beş tümör arasında yer alır (37,38).

A.B.D ve Avrupa

1. Endometriyum kanseri
2. Over kanseri
3. Serviks kanseri
4. Vulva kanseri
5. Uterus kanseri

Türkiye

1. Serviks kanser
2. Endometriyum kanseri
3. Over kanseri
4. Uterus kanseri
5. Vulva kanseri

Over kanserlerinin %90'ı epitelyal kökenlidir ve daha çok sanieleşmiş ülkelerde görülür. Etyolojisinde öne çıkan belirli bir etken olmadığı için korunma amacıyla yapılabilecek önemli tavsiyelerde bulunmak mümkün değildir. Bu durumda hastalıkla mücadelede başarılı olabilmek, ancak kanseri mümkün olduğunca erken yakalamakla gerçekleşebilir (37,38).

Over kanseri olan hastalar %70-80 oranında evre III ve evre IV' de iken hekime başvurmaktadır. Bunun nedeni hastalığın uzun bir dönem semptom vermeden seyretmesi veya semptomların overe spesifik olmamasıdır. Hastayı hekime getiren şikayet genellikle karın ağrısı ve karın şişliğidir (37,39). Bu yakınmalar ortaya çıktığında da hastalık genellikle ileri evrelere ulaşmıştır ve bu aşamada konvansiyonel kemoterapi ajanlarıyla yapılan tedavilerde hastalarda tam iyileşme şansı

sağlanamamaktadır(39). Bu durum, var olan kemoterapi ajanlarının etkin dozlarının, farklı kombinasyonlarla kullanılmasının yanı sıra, yeni ilaçların denenmesinin gerekliliğini doğurmuştur.

Klasik tedavi yöntemlerinin kanser tedavisindeki önemi tartışılmazdır. Fakat kanser vakalarının sayısının artışı ve kullanılan ilaçlara karşı direnç, yeni teşhis ve tedavi yöntemlerine duyulan ihtiyaç, başta ‘geleneksel bitkisel tıp’ gibi alternatif tedavi yöntemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur (8).

Son yıllarda çalışmalar özellikle üzüm çekirdeğinde ve kabuğunda bol miktarda bulunan ve antioksidan özelliği iyi bilinen resveratrol gibi maddelerin kanserden koruyucu etkiden sorumlu olabileceğini ortaya koymuştur (40). Literatürlerde 1-100 mikroM resveratrolün hematopoetik ve solid organ tümör hücre dizilerinde, sitotoksik ve apoptozisi indükleyici özellikleri olabileceğine dair yayınlar bulunmaktadır (40). Yine bazı yayınlarda kanser hücre soylarında resveratrolün apoptozise neden olabileceği ve bu etkisi ile kanser hücrelerinin proliferasyon oranını düşürebileceği gösterilmiştir (41, 42, 43).

Resveratrolün 1 nanoM-100 mikroM arasında değişen dozları ile yapılan bir çalışmada, ID50 değerleri değişen hücre dizilerinde 1-100 mikroM olarak bulunmuş ve tek başına kullanılması durumunda, epitelyal ve hematolojik tümör hücre dizilerinde sitotoksik olduğu görülmüştür (40). Çalışmamızda Omay ve arkadaşlarının bu bulgularına paralel olarak, resveratrolün, MDAH-2774 hücrelerinde ölüme neden olduğunu, iki boyutlu kültürlerde sayısal olarak belirledik ve bu dozun hücre siklusunun sentez fazında azalmaya yol açtığı belirgin olarak saptandı. Resveratrolün 24., 48. ve 96. saatlerde, kontrol grubuna göre sentez fazı işaretlenme oranını anlamlı derecede düşürdüğü ($p < 0,05$), ve 10 mikroM’lık dozunun tüm zaman dilimlerinde hücre proliferasyonunu azalttığı görüldü (tablo 1)

Aggarwal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, resveratrol kanser tedavisinde moleküler hedefi olan COX-1, COX-2 ve Nf-kappaB inhibisyonunu gerçekleştirirken, p53, bax ve kaspaz aktivitelerinde de artışa neden olduğu gösterilmiştir (8). Nf-kappaB hücre içi transkripsiyon faktörüdür ve çeşitli uyarıların ardından çekirdeğe geçip, DNA’ya bağlanarak uyarının gerektirdiği spesifik genleri aktifleyip, protein sentezini gerçekleştirir. Ayrıca kanser hücrelerini sürekli aktif tutarak hücre fonksiyonunu bir anlamda kötüye kullanır. Hücre çoğalmasını uyarıcı, ya da hücre ölümünü engelleyici fonksiyonlarının yanı sıra, hücrenin yüzeye tutunmasını da uyarır (24,25). Resveratrolün, Nf-kappaB aktivasyonunu baskıladığı, epitelyal (HeLa), lenfoid (Jurkat),

myeloid (U937) gibi bir çok kanser hücre soyunda gözlenmiştir (7,44,45). Bizde çalışmamızda, resveratrolün MDAH-2774 over tümör hücrelerin de tüm zaman dilimlerinde, hücre proliferasyonunda azalma meydana getirdiğini gördük.

DNA replikasyonunu ve tamirini engelleyen bir ilaç olan gemsitabin ile 5-florourasili (5-FU) karşılaştıran randomize bir çalışmada, bu ilacın hem sağkalım oranını artırdığı, hem de hastalarda yan etkiye daha az neden olması açısından daha üstün olduğu gösterilmiş ve pankreas kanserlerinin tedavisinde, birinci seçenek olarak kullanılması önerilmiştir. Gemsitabin aynı zamanda tümör hücrelerinin radyoterapiye karşı duyarlılığını da arttıran bir ilaçtır ve radyoterapi ile birlikte kullanılan gemsitabin, tümör hücrelerinin DNA sentezinin inhibisyon süresini uzatmaktadır (46).

Bizim çalışmamızda da gemsitabin, MDAH- 2774 over tümör hücreleri üzerine ileri derecede etkili bir ilaç olduğunu gösterdi, hücre proliferasyonunun inhibisyonuna ($p<0,05$) paralel olarak, BrdU işaretlenme indeksinin inhibisyonunda da anlamlı derecede azalma meydana getirdi. Sentez fazı hücre oranındaki bu azalma literatür bilgisi ile paralellik gösterdi (47,48). Gemsitabin 24, 48 ve 72. saatlerde hücre proliferasyonunu azalttı ($p<0,05$) ve 24, 48. saatlerde BrdU-LI düzeyini düşürdü. Gemsitabin 72 ve 96. saattlerde ise kontrole göre anlamlı bir azalma ($p< 0,05$) meydana getirmekle beraber kendi grubunda hücre sayısını ve BrdU ile boyanan hücrelerde artış meydana getirdi (tablo3).

Tümör hücre topluluğunda, özellikle meme kanserinde, hızlı hücre siklusu ve DNA değişkenliği nedeni ile heterojen bir populasyon oluştuğu gözönüne alınacak olursa (49), gemsitabinin in vitro sistemde ilaca duyarlı hücrelerde tam bir inhibisyon sağladığı söylenebilir. Bununla birlikte, duyarlı hücreler ortadan kalktıkça, başlangıçta sayıları az da olsa dirençli bir miktar hücrenin, tekrar hücre siklusuna girerek, bölünüp, çoğalarak sayılarını artırdığı söylenebilir.

C6 ve U138-MG gliom hücre kültürlerinde indometazinin, hücre siklusunun değişik evrelerinde hücre proliferasyonunu baskıladı ve bu durumun ERK gibi çeşitli hücre içi sinyal yollarını inhibe etmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (50). Parasetamolün de gliom hücre kültüründe proliferasyonu engellediği ve apoptoza neden olduğu bilinmektedir (51, 52). Çalışmamızda da parasetamol izlenen tüm zaman dilimlerinde hücre proliferasyonunu azaltmakla beraber (Tablo 1), BrdU-LI değerlerini kontrol grubuna göre 72. ve 96. saatlerde artırmıştır (Tablo 2). Bu etkisi ile parasetamolün MDAH-2774 over tümör hücre soyuna etkisi literatür bilgisi ile örtüşmemektedir.

NSAI ilaçların antikanser özellikleri arasında, Nf-kappaB transkripsiyon faktörünü de inhibe etmelerinin önemli olduğu belirtilmektedir (1). Nf-kappaB'nin hücre çoğalmasını ve tutunmasını uyardığını biliyoruz (24,25). Dolayısı ile NSAI bir ilaç olan parasetamolün Nf-kappaB'yi durdurucu etkisi (53) hücre proliferasyonunu azaltmak yoluyla ya da DNA sentezini attırma bile hücre ölümünü hızlandırmak yolu ile olabilir. Bu analjezik ilacın MCF-7 meme kanseri hücrelerinde DNA sentezini uyardığını ve bu etkisini taşıdığı fenol halkası ile östrojen reseptörlerinin etkileşimine bağlı olarak gösterdiği açıklanmıştır (54,55).

Son yıllardaki çalışmalar siklooksijenaz enziminin peroksidaz fonksiyonunun bulunduğunu, bu fonksiyonun karsinogen ksenobiyotikleri aktifleyebildiğini; dolayısıyla enzimin kronik baskılanmasının aktif karsinogen düzeylerini düşürebileceğini göstermiştir (56).

Parasetamol glutatyon S- transferaz enziminin aktivitesini azaltabilir (57). Bu enzimler over kanserinde cisplatin ve carboplatin gibi antikanser ilaçlara karşı direnç oluşturan mekanizmada yer almaktadır. 2002 senesinde Bilir A. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, parasetamolün MDAH-2774 insan over kanser hücresinde carboplatin duyarlılığını artırdığı gösterilmiştir (58).

Asetaminofenin, over kanserinde hücre büyümesinin inhibisyonunda etkili olduğunu düşündüren birçok moleküler mekanizma mevcuttur ve bu konuda araştırmalar devam etmektedir. Asetaminofen, P450 sistemi ile N-asetil-p-benzokuinon imine (NAPQ1)'e dönüştürülür ve bu hücrelerde esansiyel olan tiol yapılarının ağır yıkımına yol açan redüklenmiş glutatyon (GSH) ile detoksifiye edilir. GSH bir kez yıkıma uğradığında, NAPQ1 esansiyel hücre proteinleri ile reaksiyona girerek membran Ca^{2+} ATPaz yıkımına, nükleer Ca^{2+} birikimine, mitokondriyal oksidant strese ve kaspaz-3 bağımsız DNA fragmentasyonuna yol açar, böylece hücre ölüme gider.

P450 komponentleri arasında, mikrozomal CYP2D6, asetaminofenin sistein konjugasyonunu katalizler. Bazı CYP2D6 varyantlarının asetaminofeni artan oranlarda NAPQ1'e metabolize etmesi olasıdır. Bu da, sürekli asetaminofen uygulamasıyla pre-malign over kanser hücrelerinin kendi kendini yok etme ve erken eliminasyonuna aracılık eder (1).

Kombinasyon gruplarımızda hem hücre proliferasyonunda, hem BrdU-LI'de, anlamlı bir azalma görülürken, hücre sitotoksitesinde de artış izlendi. Hücre sitotoksitesinde meydana gelen bu artışı parasetamolün gemsitabin etkisini sensitize

etmesi şeklinde yorumlayabiliriz. NSAİ ilaçların pankreas, kanserinde gempitabin duyarlılığını artırdığını, bunun da siklooksijenaz enziminin inhibisyonuyla bağlantılı olduğu gösterilmiştir. (59). Parasetamol bu etkiyi, hücreleri daha fazla S-fazına yönlendirerek, S-fazına spesifik bir ilacın DNA'ya bağlanma özelliğini artırarak göstermiş olabilir. Parasetamolün ve resveratrolün hücrelerde apoptozisi artırarak tutunmuş hücreleri azaltması ve gempitabin varlığında hücre ölümünü daha da hızlandırması bunu belirleyen bir diğer mekanizma olabilir.

Gempitabin etkisinin 72.saatten başlayarak 96.saatte ortadan kalkması, fakat parasetamol ve gempitabin kombinasyonunun özellikle 72. ve 96.saatteki DNA sentez inhibisyonunun gempitabinin tek başına etkisinden güçlü olması dikkat çekicidir (Tablo 3). Aynı etki resveratrol ile kombinasyonu için de geçerlidir (Tablo 3). Bu durum NSAİ ilaçların tümör hücre popülasyonunda zamanla dirençli suşların gelişmesini baskılaması ile açıklanabilir. Kemoterapi ajanlarının gücü göz ardı edilemese de, bu ajanların kullanımı sırasında hastalık tekrarlayabilmekte ve bazen daha önce tedavide hiç kullanılmayan ilaçlara karşı bile bir direnç mekanizması gelişebilmektedir. Malinitelerde gözlenen bu çoklu ilaç direnci (MDR); hücre içi ilaç birikiminde azalma (ilacın hücre içine girişinde azalma veya hücre dışına atma işlevinde artış), ilaç hedef ilişkisinde azalma, detoksifikasyon işlevinde artış veya ilaç dağılımında değişiklik şeklinde özetlenebilir (60).

Malinitelerde ilaç direncinden sorumlu birçok mekanizma tanımlanmıştır. İlk defa 1976'da 170 kDa'luk hücre membran proteini olarak tanımlanan P-glikoprotein (P-gp) hücre içi ilaç birikimini azalttığı saptanmıştır (60). Nitekim Draper ve arkadaşlarının bir çalışmasında direnç geliştikten sonra P-gp'ine bağlı kanser ilaç direncinin indometazin gibi NSAİ ilaçlar tarafından durdurulduğu gösterilmiştir (61).

Kombinasyon gruplarında gözlediğimiz bu azalma, NSAİ ilaçların gelişen P-gp direncini kırması ile açıklanabilir.

Resveratrol etkisiyle meydana gelen apoptozis de, resveratrolün bu etkiyi, kaspaz aktivitesinin artışı, hücre siklusunun G1 fazında blokajı, siklin D1 ve siklin bağımlı kinaz-4'ün seviyesinin azalması ve Bax seviyesinin artışı ile gerçekleştirildiği gösterilmiştir (7).

İnsan kanserlerinin gelişmesinden sorumlu moleküler mekanizmalar konusunda bugün ulaştığımız bilgi düzeyine rağmen, kanser bilimsel ilgi alanının ötesinde, pek çok insanın hayatını elinden alan korkutucu bir hastalık olmaya devam etmektedir. Bu yüzden hem günümüzde, hem de gelecekteki araştırmaların başlıca hedefi, bilgimizin

bu hastalıktan korunma ve sağaltım konusunda pratik gelişmelere dđnüşmesi olmalıdır. Kanserin moleküler biyolojisini aydınlatmaya yönelik gelişmeler, kanserden korunma ve tedavi konusunda yeni yaklaşımların ortaya çıkmasına katkıda bulunmaktadır (62).

İleride yapılacak moleküler ve enzimatik çalışmalar ile hem NSAI ilaçların hem resveratrolün sadece kanserden koruyucu etkileri değil, aynı zamanda tümör hücrelerini ilaç direncini kırıcı mekanizmalarının aydınlatılması mümkün olacaktır.

SONUÇ

Çalışmamızda, nükleozid analogu olan ve başta pankreas kanseri tedavisi olmak üzere solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan gempitabinin, MDAH-2774 over tümörü hücre kültüründe etkisi incelenirken, aynı zamanda ilaç etkilerinin doğal bir polifenolik bileşik olan resveratrol ve NSAİ bir ilaç olan parasetamol ile değişimleri zaman dilimleri içerisinde araştırıldı.

Sonuç olarak gempitabinin çok etkin bir aktiviteye sahip olduğu, ilk 72. saate kadar hem hücre proliferasyonunu, hem de S-fazı düzeyinde çok yüksek bir inhibisyon sağladığı gözlemlendi. Tutunan hücrelerde 24.,48. ve 72. saatlerde azalma görülürken, 96. saatte artış görüldü. Bununla birlikte hem parasetamol, hem de resveratrol, tutunan hücre sayısının yeniden artışına engel oldu. Kombinasyon gruplarında tüm zaman dilimlerinde anlamlı hücre proliferasyon inhibisyonu, hücre sitotoksitesinde artış ve sentez fazı işaretlenmesinde büyük oranda azalma gözlemlendi. Elektron mikroskopide kontrol grubuna göre hücre ölümünün daha fazla olduğu ve yapısal bozukluğun belirgin olduğu gözlemlendi.

Böylece çalışmamızda, resveratrol ve gempitabinin MDAH-2774 over tümör hücrelerinde, hücre ölümü ile tümör hücre çoğalmasını azalttığı, kombinasyon gruplarında bu etkinin daha güçlü olduğu saptandı. Buna karşın parasetamolün tek başına anlamlı bir etkinliğinin olmadığı gözlenirken, gempitabin ile kombinasyonunun bu etkiyi artırması parasetamolün, gempitabin duyarlılığını artırmış olabileceğini düşündürdü.

İleride yapılacak çalışmalarda, resveratrolün tümör invazyonu ve anjiogenezi üzerine etkilerinin üç boyutlu tümör modelleri kullanılarak, moleküler ve genetik çalışmaların ışığı altında, kanser tedavilerine katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Altinoz M.A and Bilir A. (2005): Inflammation, Nonsteroid and Steroid Anti-Inflammatory Agents and Ovarian Cancer In: Treatment of Ovarian Cancer, pp. 97-11
2. Liotta LA., Steeg PS., Stetler- Stevenson WG. (Cell 1991): Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation, 64:327-36
3. Kaufmann M., Von Minckwitz G. (1997): Gemcitabine in ovarian cancer: an overview of safety and efficacy, Eur J Cancer Jan; 33 Suppl 1:S31-3
4. Gemcitabine ®, Preparat reçetesi (Lilly)
5. Kayaalp O. (2000): Rasyonel Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji, Güneş Basımevi
6. İkizler M., Dernek S., Erkasap N., Kaygisiz Z., Sevin B., Kural T. (2003): The Hemodynamic efficacy of Resveratrol on Reperfüzyon Injury in Isolated Rat Hearts, 11:91-9
7. Wenzel E., Somoza V. (2005): Metabolism and Bioavailability of Trans-Resveratrol, Mol. Nutr. Food Res., Feb. 4:49,00 (Wiley)
8. Aggarwal B.B., Shishir S. (2006): Molecular Targets of Dietary Agents for Prevention and Therapy of Cancer, J Biochemical Pharmacology; 10.1016 (Elsevier)
9. Sadler T.W. : Langman's Medical Embryology, pp
10. Martını F. H., Welch K (2001): Fundamentals of Anatomy and Physiology , pp.233-237
11. Kierszenbaum L.A (2002): Histology and Cell Biology, pp. 565-567
12. Janqueira L.C., Carneiro J (2006): Basic Histology, pp. 449-450
13. Karavelli Ş. (2003): Overin İnvaziv Yüzel Epitel Tümörlerinin Ayırıcı Tanısı ve Prognostik Faktörler, XVII. Ulusal Patoloji Kongresi 29-31 Mayıs; Kongre Programı ve Bildiri Özet Kitabı
14. Disaia P.J., Creasman W.T. (2003): Clinical Gynecologic Oncology, Mosby Inc. Çeviri editörü: Ayhan A. Güneş Kitabevi pp 259-351
15. Boyd J. (2001): Molecular Genetics of Hereditary Ovarian Cancer, Rubin S, Sutton G, eds. Ovarian Cancer. Philadelphia: Lippicott, Willams & Wilkins, pp3-17
16. Edmondson R.J., Monaghan J.M. (2001): The Epidemiology of Ovarian Cancer, Int J Gynecol Cancer; 11:423-29

17. Benedet J.L., Bender H., Jones H., Pecorelli S. (2000): Staging Classifications and Clinical Practice Guidelines of Gynaecologic Cancers, Elsevier; pp. 92-118
18. Montag T.W. (1990): Tumor markers in Gynecologic Oncology, *Obstet. Gynecol Surv*; 45:94-105
19. Galmarini C.M., Mackey J.R., Dumontet C. (2001): Nucleoside analogues: Mechanism of Drug Resistance and Reversal Strategies, *Leukemia*; Jun; 15(6): 875-90
20. Oulet M., Percival M.D. (2001): Mechanism of Acetaminopen Inhibition of Cyclooxygenase Isoforms, *Arch Biochem Biophys*; 387(2): 273-80
21. Chan T.A., Morin P.J., Volgestein B. (1998): Mechanism Underlying Nonsteroidal Antiinflammatory Drug- Mediated Apoptosis, *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 681-86
22. Klampfer L., Cammenga J., Wisnieswski H.G., et al (2000): Sodium Salicylate Activate Caspases and Induces Apoptosis of Myeloid Leukemia Cell Lines, *Blood*; 93(7): 2386-2394
23. Kokoska E.R., Smith G.S., Miller T.A. (2000): Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs Attenuate Proliferation of Colonic Carcinoma Cells by Blocking Epidermal Growth Factor- Induced Ca⁺⁺ Mobilization, *J Gastrointest Surg*; 4(2): 150-61
24. Sharma H.W., Narayanan R. (1996): The Nf-KappaB Transcription Factor in Oncogenesis, *Anticancer Reseach*; 16(2): 589-96
25. Luque I., Gelinas C. (1997): Rel/Nf-KappaB and I kappaB Factors in Oncogenesis, *Semin Cancer Biol*; 8(2): 103-11
26. Lazar-Molnar E., Hegyesi H., Toht S., Falus A. (2000): Autocrine and Paracrine Regulation by Cytokines and Growth Factors in Melanoma, *Cytokine*; 12(6): 547-54
27. Taketo M.M. (1998): Cyclooxygenase-2 inhibitors in Tumorigenesis (Part II), *J Natl Cancer Inst*; 4;90(21): 1609- 20
28. Cramer D.W., Harlow B.L., Titus- Ernsthoff L., Bolhke K., Welch W.R., Greenberg E.R. (1998): Over-the-counter Analgesics and Risk of Ovarian Cancer, *Lancet*; 351:104-107
29. Corre Le L., Chalabi N., Delort L., Bignon Y.J., Bernard- Galon D.J. (2005): Resveratrol and Breast Cancer Chemoprevention: Molecular Mechanism, *Mol. Nutr. Food Res.* 49.00-00
30. McElderry Melissa Q.B. (1999): Grape Expectations: The Resveratrol Story, [Quackwatch Home Page](#)

31. Zunino J. S., Storms D.H. (2005): Resveratrol-induced Apoptosis is Enhanced in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells by Modulation of The Mitochondrial Permeability Transition Pore, *J Cancer Letters*; 1-12
32. Busquets s., Ametller E., Fuster G., Olivan M., Raab V., Argiles J.M., Lopez-Soriano J.F. (2006): Resveratrol, a Natural Diphenol, Reduces Metastatic Growth in an Exprimental Cancer Models, *J Cancer Letters*; 1-5
33. Anıl YD. (1986): Doku ve Hücre Kültürlerine Genel Bakış. In: Erbenği T.: *Biyoloji Ders Notları*, İstanbul, Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş., s.470-481
34. Özalkan A. (2001): *Temel Radyobiyoloji*, Haliç Üniversitesi Yayınları, İstanbul, s.91-97
35. Demir R (editör) (2001): *Histolojik Boyama Teknikleri (Başvuru Kitabı)*; Palme Yayıncılık, Ankara, s.262-283
36. Babich H., Reisbaum A.G., Zuckerbraun H.L. (2000): In Vitro Response of Human Gingival Epithelial S-G Cells to Resveratrol, *Toxicol Letter*; 114: 143-53
37. Arıkan İ.İ., Arıkan D. C., Abalı R., Özkılıç T., Bozkurt S. (2004): Epitelyal ve Nonepitelyal Malign Over Tümör, *İstanbul Tıp Dergisi*; 4:20-22
38. Ayhan A., Yapar E.G. (1999): *Malign Over Tümörleri*, Jinekolojik Onkoloji içinde;Logos Yayıncılık, İstanbul, bölüm 22
39. Coppleson M., Monaghan J.M., Morrow C.P. (1999) : Malignant and Borderline Epithelial Tumors of Ovary Clinical Features Diagnosis İntraoperative Assesment and Review of Management, pp; 889
40. Şahin F., Avcu F., Saydam G., Yılmaz M. İ., Sarper M., Hışıl Y., Ural A.U., Omay S.B. (2004): Kırmızı Üzüm Çekirdeği Ekstraktı ve Ana Bileşenlerinden Resveratrol ve Boraks Malign Hücre Dizileri Üzerinde Sitotoksik Etki Göstermektedir, *Turkish Journal of Haematology*; 21,3
41. <http://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>
42. Benitez D.A., Pozo-Guisado E., Alvarez-Barrientos A., Fernandez-Salguero P.M., Castellon E.A. (2006): Mechanisms involved in resveratrol-induced apoptosis and cell cycle arrest in prostate cancer-derived cell lines, *Journal of Andrology*
43. Riles WL., Erickson J., Nayyar S., Atten MJ, Attar BM., Holian O. (2006): Resveratrol engages selective apoptotic signals in gastric adenocarcinoma cells, *World Journal of Gastroenterology*; 12(35): 5628-5634
44. Pervaiz S. (2004): Chemotherapeutic Potential of the Chemopreventive Phytoalexin Resveratrol, *Drug Resistance Updates*; 7:333-334 (Elsevier)

45. Manna S.K., Mukhopadhyay A., Aggarwal B.B. (2000): Resveratrol Suppresses TNF-induced Activation of Nuclear Transcription Factors $\text{NF-}\kappa\text{B}$, Activator protein-1 and Apoptosis: Potential Role of Reactive Oxygen Intermediates and Lipid Peroxidation, *J Immunol*; 164: 6509-6519
46. Turna H., Demir G. (2002): Pankreas Kanseri Tedavisine Medikal Onkolojik Yaklaşım, *İ.Ü Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri*; Ocak; s. 231-236
47. Fontecave M. (1998): Ribonucleotide Reductases and Radical Reactions, *Cell. Mol. Life Sci*; 54:684-695
48. Grunewald R., Kantarjian H., Du M., Faucher K., Tarassoff P., Plunkett W. (1992): Gemcitabine in Leukemia: A Phase I Clinical, Plasma, and Cellular Pharmacology Study, *Jour of Clin Onco*; 10,3 pp 406-413
49. Smith H.S., Wolman S.R., Hackett A.J. (1984): The Biology of Breast Cancer at the Cellular Level, *Bioc Biop Acta*; 738(3): 103-23
50. Zhu G.H., Wong B.C.Y., Ching C.K., Lai K.C., Lam S.K. (1999): Differential Apoptosis by Indomethacin in Gastric Epithelial Cells Through the Constitutive Expression of Wild-Type p53 and/or Up-Regulation of c-myc, *Biochem Pharmacol*; 58 (1):193-200
51. Bernardi A., Jacques-Silva M.C., Delgado-Canedo A., Lenz G., Battastini M. (2006): Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit the growth of C6 and U138-MG glioma Cell Lines, *Eur J Pharmacol*; 532(3): 214-22
52. Joki T., Carroll R.S., Dunn I.F., Zhang J., Abe T., Black P.M. (2001): Assessment of Alteration in Gene Expression in Recurrent Malignant Glioma After Radiotherapy Using Complementary Deoxyribonucleic Acid Microarrays, *Neurosurgery*; 48(1):195-201
53. Boulares H.A., Giardina C., Inan M., Khairallah A.E., Cohen S.D. (2000): Acetaminophen Inhibits $\text{NF-}\kappa\text{B}$ Activation by Interfering with the Oxidant Signal in Murine Hepa 1-6 Cells, *Toxicological Sciences*; 55,370-375
54. Theophilus Harnagea E., Miller R.M. (1998): Acetaminophen Alters Estrogenic Responses in Vitro: Stimulation of DNA Synthesis in Estrogen Responsive Human Breast Cancer Cells, *Toxicological Sciences*; 46, 38-44
55. Theophilus Harnagea E., Gadd S.L., Trent-Knigh A.H., DeGeorge G.L., Miller R.M. (1999): Acetaminophen- Induced Proliferation of Breast Cancer Cells Involves Estrogen Receptors, *Toxicological and Applied Pharmacology*; 155, 273-279

56. Zhou L., Ericson R.R., Hardwick J.P., Park S.S., Wrighton S.A. (1997): Catalysis of the Cysteine Conjugation and Protein Binding of Acetaminophen by Microsomes from a Human Lymphoblast Line Transfected with the cDNAs of Various Forms of Human Cytochrome P450, *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*; 281:785-790
57. Özdemirler G., Aykaç G., Uysal M., et al (1994): Liver Lipid Peroxidation and Glutathione-related Defence Enzyme Systems in Mice Treated with Paracetamol, *J Appl Toxicol*; 14(4): 297-299
58. Bilir A., Altinoz M.A., Atar E., Erkan M., Aydinler A. (2002): Acetaminophen Modulations of Chemotherapy Efficacy in MDAH 2774 Human Endometrioid Ovarian Cancer Cells in Vitro, *Neoplasma*; 49,1:38-42
59. Yip-Schneider T.M., Sweeney J., Jung S., Crowell P.L., Marshall M.S. (2001): Cell Cycle Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Enhanced Growth Inhibition in Combination with Gemcitabine in Pancreatic Carcinoma Cells, *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics*; 298: 976-985
60. Avcu F. (2006): Hematolojik Malignitelerde İlaç Direnç Mekanizmaları, *Temel Moleküler Hematoloji Kursu*
61. Draper M.P., Martel R.L., Levy S.B. (1997): Indomethacin- Mediated Reversal of Multidrug Resistance and Drug Efflux in Human and Murine Cell Lines overexpressing MRP, But Not P-glicoprotein, *Br. J. Cancer*; 75(6):810-815
62. Cooper M.G., Hausman E.R. (2006): Hücre Moleküler Yaklaşım, Editör: Sakızlı M, Atabey N. *İzmir Tıp Kitabevi* s:664-665

ÖZGEÇMİŞ

İlköğrenimimi Gazi İlkokulunda, orta ve lise eğitimimi Cumhuriyet (Süper) Lisesinde tamamladıktan sonra 1998 senesinde Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldum. 2002 yılında yapılan tıpta uzmanlık sınavını kazanarak İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında çalışmaya başladım. Katıldığım kurs ve kongreler:

- 1-) Uygulamalı Stereoloji Kursu Pamukkale Üniversitesi 20 - 23 Mayıs 2003
- 2-) Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu Süleyman Demirel Üniversitesi 19 - 21 Haziran 2003
- 3-) Moleküler Genetik Kursu DETAM 18 - 19 Aralık 2003
- 4-) Kordon Kanı ve Kök Hücre Bankacılığı Kursu İstanbul Üniversitesi 07 - 09 Mayıs 2004
- 5-) Üremeye Yardımcı Tedaviler Kursu İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak. IVF Ünitesi 08.04.2005
- 6-) Sperm Hazırlama ve İnseminasyon Kursu İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak. IVF Ünitesi 09.04.2005
- 7-) Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Deney Hayvanları Etik Kurulu 11 - 12 Nisan 2005
- 8-) Tıpsal Araştırma ve Yöntem Bilimi ve Biyoistatistiksel Değerlendirme Kursu Sürekli Tıp Etkinlikleri 07.12.2005
- 9-) 9th. National Stem Cell and Gene Therapy Congress 7 - 9 May 2004
- 10-) 13th. World Congress on In Vitro Fertilization Assisted Reproduction and Genetics 26 - 29 May 2005
- 11-) 17. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi 23 - 25 Haziran 2005
- 12-) Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu 12 - 15 Mart 2006
- 13-) VII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 27 - 30 Haziran 2006
- 14-) Second International Conference On Science and Moral Philosophy (ethics) of Assisted Human Reproduct 28 - 29 April 2006