

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ISHİKAWA ENDOMETRİUM EPİTELİ DEVAMLİ HÜCRE
KÜLTÜRLERİNDE LİTYUM KLORÜR'ÜN
KARBOPLATİN SİTOTOKSİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

BİO. MERT ŞENYÜREK

**DANIŞMAN
PROF. DR. AYHAN BİLİR**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Programında Mert Şenyürek tarafından hazırlanan "Ishikawa Endometrium Epiteli Devamlı Hücre Kültürlerinde Lityum Klorür'ün Karboplatin Sitotoksitesi Üzerine Etkisi" başlıklı Yülsek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

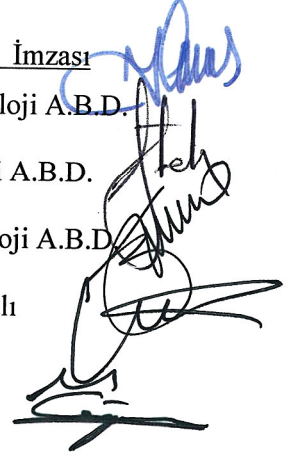
16 / 06 / 2011

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

İmzası

- 1.Prof. Dr. Ayhan BİLİR, İstanbul Üni., İstanbul Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.
- 2.Prof. Dr. Mehmet GÜRTEKİN, İstanbul Üni., İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji A.B.D.
- 3.Prof. Dr. Şule Çetinel, Marmara Üni., Marmara Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji A.B.D.
- 4.Doç. Dr. Uğur GEZER, İstanbul Üni., Onkoloji Enstitüsü, Tıbbi Onkoloji Bilim Dalı
- 5.Yrd. Doç. Dr. Mine Ergüven, Yeni Yüzyıl Üni., Tıp Fakültesi, Biyokimya A.B.D.



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Mert ŞENYÜREK



İTHAF

Beni bugünlere getiren sevgili Annem Nurgül Şenyürek ve sevgili Babam Ekrem Şenyürek'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Lisans üstü eğitimim süresince deneysel çalışmalarımı yapabilmem için gerekli tüm laboratuvar olanaklarını sağlayan, eğitimimin her aşamasında karşılıksız ve sınırsız desteğini gördüğüm, bilimsel ve hayata bakış anlamında gelişimimde büyük katkısı olan mesleğinin duayeni danışman hocam İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Ayhan BİLİR'e,

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tüm öğretim üyelerine,

Bana her zaman destek olan, manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum, ekip arkadaşım sayın Mine Şencan'a,

Her zaman her konuda yanımda olan, desteklerini kesintisiz hissettiğim, varlıklarıyla büyük güç ve neşe veren asistan arkadaşlarım sayın Müge ATEŞKAN ve Tuğba EKİZ'e,

Tez çalışmamın hazırlanması sürecinde her zaman her konuda bana destek olan yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen başta sayın Füsun ÖNCÜ olmak üzere, Selahattin ÜNAL ve Sibel DOĞAN'a,

Tez çalışmamın Deneysel aşamasında yardımcı olan Yeni Yüzyıl Üniversitesi öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Mine ERGÜVEN'e,

Elektron mikroskopisi çalışmalarımda yardımcı olan sayın Ebru KARABULUT, Fadime AKTAR ve asistan arkadaşım Şengül ÖZKASAP'a,

Sevgisini ve her konuda desteğini kesintisiz hissettiğim, varlıklarıyla büyük güç veren, beni bugünlere getirmiş, sevgili annem sayın Nurgül ŞENYÜREK, sevgili babam sayın Ekrem ŞENYÜREK ve ağabeylerim sayın Mehmet ŞENYÜREK ve Mete ŞENYÜREK'e en içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 10021

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN	İİİ
İTHAF	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET.....	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ishikawa Hücre Hattı	3
2.2. Endometrium	3
2.3. Endometrium Kanseri	3
2.4. Hücre Ve Doku Kültürü Hakkında Genel Bilgiler	7
2.4.1. Hücre Kültürü	7
2.4.2. Hücre Kültürü Çeşitleri	8
2.4.3. Hücre Kültürü Yapımının Temel Aşamaları	9
2.4.4. Sferoid	11
2.4.5. İmmünohistokimya	12
2.4.6. BrdU	13
2.5. Projede Kullanılan İlaçlar	13
2.5.1. Karboplatin (Carboplatin)	13
2.5.2. Lityum Klorür	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.1. Kullanılan Maddeler	17
3.1.1. Kimyasal Maddeler	17
3.1.2. Enzimler	17
3.1.3. İlaçlar	17

3.1.4. Kitler	17
3.1.5. Diğer Maddeler	17
3.2. Kullanılan Gereçler.....	18
3.3. Kullanılan Çözeltiler.....	18
3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler	18
3.3.2. İmmünohistokimyada Kullanılan Çözeltiler	19
3.4. Kullanılan Yöntemler	19
3.4.1. Hücre Kültürü	19
3.4.2. Doz Belirleme Deneyi.....	20
3.4.3. Proliferasyon (Tutunma) Deneyi	21
3.4.4. İki Boyutlu Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretlenme İndeksi İmmünohistokimya Tekniği	21
3.4.5. Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürü.....	23
3.4.6. İlaçların Geçirimli Elektron Mikroskobu İle Hücre İnce Yapısı (Ultrastrüktürel) Üzerine Etkilerinin Saptanması.....	23
3.4.7. Üç Boyutlu Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretlenme İndeksi İmmünohistokimya Tekniği	24
3.4.8. Akım Sitometrik Anneksin-V-FITC/PI Boyaması ile İlaçların Programlı Hücre Ölümüne Etkilerinin Saptanması.....	26
3.5. İstatiksel Yöntem.....	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Tutunma (Plating) Verileri.....	28
4.2. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretlenme İndeksi Değerleri (BrdU-LI)	29
4.3. Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretlenme İndeksi Değerleri (BrdU-LI).....	31
4.4. Akım Sitometrik Anneksin-V-FITC/PI Boyaması ile İlaçların Programlı Hücre Ölümü Üzerine Etkileri.....	33
4.5. İlaçların Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Hücre İnce Yapısı (Ultrastrüktürü) Üzerine Etkileri	36
5. TARTIŞMA	47
KAYNAKLAR	52
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Endometrium Kanseri Risk Faktörleri.	4
Tablo 4-1: İshikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde İlaçların Hücre Sayısı Üzerine Etkileri.	28
Tablo 4-2: Ishikawa Endometrial Epiteli Hücre Kültürlerinde İlaçların Sentez Fazındaki Hücreler Üzerine Etkileri.....	29
Tablo 4-3: İshikawa Endometrial Epiteli 3 Boyutlu (Sferoid Model) Hücre Kültürlerinde İlaçların Sentez Fazındaki Hücreler Üzerine Etkileri.	31
Tablo 4-4: İlaçların programlı hücre ölümü üzerine etkileri.	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Programlı Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizması.	6
Şekil 2-2: Lityum Klorür'ün Etki Mekanizması.	16
Şekil 4-1: Zamana Bağlı Hücre Çoğalma Verileri.	28
Şekil 4-2: Ishikawa Endometrium Epiteli Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU Pozitif İşaretlenme Değerleri.	30
Şekil 4-3: Ishikawa Endometrium Epiteli 3 Boyutlu (Sferoid Model) Hücre Kültürlerinde BrdU Pozitif İşaretlenme Değerleri.	32
Şekil 4-4: İlaçların Programlı Hücre Ölümü Üzerine Etkileri.	33
Şekil 4-5: İlaçların Programlı Hücre Ölümü Üzerine Etkileri (Panel)	34
Şekil 4-6: Kontrol Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.	36
Şekil 4-7: Kontrol Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.	37
Şekil 4-8: Karboplatin Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.	38
Şekil 4-9: Lityum Klorür Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.	39
Şekil 4-10: Lityum Klorür Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.	40
Şekil 4-11: Kombinasyon (Car+ LiCl) Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.	41
Şekil 4-12: Kombinasyon (Car+ LiCl) Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.	42
Şekil 4-13: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 24 Saat Kontrol Grubu BrdU İmmünohistokimyası.	43
Şekil 4-14: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 24 Saat Karboplatin Grubu BrdU İmmünohistokimyası.	43
Şekil 4-15: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 24 Saat Lityum Klorür Grubu BrdU İmmünohistokimyası.	44
Şekil 4-16: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 24 Saat Kombinasyon Grubu BrdU İmmünohistokimyası.	44
Şekil 4-17: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 72 Saat Kontrol Grubu BrdU İmmünohistokimyası.	45
Şekil 4-18: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 72 Saat Karboplatin Grubu BrdU İmmünohistokimyası.	45
Şekil 4-19: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 72 Saat Lityum Klorür Grubu BrdU İmmünohistokimyası.	46

Şekil 4-20: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 72 Saat Kombinasyon Grubu BrdU İmmünohistokimyası.	46
--	----

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

APC: Adenomatöz polipoz koli

BrdU: Bromodeoksiüridin

BrdU-LI: Bromodeoksiüridin-labeling indeks

cAMP: Siklik adenozin monofostat

Car: Karboplatin

CMF-PBS: Kalsiyum-magnezyumdan arındırılmış fosfat tamponu

DAG: Diaçilgliserol

DNA: Deoksiribonükleik asit

Dvl: Dishevelled

Elisa: Eliza(Enzyme-linked immunosorbent assay)

FBS: Fötal sığır serumu

FCM: Akım sitometri

Fz: Frizzled

GSK 3 β : Glikoljen Sentez Kinaz 3 β

HIF1: Hipoksi oluşturan faktör 1

ID₅₀: İnhibisyon dozu 50

IP₃: İnositol 1,4,5-trifosfat

IPP: İnositol polifosfat 1-fosfataz

LiCl: Lityum klorür

LRP: Lipoprotein reseptör ilişkili protein

LRP: Lipoprotein reseptör ilişkili protein

NF- κ B: Nükleer faktör- κ B

PBS: Fosfat tamponu

PI: Propidyum iodid

PI3K: Fosfatidilinositol 3 Kinaz

PKC: Protein kinaz C

PTEN: Fosfataz ve Tensin Homologu

Tcf3-Lef:T hücre faktörü-lenfoid çoğaltıcı faktörü

TEM: Geçirimli elektron mikroskobu

TNF: Tümör Nekrosis Faktör

TNFR: Tümör Nekrosis Faktör Reseptör

UV: Ultraviyole

Wnt: Kanatsız

ÖZET

Şenyürek M. (2011). Ishikawa Endometrium Epiteli Devamlı Hücre Kültürlerinde Lityum klorür'ün Karboplatin Sitotoksitesi Üzerine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji AD. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Çalışmamızda, DNA hasarı yapan Karboplatin ve duygu durum düzenleyici Lityum klorür'ün ayrı ayrı ve bir arada kullanıldıklarında İnsan Ishikawa Endometrium Epiteli hücre soyu üzerine etkileri iki ve üç boyutlu hücre kültürü modelleri kullanılarak incelendi. Kültürde iki ilacın etkileri 24, 48 ve 72. Saatlerde hücre çoğalması, hücre sitotoksitesi, hücre siklusu sentez fazı, programlı hücre ölümü açısından değerlendirildi.

Karboplatin, ikiboyutlu kültürlerde hücre çoğalmasında azalma, programlı hücre ölümünü artış ve hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde azalma meydana getirdi.

Lityum klorür, iki ve üç boyutlu kültürlerde hücre çoğalmasında azalma, programlı hücre ölümünü artış ve hücre siklusu sentez fazı işaretlenmesinde azalma meydana getirdi.

İlaçların kombinasyon şeklinde uygulamalarında ise tek tek uygulamalara göre elde edilen bulgulardan daha etkin bulgular saptandı.

Sonuç olarak; Karboplatin ve Lityum klorür'ün tek tek ve kombinasyonlarının Ishikawa Endometrium Epiteli hücreleri üzerine etkileri iki ve üç boyutlu kültür modellerinde incelendiğinde, bu maddelerin hücre siklusunda, sentez fazındaki hücrelerin sayısını azalttığı, programlı hücre ölümüne yönlendirdiği ve hücre proliferasyonunu önlediği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler : Karboplatin, Lityum klorür, Hücre kültürü, Endometrium, Ishikawa.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 10021

ABSTRACT

Senyurek M. (2011). The effects of Lithium chloride on Carboplatin cytotoxicity in Ishikawa Endometrial Epithelium cell line. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Department. Master Thesis. İstanbul.

In this study, effects of Carboplatin as a DNA damaging agent, Lithium chloride as a mood stabilizing agent investigated single and combined applications in monolayer and spheroid models with Ishikawa human endometrial cell line. Drugs were evaluated in cell culture with respect to cell proliferation, cell cytotoxicity, synthesis phase of cell cycle and programmed cell death in 24., 48., 72.h.

Carboplatin reduced both cell proliferation and cell cycle synthesis phase in monolayer and spheroid cell cultures while it triggered programmed cell death in monolayer and spheroid cell cultures.

Lithium chloride reduced both cell proliferation and cell cycle synthesis phase in monolayer and spheroid cell cultures while it triggered programmed cell death in monolayer and spheroid cell cultures.

It is determined that combination of drugs has significant evidences rather than single usage of drugs.

As a result, the effects of Carboplatin and Lithium chloride were investigated in monolayer and spheroid Ishikawa human endometrial epithelium cell line as a decrease in cell number in cell cycle synthesis phase, prevention of cell proliferation and drugs trigger programmed cell death.

Key Words: : Carboplatin, Lithium chloride, Cell culture, Endometrium, Ishikawa

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 10021

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endometriyum kanseri kadın genital kanserleri arasında ilk sırada bulunmaktadır (1, 2). Endometriyal adenokarsinom; uterusun serviks bölgesinden gelişen endometriyozisten kaynaklanan bir tümör çeşididir(3). Ishikawa hücreleri; östrojen ve progesteron için steroid reseptörü içeren, tip I adenokarsinom hücreleri olup, insan endometriyum epitelinden köken alan ve günümüzde insan endometriyal kanserini en iyi karakterize eden hücrelerdir(4).

Karboplatin (cis-diamin-1,1-siklobütan dikarboksilat platinyumII, CAR,); akciğer kanseri, ovaryum kanseri, endometrial karsinom gibi çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılan platinyum içeren ikinci nesil antineoplastik alkilleyici bir ajandır(5, 6, 7, 8).

Lityum klorür (LiCl) klinik olarak manik ve tekrarlayan depresyon tedavisinde son 60 yıldır kullanılan, duygudurum düzenleyici antipsikotik bir ilaçtır. Son yıllarda kanser tedavisine yönelik yapılan araştırmalarında kullanılmaktadır (9, 10, 11).

Karboplatin' in; çeşitli hücre soylarında DNA hasarına yol açarak, hücre büyümesini ve çoğalmasını durdurduğu çok sayıda çalışmada gösterilmiştir (8, 12). Lityum klorür, GSK 3- β (Glikojen Sentez Kinaz 3- β)'nın aktivitesini engelleyerek; Fosfotidilinositol döngüsünün ,beta katenin degradasyonunun ve adenilat siklazin inhibisyonuna neden olduğu ve Wnt sinyal yolağının negatif düzenleyicisi olduğu yapılan çalışmlarda gösterilmiştir (13, 14, 15, 16, 17).

Depresyon gibi psikiyatrik bozukluklar çeşitli tipte kanser hastalığına yakalanmış hastalıklarda yaygın görülen bir durumdur. Bu durum, tedavinin etkisiz olmasına yol açarken aynı zamanda hayat kalitesini değiştiren ve düşüren bir engel olarak ortaya çıkmaktadır. İyi huylu bir tümörün kontrol altında tutulması ve geriletilmesi ve/veya tamamiyle tedavi edilmesinde hastalık yanında kullanılan antikanser ajanlarda depresyon sebebi olarak gözükmemektedir. Tümör tedavisinde antineoplastik kemoterapik ajanların kullanılması yanında depresyon tedavisinde amaçlandığından kombine kemoterapi uygulamaları gerekmektedir.

Bu nedenle çalışmamızda Ishikawa Endometrium epiteli hücre kültürlerinde; depresyon tedavisinde kullanılan LiCl'nin tek başına antineoplastik sitotoksitesinin olup

olmadığını veya Karboplatinin tedavi amaçlı etkinliğini artırıp artırmadığını bu bağlamda elde edeceğimiz sonuçların, özellikle uterus fonksiyon bozukluklarına dolasıylada infertiliteye neden olan endometriyal tümör tedavilerine yönelik çalışmalara yeni uygulama, tedavi seçeneği kazandırabileceğini ve infertilite tedavisine katkısının olabileceğini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ishikawa Hücre Hattı

Ishikawa hücre hattı, 39 yaşındaki endometrium kanseri Asyalı bir kadından üretilmiştir. Üreme biyolojisi ve Moleküler biyoloji gibi birçok araştırma alanında ve çok sayıda enstitüde kullanılmaktadır (18). Östrojen ve progesteron için steroid reseptörü içeren, tip I adenokarsinom hücreleri olup, insan endometrium epitelinden köken almaktadır ve günümüzde insan endometrium kanserini en iyi karakterize eden hücrelerdir(4).

Ishikawa hücre hattı, implantasyon biyolojisi çalışmak amacıyla tercih edilen bir hücre soyudur ve normal endometriyumdaki aynı enzimler ve yapısal proteinler içermektedir (19).

2.2. Endometrium

Uterus duvarı histolojik olarak üç tabakadan oluşur: iç yüzeyi döseyen endometrium, kalın düz kas tabakasından oluşan orta tabaka miyometriyum, en dış tabaka ise perimetriyumdur. Endometrium işlevsel olarak iki tabakadan oluşur bunlar; Menstrasyon evresinde dökülen üst 2/3'lük fonksiyonel (fonksiyonalis) tabaka ile menstrasyon sırasında dökülmeyen ve endometriyal siklus sonunda proliferasyon olarak fonksiyonel tabakanın yenilenmesini sağlayan alt 1/3'lük bazal (bazalis) tabakadır (20).

2.3. Endometrium Kanseri

Günümüzde Endometrium kanserleri kadın genital kanserleri arasında ilk sırada bulunmaktadır (1). Endometrium kanseri; uterusun serviks bölgesinden gelişen endometriyozisden kaynaklanan bir tümör çeşididir ve en yaygın görülen jinekolojik tümörlerden biridir (3). Endometriyal adenokarsinomun 2 histolojik tipi vardır. Bunlardan tip I endometrioid karsinoma, tip II ise papiller seröz karsinoma olarak adlandırılmaktadır. Tip I karsinoma, % 70-80 oranında görülür, östrojen reseptörü ve progesteron reseptörüne sahip olup östrojene duyarlıdır ve iyi huylu bir tümördür. Ayrıca tip I adenokarsinom hücrelerinde meydana gelen β -catenin genindeki mutasyon sonucu uterusdaki fonksiyon bozukluklarından dolayı infertilite oluşmaktadır. Tip II karsinoma ise genellikle %20 oranında görülür, hormonal, radyoterapik ve kemoterapik

tedavilere yanıt vermemesiyle tanınmaktadır. Ayrıca östrojene pozitif olmadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (21, 22).

Klinik olarak Endometrium kanseri, invazyon ve metastaz yeteneğine göre 4 sınıfa ayrılır. FIGO(International federation of gynecology and obstetrics) sınıflandırma sistemine göre; Grade1, tümör uterin body ile sınırlıdır Grade2, tümör uterin serviksine genişlemektedir. Her iki aşamada da tümör az invazyon yeteneğindedir ve tedaviye olumlu cevap vermektedir. Grade3'te bölgesel tümör yayılmıştır ve grade4'te tümör metastatik özellik kazanmıştır. 3. ve 4. Grade'de tümör invaziftir. Yapılan çalışmalarda Endometriyal kanserli hastaların yaklaşık %72'si grade1, %12'si grade2, %13'ü grade3, %3'ü grade4'te olduğu gösterilmiştir Endometriyal kanserli hastaların hayatta kalım oranları; grade1'de %80-90, grade2'de %70-80, grade3'te %40-60, grade4'te %20 olarak gösterilmektedir (21).

Endometrium Kanserin Risk Faktörleri

Endometrium kanserinin tanımlanan risk faktörlerin çoğu, karşılanmamış östrojenin fazlalığı ile oluşmaktadır. Hastalığa ait arttırıcı ve azaltıcı risk faktörleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (23).

Tablo 2-1: Endometrium Kanseri Risk Faktörleri.

Artıran faktörler	Azaltan faktörler
Erken yaşta menars	Kombine oral kontraseptifler
Geç menopoz yaşı	Yagdan fakir diyet
Nulliparite	Egzersiz
Polikistik over sendromu	Artmış parite
Hormon replasman tedavisi	Diyette yüksek protein, fiber ve sebze alımı
Tamoksifen	Vitamin C, folat, karoten alımı
Obezite	Sigara kullanımı
Hipertansiyon	
Diyabet	
Yüksek sosyoekonomik düzey	
Artrit	

İnfertilite	
-------------	--

(Purdie DM,ve Green AC. 2001)

Endometrium Kanserindeki Tedavi Edici Moleküler Belirteçler

1-) Apoptotik (Hücre Ölüm) Sinyal Yolu

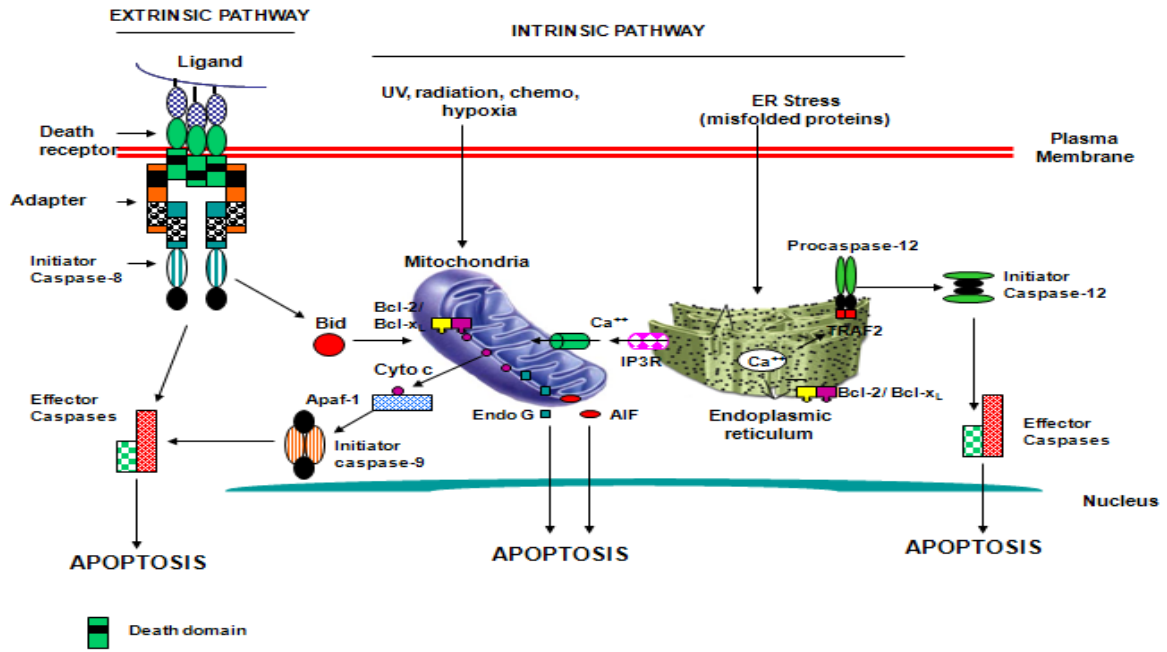
Apoptoz 2 ana yolak boyunca meydana gelir. Bunlardan birincisi dış kaynaklı (extrinsic) yada ölüm reseptör yolağı, ikincisi ise iç kaynaklı (intrinsic) yada mitokondrial yolağıdır.

Dış kaynaklı (extrinsic) ölüm reseptör sinyal yolu; Tümör Nekrosis Faktör(TNF) ailesi ve Reseptör Ligandları(TNFR) protein ailesi tarafından aktive edilir. Bunlar; FasL bağlı Fas,TNFR bağlı TNFRI, Apo3 ligand bağlı DR3 ve TRAIL bağlı DR4ve DR5'dir (24).

Fas aracılı apoptosis ile yapılan çalışmalar sonucunda Endometrium kanserinin gelişiminde bozukluğa yol açtığı gösterilmiştir (25, 26).

İç kaynaklı (intrinsic) mitokondrial yolak; Genellikle intrasellüler stres sinyalleri (DNA hasarı, yüksek oranda reaktif oksijen) ve ekstrasellüler apoptotik uyarıcıların(gama-radyasyon, kemoterapik ilaçlar,sitokinlerin ortadan kaldırılması, viral enfeksiyonlar) aktivasyonu sonucu oluşur (27) (Şekil 2-1).

İç kaynaklı apoptotik yolak Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir ve mitokondriden sitokrom-c salınımı ile düzenlenir (28).



Şekil 2-1: Programlı Hücre Ölümünün Moleküler Mekanizması.

(Gupta S ve ark, 2006).

P53 Tümör Süpressör Yolağı

Tümör baskılayıcı protein p53; DNA hasarı, onkogenler, anormal büyüme faktörü sinyalleri, u.v., radyasyon, hipoksi veya kemoterapik ilaçlar tarafından oluşan çeşitli stres sinyallerine karşı hücrel direnç oluşturur(30). Yapılan çalışmalar sonucunda P53'ün hücre devri sürecinde rol aldığı saptanmıştır(31, 32). Ovaryum kanserinin %30-80 ve endometrium kanserinin %10-20 oranında P53 geni stimülasyonunun inaktivasyonu sonucunda olduğu saptanmıştır (33, 34)

2-) Hücre Hayatta Kalım Sinyal Yolları

Fosfatidilinositol 3 Kinaz /AKT Sinyal Yolu;

Fosfatidilinositol 3 Kinaz (PI3K)/AKT Hücrede; hayatta kalımın kontrolü, proliferasyon, ve büyüme için anahtar rol oynayan önemli bir yoldur. PI3K/AKT yolağı; çeşitli dizi psikolojik etkenler, Büyüme Faktörü Reseptörü içeren sinyaller, İnterlökinler ve stress tarafından aktive edilebilir(35).

PI3K' in rolü $PI(4,5)P_2$ ' nin 3'-OH pozisyonundaki inozitol halkasını fosforilleyerek, sağ kalım sinyalleri ve insülin etkisi için gerekli ikincil mesajcı olan $PI(3,4,5)P$ ' ı oluşturmaktır. Uyarılmamış koşullarda PIP_3 seviyesi insanda çok zor belirlenebilecek kadar azdır. (36, 37)

Akt; hücresel sağ kalımı, p21,p27 gibi CDK inhibitörlerini fosforilleyerek hücre döngüsünü, GSK-3 β 'yı fosforilleyerek hücre metabolizmasını, transkripsiyon faktörlerini fosforilleyerek gen transkripsiyonunu etkiler. Aktive olmuş Akt hücre proliferasyonu ile ilgili glikojen sentez kinaz (GSK-3), glukoz taşıyıcıları (GLUT4), siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, P21/waf1/Cip1, P27/Kip1, rapamisin memeli hedefi (mTOR) ve TSC2 gibi birçok substratı modüle eder. (38)

Aktif PI3K'in önemli fonksiyonlarından biride apoptozu inhibe etmesidir. PI3K bağımlı hücre sağ kalımını yönlendirmek için Akt iyi bir adaydır. Akt farklı hücre ölümüne giden senaryolarda (oksidatif ve ozmotik stres, radyasyon, iskemik şok, kemoterapötik ilaçlar) anti apoptotik faktör olarak yer alır.

Akt, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını kontrol eden Bad gibi öncül apoptotik proteinleri fosforilleyip aktivasyonlarını bozarak, apoptoz karşıtı mekanizmayı yönlendirir (36, 39).

Endometrium kanserinin gelişimine bazı genlerin katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Özellikle mutasyona uğramış PTEN geni yapılan çalışmalarda ön plana çıkmaktadır. Mutasyona uğramış PTEN geni endometrial tümörögenезin erken fazıyla ilişkilidir ve ekspresyonunun azaltılmasının kanserin farklılaşmasını azaltabileceği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (40, 41).

PI3K-Akt yolağında, PI3K'nın spesifik olarak inhibe edilmesi PTEN gen aktivasyonunun düzenlenmesi bakımından tedavi amaçlı yeni model olarak önemsenmektedir.

2.4. Hücre Ve Doku Kültürü Hakkında Genel Bilgiler

2.4.1. Hücre Kültürü

Günümüzde yapılan araştırma çalışmalarının önemli bir bölümü hücre kültürlerinde gerçekleştirilmektedir. Çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkileri yanısıra, bir hücre ya da dokuda üretilen belirli bir maddenin işlevlerini

belirlemek amacıyla belirli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde kullanılarak canlı ortamında (in vivo) yapılması olanaksız veya zor olan çalışmaları gerçekleştirmek mümkündür.

Doku veya hücre kültürü genel bir tanımlama ile hayvan veya bitkilerden hücrelerin, dokuların veya organların çıkartılıp yaşamaları ve çoğalmaları için suni bir ortama konulması ve üretilmesidir. Bu suni ortam kabaca uygun bir cam veya plastik kültür kabı ile hücrelerin yaşamı için gerekli besinleri içeren bir sıvıdan oluşur. Tüm bir organın veya organın bir parçasının kültürünün yapılmasına organ kültürleri adı verilirken, hücrelerin organ veya dokulardan ayrıştırılarak ekilmesiyle yapılan kültürlere de hücre kültürleri adı verilir.

Hücre kültürü, hücre biyolojisi ve moleküler biyolojinin kullandığı başlıca metodlardan biridir ve oldukça geniş alanlarda kullanılmaktadır. Temel hücre fizyolojisi, hastalık ve hücreler arasındaki ilişkiler, ilaçların hücreler üzerindeki etkileri ve yaşlanma gibi model sistemlerde kullanıldıkları gibi; toksisite testlerinde, kanser araştırmalarında, aşıların geliştirilmesi ve üretiminde, biyolojik temelli ilaçların elde edilmesinde (insülin ve hormonların üretilmesi) kullanılmaktadır (42).

2.4.2. Hücre Kültürü Çeşitleri

Hücre kültürleri temel olarak iki gruba ayrılabilir bunlar; primer hücre kültürleri ve sürekli(devamlı) hücre serileridir. Primer kültürler, hücreler veya dokuların mekanik ve/veya enzimatik yollarla organ ve dokulardan ayrılarak kültür ortamına konulmasıyla yapılır. Böylece, elde edilen hücreler asıl kökenlerinin özelliklerini yansıtmayı sürdürürler. Primer kültürler eksplant kültürleri ve izole hücre kültürleri olarak iki gruba ayrılabilir. Eksplant kültürlerinde bir parça doku alınıp kültüre konur ve sonrasında bu dokulardan hücreler çıkarak çoğalmaya başlar. İzole hücre kültürlerinde ise hücreler kültüre konulmadan önce bulunduğu yapılardan mekanik ve/veya enzimatik yollarla ayrıştırılır ve bu izole hücreler şekilde kültüre ekilir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler buradan alınıp başka kültürlere ekilebilir ve çoğaltılabilir. Bu şekilde elde edilen kültürlere ‘sekonder hücre kültürleri’ denir ve bir seri kültür işlemlerinden sonra ‘sürekli hücre serileri’ elde edilir. Sürekli hücre serileri genellikle anormal kanser hücreleri (örn. HeLa) ya da transformasyona uğratılmış hücre serileri olup köken aldıkları hücrelerle pek çok açıdan farklılıklar gösterirler. Bu kültürler hücre siklusunun

kontrolü gibi çalışmalardan büyük miktarlarda aşılardan ve rekombinant DNA'ların üretilmesine kadar farklı alanlarda kullanılmaktadırlar. Bu kültürlerin önemli bir avantajı dimetilsülfoksit veya gliserol gibi uygun kriyoprotektif ajanlarla dondurulabilir ve uzun süre saklanabilir olmalarıdır. Buna karşılık primer kültürlerin önemli bir üstünlüğü in vivo ortamdan daha kısa süre önce uzaklaştırılmış olmaları nedeniyle hücrelerin doğal yapı ve fonksiyonlarını daha iyi koruyabilmeleridir. Ancak bu kültürlerin hazırlanmasındaki en büyük dezavantaj hücrelerin ayrıştırılmaları sırasında hasara uğramaları ve kültürdeki ortamın in vivo ortamdan farklı olmasıdır (42).

Günümüzde kültürlerin büyük kısmı dokudan ayrıştırılmış hücre süspansiyonları şeklinde yapılmaktadır. Kan hücreleri ve transformasyona uğramış hücreler (tümör hücreleri gibi) çoğalabilmek için bir yüzeye ihtiyaç duymazlar ve süspansiyon şeklinde kültürleri yapılır. Ancak çoğu doku hücreleri süspansiyon ortamında yaşamaya uyumlu olmayıp bölünmek ve çoğalmak için katı bir yüzeye gereksinim duyarlar. Hücre kültürleri için bu gereksinim plastik veya cam doku kültür kaplarının yüzeyi ile karşılanır. Kandan türemiş hücre serileri (lösemi ve lenfoma hücre serileri gibi) süspansiyon besiyerlerinde üremeye eğilimliken; akciğer, böbrek, beyin gibi katı dokulardan elde edilmiş hücreler bir yüzeye tutunarak tabaka şeklinde üreme eğilimindedirler. Hücrelerin türlerine göre gereksinimleri farklılıklar göstermekle birlikte çoğu hücre, kültür kapları kollajen ya da laminin gibi özel ekstrasellüler matriks yapılarıyla kaplanmazsa tutunamaz, çoğalamaz ve farklılaşamazlar (42).

2.4.3. Hücre Kültürü Yapımının Temel Aşamaları

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli temel araç-gereçler şunlardır: laminar akımlı kabin, karbon dioksit (CO_2) ayarlı inkübatör, invert mikroskop, hücrelerin tutunma ve hareketlerine olanak sağlayacak toksik olmayan ve optik olarak saydam, tek kullanımlık steril plastik veya cam kaplardır. Laminar akımlı kabinler partikül filtresine sahiptirler. Bu kabinler dikey ya da yatay olabilirler, dikey olanlarında süzülen hava kabinin üstünden çıkarken yatay olanlarında kullanıcı bölgesinden yatay olarak dışarı üflenmektedir. Kabinlerin kullanım öncesi UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla sterilizasyonu sağlanmalıdır. Kullanılan kültür vasatının pH'sının nötral tutulabilmesi için hücreler yaklaşık olarak % 5 CO_2 'li ortamda tutulurlar. Hücreleri gözlemek için de invert mikroskoplar kullanılır.

Hücre kültürü yönteminin temel aşamaları şunlardır; 1. Dokunun vücut dışına çıkartılması, 2. Dokunun parçalanarak hücrelerin elde edilmesi, 3. Hücrelerin kültür kaplarına ekilmesi, 4. Uygun besi ortamında ve çevre şartlarında inkübasyonudur (42).

Yapılan kültürün amacına bağlı olarak hücreleri ekmek için farklı tipte ve büyüklükte kültür kapları kullanılabilir. Kültür yapımının amacı çok sayıda hücre elde etmek ise 75 cm²'lik kaplar veya şişeler kullanılabilir. Hücrelerin çoğalması arzu edilmeyip kültürde gelişimleri takip etmek için 25cm²'lik kültür kapları kullanılabilir. İmmunohistokimya, fotoğraflama veya elektron mikroskopi amacıyla kullanılacaklarsa cam tabanlı kaplar veya lameller kullanılabilir. Kullanılacak kültür kapları hücrelerin yapışmalarını kolaylaştırmak için genellikle protein yapısında bazı maddelerle kaplanır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları fibronektin, laminin ve kollajendir. Bazı kültürlerde bu iş için kültür kapları bir tabaka halinde hücre ile kaplanır, sonra bunun üzerine esas kültürü yapılacak olan hücreler ekilir (örneğin glia hücre tabakası üzerine nöronların ekilmesi) (42).

Ekilen hücrelerin kültür ortamında yaşamlarını devam ettirmelerinde en önemli ve en karmaşık faktörlerden biri kültür vasatıdır. Kültür vasatındaki besin maddelerinin yanında sıcaklık, nem, pH, osmolarite, oksijen ve karbondioksit konsantrasyonları, büyüme faktörleri gibi koşullar da önemlidir. Sıcaklık genellikle hücrenin alındığı ortamdaki sıcaklığa yakın bir değerdir. Soğukkanlı hayvanlardan alınan hücreler 18-25 °C'de inkübe edilirken memeli hayvanlardan alınan hücreler genellikle 36-37 °C'de inkübe edilirler. Kültürdeki besin maddelerini temel olarak; aminoasitler, vitaminler, mineraller ve karbonhidratlar oluşturur. Bunlar hücrelerin büyüme ve fonksiyonları için gerekli protein ve diğer yapısal elemanların yapımında ve metabolizmanın devam ettirilebilmesi için gerekli enerjinin sağlanmasında kullanılırlar. Büyüme faktörleri ve hormonlar hücrelerin büyüme hızlarını ve işlevsel özelliklerini belirlerler ve genellikle kültür vasatına farklı hayvanlardan veya insanlardan elde edilmiş olan %5-20'lik serum olarak katılırlar. Kültür vasatları hazır sıvılar şeklinde satın alınabileceği gibi kuru toz maddeler halinde alınıp laboratuvarlarda hazırlanabilir. Hazır vasatların ömrü genellikle kısa olmaktadır. Bu yüzden genellikle vasat içerikleri ayrı ayrı hazır satın alınıp, kullanılacakları zaman kültür vasatı laboratuvarında hazırlanabilir. Kültür vasatlarının kültürdeki hücreleri pH değişikliklerine karşı koruyan tampon özellikleri de vardır. Hücre içi ve dışı pH, hücrelerde iyon dengesinin sağlanmasının yanında hücre enzimlerinin optimal fonksiyon yapmaları ve hormon ve büyüme faktörlerinin

reseptörlerine bağlanmasını için de önemlidir. pH'da oluşacak kısa süreli değişiklikler bile hücrelerin apoptoz ile ölümlerine yol açabilir. Ortam pH'sını hücre tipine göre 7.0-7.4 arasında tutmak için genellikle korbondioksit-bikarbonat tabanlı tamponlar veya HEPES gibi organik tamponlar kullanılır. Korbondioksit-bikarbonat tabanlı tamponların kullanıldığı durumlarda vasat içerisinde çözünen korbondioksiti ayarlamak için korbondioksit kontrollü inkibatörlere ihtiyaç vardır. Bu etüvlerde genellikle %5 CO₂ - %95 hava gaz karışımı hava kullanılarak istenilen pH ve oksijen basıncı elde edilebilmektedir (42).

Kültürlerde ekim yapılmadan önce genellikle hücre sayısı, yoğunluğu, ölü-canlı oranları belirlenir. Toplam ve canlı hücre sayısını belirlemek için hemositometre kullanılmaktadır. Bu işlemde örnek alınıp sulandırıldıktan sonra hemositometre lamında hücreler sayılarak milimetreküpteki hücre sayısı hesaplanır. Canlı hücreleri belirleme yöntemleri bazı boyalarla ölü hücrelerin boyanırken canlı hücrelerin boyanmaması temeline dayanır. Böylece ölü ve canlı hücrelerin oranı bulunur. Tripan mavisi canlı hücreleri belirlemek için yararlanılan bu boyalardan biridir. Membran bütünlüğü korunmuş canlı hücreler boyayı almazlar. Ölü-canlı hücrelerin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri de ölü hücre membranlarından geçerek çekirdeği boyayan ve florasan bir madde olan propidium iyodürdür (42).

2.4.4. Sferoid

Multiselüler tümör sferoid (MTS) modeli laboratuvar koşullarında tümörlerin üç boyutlu yapısını yansıtır. Tek tabakalı kültürde büyütülen hücrelerin kemoterapiye karşı oluşturdukları yanıt ile klinik gözlemler arasında birçok farklılık olduğu, tek tabakalı kültürde çok etkili bulunan ve belirgin antitümoral etkinliği saptanan bir ilacın ya da ilaç kombinasyonlarının klinikte bu derece etkili olmadığı saptanmıştır (43). Üç boyutlu hücre kültürlerinin (sferoid) in vivo katı tümörlerin özelliklerini tam olarak yansıttığı düşünülmektedir (44).

Ovaryum tümör Üç boyutlu sferoid modeliyle yapılan bir çalışmada, üç boyutlu tümör sferoid modelin oluşmasında ve ekstrasellüler matriks proteinleriyle etkileşiminde hücre adhezyon moleküllerinden olan β 1-İntegrin'in düzenleyici rol oynadığı gösterilmiştir.(45)

2.4.5. İmmünohistokimya

İmmünohistokimya, işaretlenmiş antikorlar kullanılarak hücre ve dokuda antijenlerin bulunduğu yerlerin gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntem antijene karşı spesifik olarak antikor oluşması ve antijen ile antikorun birleşmesine dayanır. Bu özel bağlantıdan dokuda yer alan antijenlerin, bunlara özel antikorlar üretilmesi ile immünohistokimyasal yöntemler geliştirilmiştir.

Organizmaya yabancı olan ve kendisine karşı bir bağışık cevap oluşturan maddeye antijen veya immünojen denir. Bir antijen doku üzerindeki protein, karbonhidrat veya lipid molekülü olabilir. Bir veya daha fazla antikor bağlayıcı bölge içerir.

Antikor immunoglobulin olarak bilinen serum proteinidir. Humoral immün sistemde B lenfositlerinin farklılaşması ile oluşan plazma hücrelerinden salgılanan immunoglobulinler IgG, IgA, IgM, IgE ve IgD olmak üzere 5 tiptir. En sık kullanılan tip IgG'dir. Bu farklılık ağır zincirlerinin değişikliğinden kaynaklanır.

Antikorlar poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki tiptir. Poliklonal antikorlar bir hayvanın ilgili protein molekülü ile immunize edilmesi sonucu oluşan antikorlardır. Antijenik uyarımla beraber farklılaşan plazma hücre klonlarının oluşturduğu farklı özellikteki antikorların tümüdür. Monoklonal antikorlarda ise geliştirilen hibridoma tekniği ile saf antikor üretilmesi amaçlanmış ve sağlanmıştır.

Antikorların işaretlenmesinde 4 yöntem;

a) Floresan bileşikle işaretleme:

Dondurulmuş doku kesitleri, yaymalar ve hücre kültürlerinde tercih edilir. Sekonder antikor uygulaması ve sonraki işlemler karanlıkta yapılır ve İmmünofloresan mikroskopla değerlendirilir. Diğerlerinden üstün tarafı sadece işaretlenen moleküller görünmesi diğer kısımların karanlıkta kalmasıdır.

b) Enzimle işaretleme:

- Peroksidaz
- Alkalen fosfataz
- Glukoz oksidaz

c) Elektron yoğun bileşikle işaretleme:

- Altın Partikülü
- Ferritin

d) Biotinle işaretleme:

Avidin'in biyotin'e çok yüksek affinitesinden yararlanılır. Streptavidin peroksidaz en sık kullanılır.

İmmunoflüoresan işaretleme gerek ışık gerekse elektron mikroskopide doğrudan (tek aşamalı) veya dolaylı (iki aşamalı) olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.

Tek aşamalı yöntemde; antikor, flöresan boya veya enzim ve altın tanecikleri gibi diğer işaretleyiciler ile işaretlenmiş olarak bulunur ve doğrudan kesitler üzerine uygulanır. İki aşamalı yöntemde öncelikle antijene özel birincil antikor kesit üzerine uygulanır. Böylece 1. aşamada, işaretli primer antikor antijene bağlanır. Daha sonra oluşan antijen-antikor kompleksinin görünür hale gelebilmesi için işaretlenmiş ikinci antikor uygulanır. İşaretleyici olarak biotin, hidrojen peroksidaz, alkalin fosfataz, glukoz oksidaz ve flöresan işaretleyiciler kullanılabilir.

2.4.6. BrdU

5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU); bölünen hücrelerde timidin bazının üridin ile yer değiştirmesine dayalı olarak bölünen hücrelerle bölünmeyen hücreleri ayıran bir proliferasyon değerlendirme yöntemidir. DNA sentezini tayin etmek için timidin ile işaretleme protokolüne eşdeğerdir. S fazındaki hücrelerin oranı belirlenir. Anti- BrdU monoklonal antikorları ile boyanarak sayım yapılabilir veya ELİSA yöntemi ile ölçülebilir.

2.5. Projede Kullanılan İlaçlar

2.5.1. Karboplatin (Carboplatin)

Karboplatin(cis-diamin-1,1-siklobütan dikarboksilat platinyumII); çeşitli tümörlerin (akciğer kanseri, ovaryum kanseri, endometrial karsinom) tedavisinde kullanılan platinyum içeren ikinci nesil antineoplastik alkilleyici bir ajandır (5, 6, 7, 8).

Karboplatinin in vitro etkileri akciğer kanseri, endometrial karsinom, ovaryum kanseri gibi çeşitli hücre soylarıyla yapılan çalışmalarla tartışılmaktadır. Karboplatinin, içeriğindeki platinyum tümör hücrelerinde kromatin içerisindeki DNA ya bağlanarak DNA' nın nükleozom yapısının yeniden düzenlenmesine neden olur.

Başlangıçta platinyum nükleozom yapısına uyum sağlamış gibi davranışta bu durum DNA hasarına yol açarak tümör hücrelerinin bölünmesini, büyümesini ve çoğalmasını engellediği gösterilmiştir. Ve böylece tümör hücrelerinin vücuttaki gelişimlerini ve yayılmasını yavaşlatmaktadır (8, 12).

2.5.2. Lityum Klorür

Lityum klorür, Lityum, (LiCl) klinik olarak manik ve tekrarlayan depresyon tedavisinde duygudurum düzenleyici olarak son 60 yıldır kullanılan, Antipsikotik bir ilaçtır (9).

Lityum duygudurum bozuklukları üzerine terapötik etkisini magnezyum bağımlı enzimler inositol monofosfat fosfatazın ve adenilat siklazın aktivitelerini engellemek yolu ile kısmen gösterir. İnositol monofosfat fosfataz, fosfoinositid sinyal yolunda geri dönüşümlü olarak kullanılan önemli bir enzimdir. Bu ikinci haberci sisteminin çeşitli reseptörler tarafından aktive edilmesi sonucunda inositol 1,4,5-trifosfat (IP_3) ve diasilgliserol (DAG) olmak üzere iki tane ikinci haberci oluşur. IP_3 geri dönüşümlü, ardışık olarak fosfat grubunu kaybederek fosfoinositid sinyal yolunun başlangıç maddesini oluşturan inositol diğer adıyla miyo-inositol oluşturur.

IP_3 'den miyo-inositol oluşturmak amacıyla son fosfat grubunu ayıran enzim lityumun tarafından aktivitesi engellenen inositol monofosfat fosfataz enzimidir. Lityumun bu enzimin aktivitesini engellemesi inositolun fosfoinositid siklusundaki dönüşümlü kullanımını bozarak inositolün/miyositolün eksikliğine ve ona bağlı olarak da fosfoinositid sinyal yolunun başlangıç materyali olan fosfotidilinositol-4,5-bifosfat (PIP_2) oluşamamasına ve ikinci habercilerin eksikliğine (DAG, IP_3) yol açar. Ayrıca lityum inositol monofosfat fosfataz enziminin önce inositol fosfatların serbest inositola dönüştürülmesinde rol oynayan inositol polifosfat 1-fosfataz (IPP) enziminin aktivitesini de engeller. Bu durum inositol monofosfat düzeylerini artırırken, serbest inositol düzeylerinde bir azalma meydana getirir. Bu yüzden, lityumun beyinde yarattığı biyokimyasal etki, beyinde serbestmiyo-inositol düzeylerinin azalmasına ve fosfoinositid döngüsünün etkinliğini kaybetmesine, bunun sonucunda da reseptör uyarısına yanıt olarak salgılanan nörotransmitter düzeylerinin düşmesine bağlanmıştır (46) (Şekil 2-2).

Yapılan çalışmalar sonucunda lityumun terapötik etkisinin tek başına inositol azalmasına bağlanamayacağı sonucu çıkarılmıştır (46), Lityumun inositol azalması

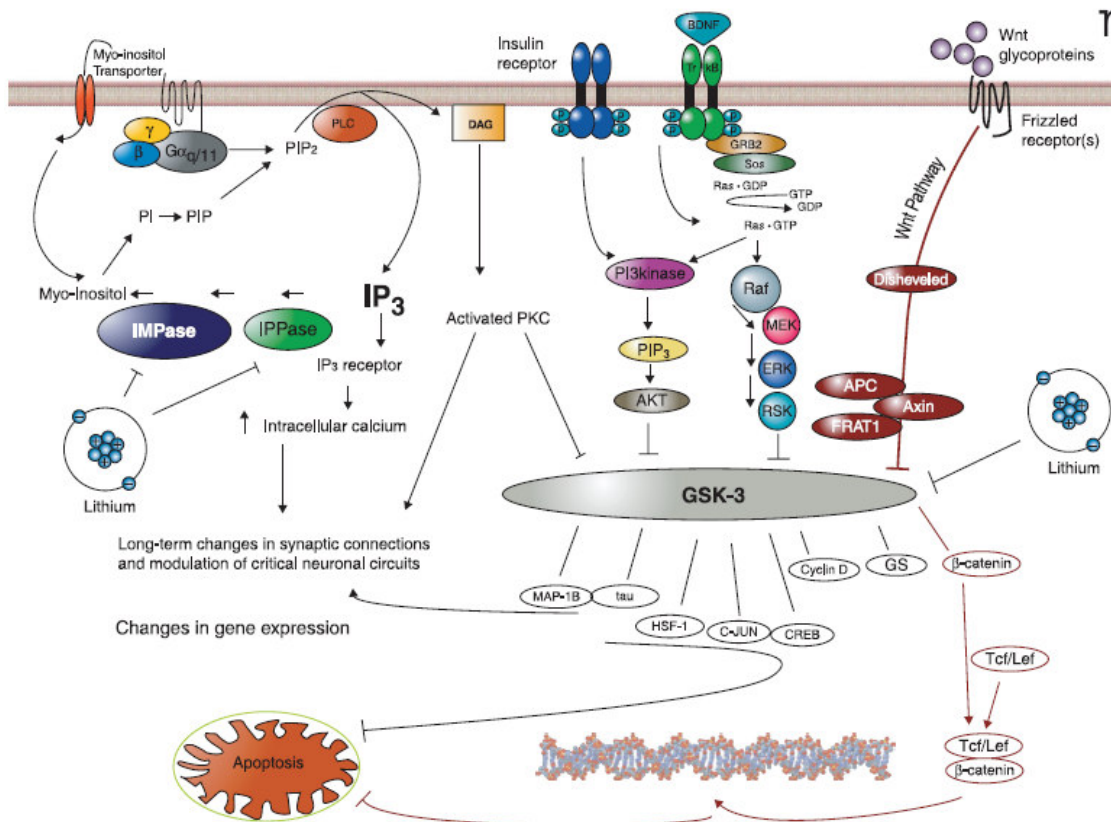
üzerinden fosfoinositid döngüsünün önemli alt sinyal mekanizması ana enzimini protein kinaz C (PKC)'nin aktivitesini engellediği saptanmıştır (46). Ayrıca lityumun duyudurum bozukluğunun tedavisinde fosfoinositid döngüsünden bağımsız olarak ATP'den siklik adenozin monofosfat (cAMP) oluşumunu kataliz eden adenilat siklaz enziminin aktivitesini engelleme yeteneğinin katkısı olduğu gösterilmiştir (16).

Lityumun duyudurum bozukluklarının tedavisi üzerine temel etkisinin glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3) aktivitesini engelleme yoluyla gerçekleştiği saptanmıştır. Lityumun hali hazırda araştırılmakta olan çeşitli kanser tiplerinin tedavisindeki yerini de yine büyük ölçüde GSK-3 enziminin etkinliğini engelleyerek kazandığı gösterilmiştir (13).

Glikojen sentaz kinaz-3 fosforilasyonda görevli yüksek derecede korunmuş bir serin/treonin kinazdır. Bu enzim, çok sayıda transkripsiyon faktörlerinin [β -katenin, c-Jun, c-myc, p53, hipoksi oluşturan faktör 1 (HIF1), nükleer faktör- κ B (NF- κ B), notch], yapısal proteinlerin yapılanmasını ve dengelenmesinde görev alan tau, APC, mikrotübül bağlantılı protein 1B ve mikrotübül bağlantılı protein 2 proteinleri], metabolizma ve sinyal iletiminde görev alan protein ve enzimlerin [piruvat dehidrojenaz, p21, siklin E, eIF-2B translasyon faktörü, nükleoporin, amiloid öncü proteini, ATP-sitrat liyaz] görevlerinin düzenlenmesinde önemli rol alır (Şekil 2-2).

GSK-3, uyarılmamış hücrelerde Wnt (Kanatsız; Wingless) sinyal yolunu β -kateninin serin ve tirozin aminoasidlerinin fosforilasyonunu gerçekleştirerek olumsuz yönde düzenler. Bu hücrelerde β -katenin GSK-3, aksin ve APC'den oluşan büyük protein topluluğuna bağlanır. Bunun sonucunda GSK-3 β -katenini fosforile eder, ve fosfatlanan β -katenin ubiquitin ligaz topluluğu tarafından tanınır. Ayrıca GSK-3 APC'yi de fosforile ederek, APC'nin β -katenini bağlanmasını artırır. Bundan sonra β -katenin poliubikitin bileşikleriyle bağlanır ve bu β -katenin bileşikleriyle hızlı şekilde 26S proteazomu tarafından yıkılırlar. Yıkılmış olan β -katenin ani gen hedeflerinin yazılmasını (transkripsiyonunu) uyarıcı protein topluluğunun üyesi T hücre faktörü-lenfoid çoğaltıcı faktörü (Tcf3-Lef) adlı DNA bağlayıcı proteinle etkileşemez. Bu da DNA'da hücre göçünde, tutunması, çoğalmasında ve hücre ölümünün engellenmesinde görevli MYC, aksin-2, metalloproteinaz-7, Siklin D1 gibi birçok genin yazılımının durmasına yol açar (13, 46) (Şekil 2-2).

Wnt'nin Lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) ve Frizzled (Fz) adlı reseptörlerine bağlanması ile oluşan sinyal ile hücre uyarıldığında β -katenin GSK-3, aksin ve APC'den oluşan büyük protein topluluğu bozularak β -katenin serbest kalır. β -katenin seviyeleri sitoplazmada artar ve orada çekirdeğe geçerek Tcf3-Lef'e bağlanır ve DNA'da hücre göçünde, tutunması, çoğalmasında ve hücre ölümünün engellenmesinde görevli genlere bağlanarak bunların yazılımını artırır. Lityumun, Wnt gibi etki ederek Wnt sinyal yolunda GSK-3'ün işlevini engellediği ve mediator görevi gördüğü saptanmıştır (46, 47) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: Lityum Klorür'ün Etki Mekanizması.

(Quiroz J A ve ark, 2004)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız *in vitro* koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda hücre ve doku kültürü laboratuvar imkanları, Işık ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak gerçekleştirildi. Hücre döngüsü ve programlı hücre ölümünün Akım Sitometrik (FCM; flow cytometry) analizle incelenmesi İ.Ü İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Immünoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Kullanılan Maddeler

3.1.1. Kimyasal Maddeler

NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, Absolü etanol, HCl, Metanol, Phenol Red, Poly-l-Lysine solution, KH₂PO₄, KCl, NaHCO₃

3.1.2. Enzimler

Trypsin (Gibco)

3.1.3. İlaçlar

Karboplatin

Lityum klorür

3.1.4. Kitler

BrdU

Ultra V block

NCL-BrdU Mouse Monoclonal

Ultra Vision Detection System Anti- Mouse HRP

Large Volume AEC Substrate System

Ultramount

3.1.5. Diğer Maddeler

Fötal Sığır Serum

RPMI-1640

3.2. Kullanılan Gereçler

- | | |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. Laminar Akım Hücre Kültür Kabini | (Tezsan) |
| 2. İnkübatör | (Sanyo) |
| 3. Ters (İnvert) mikroskop | (Leitz Wetzlar) |
| 4. Su banyosu | (Nüve) |
| 5. Santrifüj | (Sigma 2-16K) |
| 6. Derin dondurucu | (Arçelik) |
| 7. Buzdolabı | (Bosch) |
| 8. Manyetik karıştırıcı | (Rühromag) |
| 9. Pipetleme aracı | (Drummond) |
| 10. Derin dondurucu | (Arçelik) |
| 11. Buzdolabı | (Bosch) |
| 12. Hassas terazi | (Acculab) |

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Çözeltiler

CMF-PBS

8 gr NaCl

0.25 gr KCl

0.25 gr KH₂PO₄

1.44 gr Na₂HPO₄ tartılarak 1 lt bidistile su içine konarak karıştırıldı. Otoklavda 121 °C, 3 Atm basınçta 15 dk steril edildi.

NaHCO₃

8.8 gr NaHCO₃ tartılarak 200 ml bidistile su içerisine kondu ve karıştırıldı. Otoklavda 121°C, 3Atm basınçta 15 dk steril edildi.

TRİPSİN

3 gr tripsin 100 ml CMF-PBS içerisine kondu. Manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra milipor filtreden süzülerek steril edildi ve pH: 7,4'e ayarlandı.

AGAR

3 gr agar 100 ml bidistile su içerisine kondu ve karıştırıldı. Otoklavda 121 °C'de, 3Atm basınçta steril edildi.

3.3.2. İmmünohistokimya Kullarılan Çözeltiler

PBS

Hazır PBS tablet kullanıldı.

H₂O₂

1,5 ml H₂O₂; 98,5 ml metonole kondu. Solüsyon taze hazırlandı.

HCl

12,08 ml HCl; 87,92 ml distile suya kondu. Solüsyon taze hazırlandı.

NaOH

1 gr NaOH 100 ml distile suda çözündürüldü.

TRİPSİN

100 mg tripsin 100 ml distile suda çözündürüldü. İçerisine 4 ml %5 CaCl₂ kondu. NaOH ile pH: 7,8'e ayarlandı. Solüsyon taze hazırlandı.

3.4. Kullarılan Yöntemler

3.4.1. Hücre Kültürü

Çalışmamız in vitro koşullarda yapılmış deneysel bir çalışma olup, deneyler İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda hücre ve doku kültürü laboratuvar imkanları, Işık ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak gerçekleştirildi.

Araştırmada Amerikan Hücre Kültür Koleksiyonu (ATCC) hücre bankasından sağlanan Ishikawa hücre soyu kullanıldı.

Ishikawa endometrial adenokarsinoma hücreleri için besi ortamı, inaktive edilmiş %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 IU/ml penisilin ve streptomisin içeren RPMI-1640(Biological Industries) medyumunu kullanıldı.

Hücreler bu besi ortamı içeren 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda, iç ortamı %5 CO₂, %95 hava karışımı ve nem içeren ve 37 °C olan inkübatör (Sanyo) içinde tutularak ve haftada 3 kez rutin pasaj yapılarak üretildi.

Hücre pasajları laminar akım kabini (Tezsan), hücre kültürleri incelemeleri invert mikroskop (Leitz), cam malzeme sterilizasyonu otoklav, stokların -20 °C'de depolanması için derin dondurucu (Arçelik) kullanıldı.

3.4.2. Doz Belirleme Deneyi

Semi-konfluent Endometrium epiteli İshikawa tümör hücreleri haftada en az 2 kere pasaj yapılarak İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doku ve Hücre kültürü Laboratuvarında rutin olarak üretilmekte ve Deney dışı zamanlarda dondurulup saklanmaktadır.

Semi-konfluent kültürler kalsiyum-magnezyum içermeyen fosfat tamponunda hazırlanmış %0,3 (Gibco) tripsin ile tripsinize edilerek toplandı 1500 rpm'de 1-3 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj işlemi 3ml medyum ile tekrarlanarak tripsin etkisi ortadan kaldırıldı. Hücreler Taze harılanmış serumlu medyumda tek hücre süspansiyonu (single cell suspantion) haline getirildi

Hücreler hemositometrik sayma kamarasında sayılarak deney için yeterli hücre sayısının bulunup bulunmadığı saptandı.

Deneyler 6 kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirildi. Her kuyucuğa taze hazırlanmış ve %10 serum içeren 5'er ml RPMI-1640 medyumunu konuldu. Bu medyumun içerisine %100 canlı 5x10⁵ İshikawa hücresi ekildi. Kültür kapları hafifçe sallanarak hücrelerin kuyucuk yüzeyine homojen yayılmaları sağlandı.

Karboplatin ve LiCl'ün herbiri için final konsantrasyonu 1; 10; 100; 200 µM konsantrasyonlarını sağlayacak şekilde yoğun olarak hazırlanmış çözeltileri 100µl eşit hacimlerde içerisinde hücrelerin bulunduğu kuyucuklara verildi. Hücreler bütün deney maddeleriyle 24, 48 ve 72 saat sürelerle 37°C ve %5 CO₂ ortamında kültür inkübatöründe kültüre edildiler. Bu inkübasyon sürelerinin sonunda kuyucukların üst medyumları alınarak 3 dakika 1500 rpm'de santrifüj edildi ve ilaç etkileşimi sonucu

inkübasyon medyumuna çıkması mümkün olan hücreler üst medyumdan ayrıldı. Diğer taraftan kuyucuklardaki hücreler üzerine %0,3'lük tripsin solüsyonu eklenerek hücreler zeminden ve birbirlerinden ayrıştırılarak santrifüj edilip tripsin uzaklaştırıldı ve diğer hücrelerle aynı tüpte toplanan hücreler 2ml medyum ile tek hücre süspansiyonu haline getirildi.

Hücreler sayma kamerasında sayılarak toplam hücre sayıları kaydedildi. Her ilaç için etkin olan inhibisyon dozu 50 (ID_{50}) değeri belirlendi.

3.4.3. Proliferasyon (Tutunma) Deneyi

Deneylerde % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan 5×10^5 ishikawa hücresi bütün zaman aralıkları (24, 48 ve 72 saatler) için 5'er ml RPMI-1640 medyumunu içeren 3'er kuyucuğa ekildi ve inkübatör ortamında tutuldu. Bu aşamadan sonra, belirlenen ID_{50} değerleri kullanılarak ilaçlar tek tek ve kombinasyon grubu oluşturularak hücrelere uygulandı. Deney grupları şu şekilde belirlendi:

1. Kontrol
2. Karboplatin
3. Lityum Klorür
4. Karboplatin + Lityum Klorür

Hücreler ilaçların verilmesinden sonraki 24, 48 ve 72. Saatlerde tripsinizasyon ve santrifüj tekniğiyle toplatıp ve sayılarak toplam hücre sayıları saptandı ve kaydedildi.

Doz ve zaman grafikleri çizildi ve değerlendirildi.

3.4.4. İki Boyutlu Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretlenme İndeksi İmmünohistokimya Tekniği

24 kuyucuklu kültür kapları içerisine yerleştirilen 15 mm çaplı steril yuvarlak lamellerin üzerine 100ml taze hazırlanmış medium içerisinde %100 canlı 3×10^4 ishikawa hücresi ekildi. Hücrelerin lamel üzerine homojen steril bir Pasteur pipeti ile sağlandıktan sonar hücrelerin lamellere tutunması mikroskop ile gözlemlendikten sonra kuyucuklara 1'er ml RPMI-1640 medyumunu verilerek kültür kapları inkübatörde kültüre edildiler.

Hücre ekiminden 24 saat sonra iki boyutlu hücre kültürlerinde kullanıldığı gibi Karboplatin'in 200 μM , Lityum Klorür'ün 150 μM dozu her kuyucuğa 100 μl olacak şekilde uygulandı ve 24 saat süreyle 37 °C de %5'lik CO_2 hava karışımında, %95 nemli ortamda inkübe edildi.

İnkübasyon süresinin sonuncu saatinde her kuyucuğa daha önce hazırlanmış taze BrdU solüsyonundan 20 μM final konsantrasyonu sağlayacak şekilde 100'er μl verildi ve 1 saat süreyle 37 °C de %5'lik CO_2 hava karışımında, nemli ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda lameller PBS ile yıkandı ve her kuyucuğa % 70 etanol eklenip - 20°C 'de 1 saat bekletildi. % 70 etanol uygulamasının sonrasında sırasıyla şu protokol izlendi;

- Kuyucuklar PBS ile 30 dakika hidrate edildi,
- % 0.5' lik H_2O_2 ile karanlıkta 20 dakika süre ile bekletildi,
- PBS ile kısa süre yıkandı,
- 5 dakika distile suda bekletildi,
- 4 N HCl ile 37 °C de 30 dakika bekletildi,
- Distile suda kısa süre yıkandı,
- PBS ile 5' er dakika 2 kez bekletildi,
- Non spesifik blok solüsyonu ile 20 dakika bekletildi,
- Primer antikor ile 1 gece +4 °C de bekletildi,
- Distile suda kısa süre yıkandı,
- PBS ile 5'er dakika 2 kez yıkandı,
- Sekonder anikor ile 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi,
- Distile suda kısa süreli yıkandı,
- PBS ile 5'er dakika 2 kez yıkandı,
- Streptavidin Peroksidaz ile oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi,
- Distile suda kısa süreli yıkandı,
- Kromojen solüsyonu oda sıcaklığında, karanlıkta, 11 dakika uygulandı,

- Distile suda kısa süreli yıkandı,
- Mayer hematoksilen ile 7 dakika bekletildi,
- 3 kez çeşme suyu ile yıkandıktan sonra 15 dakika çeşme suyunda bekletildi,
- Distile su ile yıkanıp lameller lam üzerine alındı,
- Kapatıcı (Ultramount) kullanılarak lamalar, lamel ile kapatıldı.

Işık mikroskopunda sayım yapılarak işaretlenme oranları belirlendi.

3.4.5. Üç Boyulu (Sferoid) Hücre Kültürü

İshikawa çok hücreli tümör sferoidleri üretimi için Sıvı üst tabaka yöntemi (Liquid overlay technique) kullanıldı. Steril bidistile suda hazırlanmış 60 °C' ye kadar soğutulmuş % 3' lük Agar (Gibco, Select agar) solüsyonu ve 40°C' ye kadar ısıtılmış medyum 1/1 oranında karıştırılarak hazırlandı ve 6 kuyucuklu kültür kaplarındaki kuyucukların herbirine 1 ml konarak tüm yüzeyinin kaplanması sağlandı. Kuyucuklardaki agar-medyum karışımı yeteri kadar sertleşmesi için +4°C ' de 10 dakika bekletildi. Kuyucuklardaki agar-medyum karışımının donmasını takiben üzerlerine 5 ml RPMI-1640 medyumunu eklenecek ve inkübatöre kaldırıldı. İki boyutlu hücre kültürlerinde flasklarda üretilen hücreler tripsinize edilerek toplandı, sayıldı ve 6 kuyucuklu kültür kaplarındaki her bir agar-medyum karışımı bulunan kuyucuğa %100 canlı 1×10^6 insan ishikawa endometriyum epiteli hücreleri ekildi.

İki boyutlu hücre kültürü deneylerinde kullanılan gruplar esas alınarak her deney grubu için 3 kuyucuğa ekim yapıldı. Hücreler, 37 °C de %5'lik CO2 hava karışımında, %95 nemli ortamda sferoid oluşturmaları için 5-7 gün kültüre edildi.

Bu sürenin sonunda 100-150 civarında oluşan ve boyutları 150-300 mikron arasında değişen sferoidlere taze hazırlanmış ilaçlar 100 µl'lik hacimlerde verildi. 24 saat sonunda her grubun üçer kuyucuğundaki sferoidler geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmesi için ayrıldı ve takibe alındı.

3.4.6. İlaçların Geçirimli Elektron Mikroskobu İle Hücre İnce Yapısı (Ultrastrüktürel) Üzerine Etkilerinin Saptanması

Sferoidler medyumları ile birlikte 15 ml'lik santrifüj tübüne aktarıldı, 3-5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilip, medyum uzaklaştırıldıktan sonra PBS'de 5 dakika bekletildi ve % 2.5'luk gluteraldehidde 1 saat 4°C'de bekletilerek tespit edildi. PBS

ile 2 defa yıkandıktan sonra, 1000 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edilip, PBS uzaklaştırıldı, ve % 1'lik osmium tetroksit ile 1 saat 4 °C'de bekletilerek ikinci tespit işlemi yapıldı. OsO₄ uzaklaştırıldıktan sonra, sferoidler PBS'de 10 dakika bekletildi ve % 1 uranil asetat 4°C'de 30 dakika bekletilerek üçüncü tespit işlemi yapıldı.

PBS ile yıkandıktan sonra yine PBS içinde 1 ml'lik Ependorf tüplerine alınıp, 1000 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edildi. PBS uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine filtre kağıdından süzölmüş taze yumurta akı eklenip, 1000 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edildi. Yumurta akının fazlası çekilip ve üzerlerine % 70 etanol konarak sertleşmesi için 1-3 gün bekletildi.

Sertleşmeyi takiben kalıplaşan sferoidler Ependorf tüplerinden çıkarılacaktır. Sferoidler artan konsantrasyondaki etanol serilerinden (% 70, % 90, % 96 ve 2 kez % 100 etanol) oda ısısında 10 dakika geçirildi. Daha sonra 1/1 oranında hazırlanmış propilen oksit/epon karışımında 1 saat, 1/3 oranında hazırlanmış propilen oksit/epon karışımında 1 saat ve son aşamada saf eponda 1 saat bekletildikten sonra saf epon bulunan jelatin doku gömme kapsüllerine gömüldü.. Kapsüller, 60 °C'lik etüvde 18 saat bekletildi ve ultramikrotom kullanılarak 60-70 nm kalınlığında kesilip bu ince kesitler bakır gridler üzerine aktarıldı. Sırasıyla 30 dakika % 5'lik uranil asetat ve 7 dakika Reynold's solüsyonu ile boyanıp (kontrast) ve TEM'de incelenmeye uygun hale getirildi.

3.4.7. Üç Boyutlu Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretlenme İndeksi İmmünohistokimya Tekniği

Steril bidistile suda hazırlanmış 60 °C' ye kadar soğutulmuş % 3' lük Agar solüsyonu ve 40°C' ye kadar ısıtılmış medyum 1/1 oranında karıştırılarak hazırlandı ve 6 kuyucuklu kültür kaplarındaki kuyucukların herbirine 1 ml konarak tüm yüzeyinin kaplanması sağlandı. Hücrelerin ekileceği agar yüzeyinin pürüzsüz olmasına özellikle dikkat edildi. Erken donma sebebi ile pürüzlü kuyucuklara hücre ekilmedi. Kuyucuklardaki agar-medyum karışımı yeteri kadar sertleşmesi için +4°C ' de 10 dakika bekletildi. Kuyucuklardaki agar-medyum karışımının donmasını takiben üzerlerine 5 ml RPMI-1640 medyumunu eklendi ve inkübatöre kaldırıldı. İki boyutlu hücre kültürlerinde flasklarda üretilen hücreler tripsinize edilerek toplandı, sayıldı ve 6 kuyucuklu kültür kaplarındaki her bir agar-medyum karışımı bulunan kuyucuğa %100 canlı 1×10^6 insan ishikawa endometriyum epiteli hücreleri ekildi.

İki boyutlu hücre kültürü deneylerinde kullanılan gruplar esas alınarak her deney grubu için 3 kuyucuğa ekim yapıldı. Hücreler, 37 °C de %5'lik CO₂ hava karışımında, %95 nemli ortamda sferoid oluşturmaları için 5-7 gün kültüre edildi.

Bu sürenin sonunda 100-150 civarında oluşan ve boyutları 150-300 mikron arasında değişen sferoidlere taze hazırlanmış ilaçlar 100 µl'lik hacimlerde verildi.

Sferoidlerin ilaçlarla 24 saat süreli etkileşiminin son saatinde, sferoidlere 20 µM olacak şekilde 100 µl BrdU verildi ve 60 dakika 37°C de inkübe edildi. Bu aşamadan sonra sırayla şu protokol incelendi;

- Bu sürenin sonunda sferoidler 1000 devirde 3 dakika santrifüj edilerek toplandı,

- % 10 luk formaldehit ile tespit edildi,

- PBS ile yıkandıktan sonra yine PBS içinde 1 ml'lik Ependorf tüplerine alınıp, 1000 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edildi. PBS uzaklaştırıldıktan sonra üzerlerine filtre kağıdından süzölmüş taze yumurta akı eklenip, 1000 rpm'de 3-5 dakika santrifüj edildi. Yumurta akının fazlası çekilip ve üzerlerine % 70 etanol konarak sertleşmesi için 1-3 gün bekletildi.

- Sferoid topluluğu ependorflardan çıkarıldı ve iğne ile tutturuldu,

- Tüm sferoid grupları yükselen alkol serilerinden geçirilerek (%70, %90,%96, %100, %100, toluol) dehidrate edilip, parafine gömüldü,

- 10 µm kalınlığında kesitler alındı ve 1 gece 65 °C de etüvde bekletildi,

- Kesitler inen alkol serisi (Toluol, %100, %100, %96, %90, %70) ile hidrate edildi,

- Distile suda 5 dakika bekletildikten sonra, %0,5'lik H₂O₂ 'de karanlıkta 20 dakika bekletildi,

- 3 kez distile suda yıkandıktan sonra, %1'lik tripsinde 37°C'de bekletildi,

- Distile suda 5dk 37°C'de bekletildikten sonra, 4 N HCl ile 37 °C de 30 dakika bekletildi,

- PBS ile 5' er dakika 2 kez bekletildikten sonra, Non spesifik blok solüsyonu ile 20 dakika bekletildi,

- Primer antikor ile 1 gece +4 °C de bekletildi,
- PBS ile 5'er dakika 2 kez yıkandı,
- Sekonder antikor ile 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi,
- PBS ile 5'er dakika 2 kez yıkandı,
- Streptavidin Peroksidaz ile oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi,
- Kromojen solüsyonu oda sıcaklığında, karanlıkta, 11 dakika uygulandı,
- Mayer hematoksilen ile 7 dakika bekletildi,
- 3 kez çeşme suyu ile yıkandıktan sonra 15 dakika çeşme suyunda bekletildi,
- Distile su ile yıkanıp lameller lam üzerine alındı,
- Kapatıcı (Ultramount) kullanılarak lamalar, lamel ile kapatıldı.

Işık mikroskopunda sayılarak BrdU-işaretlenme indeksi (BrdU-LI) değerleri saptandı.

3.4.8. Akım Sitometrik Anneksin-V-FITC/PI Boyaması ile İlaçların Programlı Hücre Ölümüne Etkilerinin Saptanması

Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozun önemli göstergelerinden biri fosfatidilserinin plazma membranının iç kısmından dış kısmına yer değiştirmesi (translokasyon) olarak tanımlanır. Fosfatidil serinin dış membrandaki yeri Anneksin-V-Floresin izotiyosiyanat (Anneksin-V-FITC) hedef bölgedir. Anneksin fosfatidil serine bağlanarak onu akım sitometrik saptama için görünür hale getirir. (Vermes ve ark. 1995, Martin ve ark. 1995).

Deneylerde % 100 canlı tek hücre süspansiyonundan 5×10^5 ishikawa insan endometrium hücresi bütün zaman aralıkları (24, 48 ve 72 saatler) için 5'er ml RPMI-1640 medyumunu içeren 3'er kuyucuğa ekildi ve inkübatör ortamında tutuldu. Proliferasyon deneylerindeki her bir grup, ilaç konsantrasyonu ve zaman aralığı (24, 48 ve 72 saat) aynı kalarak deneyler gerçekleştirildi. Bu inkübasyon sürelerinin sonunda hücreler toplanıp, PBS ile iki defa yıkandı ve apoptoz kitinde bulunan bağlama tamponu (0.01 M HEPES, 0.14 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) eklenerek süspansiyon haline getirildi. Bağlama solüsyonu içindeki hücre süspansiyonuna (100 µl bağlama solüsyonu içinde 1×10^6 hücre) 5 µl FITC-etiketli Anneksin V ve vital boya olan propidyum iodid (PI) eklenerek oda ısısında karanlıkta 15 dakika bekletildi. Sonra Anneksin-V-FITC ve

PI ile verdiği floresans akım sitometre cihazı ile ölçüldü. Sonuçlar CellQuest ve WinMDI analiz programları ile değerlendirildi ve kontrol grubuna göre ilaçların ölü, canlı ve apoptotik hücre oranları üzerine etkileri saptandı.

3.5. İstatiksel Yöntem

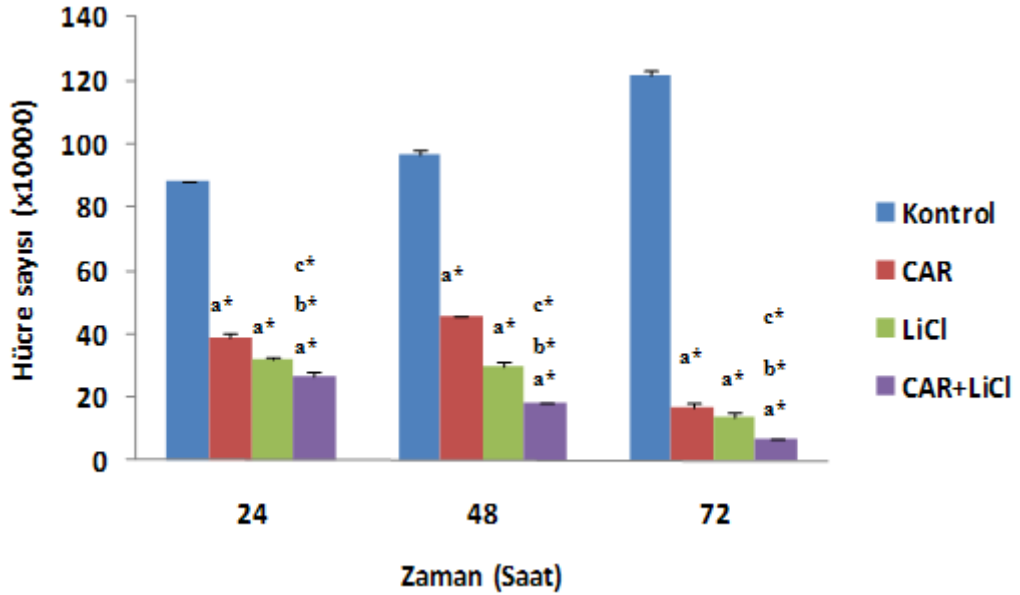
İlaçların Ishikawa Endometrium epiteli hücreleri üzerine etkilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS 17 adlı istatistik yazılım programı kullanıldı. Tüm deneyler için bağımsız Student-*t*-test uygulaması yapıldı. Yapılan Student-*t*-test sonucunda *p* değeri 0.05'ten küçük olan değerler için fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Tutunma (Plating) Verileri

Tablo 4-1: İshikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde İlaçların Hücre Sayısı Üzerine Etkileri.

	24 SAAT	48 SAAT	72 SAAT
Kontrol	$88 \times 10^4 \pm 0$	$97 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$	$122 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$
CAR	$39 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$	$46 \times 10^4 \pm 0$	$17 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$
LiCl	$32 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$	$30 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$	$14 \times 10^4 \pm 0$
CAR+LiCl	$27 \times 10^4 \pm 1 \times 10^4$	$18 \times 10^4 \pm 0$	7 ± 0



Şekil 4-1: Zamana Bağlı Hücre Çoğalma Verileri.

^a Kontrol Grubuna Göre, ^b CAR Grubuna Göre, ^c LiCl Grubuna Göre

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p > 0.05$

1-) Endometrium epiteli İshikawa tümör hücreleri 24, 48 ve 72. saatlerde inkübe edildi. Bu zaman dilimi boyunca kontrol grubunu oluşturan hücre sayısı, beklenildiği üzere sağlıklı ve katlanarak çoğalma gösterdiği Şekil 4-1’de gösterilmiştir.

2-) Karboplatin (CAR) grubu incelendiğinde; hücrelerin sayısında 24. ve 72. saatler arasındaki zaman dilimleri boyunca kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde

azalmanın olduğu saptandı. Bu azalmanın; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel anlamlı olduğu saptandı.

3-) Lityum klorür (LiCl) grubu incelendiğinde; hücrelerin sayısında 24. ve 72. saatler arasındaki zaman dilimleri boyunca kontrol grubuna oranla anlamlı düzeyde azalmanın olduğu saptandı. Bu azalmanın; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel anlamlı olduğu saptandı.

4-) Kombinasyon grubu (CAR+LiCl) incelendiğinde; hücre sayısında, 24, 48 ve 72. Saatlerde kontrol grubuna, CAR grubuna ve LiCl grubuna oranla anlamlı bir azalmanın olduğu saptandı.

Kontrol grubuna göre; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel anlamlı olduğu saptandı.

CAR grubuna göre; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel anlamlı olduğu saptandı.

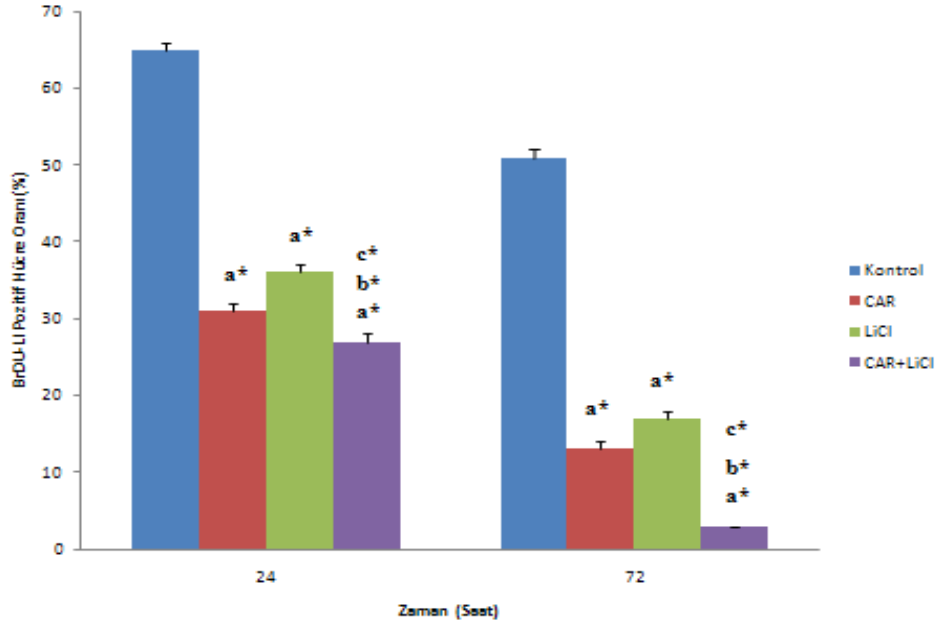
LiCl grubuna göre; 24. saatte ($p<0.01$), 48. saatte ($p<0.01$), 72. saatte ($p<0.01$) istatistiksel anlamlı olduğu saptandı.

4.2. Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretlenme İndeksi Değerleri (BrdU-LI)

Tablo 4-2: Ishikawa Endometrial Epiteli Hücre Kültürlerinde İlaçların Sentez Fazındaki Hücreler Üzerine Etkileri

	24 SAAT	72 SAAT
Kontrol	65 ± 1	51 ± 1
CAR	31 ± 1	13 ± 1
LiCl	36 ± 1	17 ± 1
CAR + LiCl	27 ± 1	3 ± 0

Tabloda rakamlar BrdU pozitif olarak düzenlenmiştir.



Şekil 4-2: Ishikawa Endometrium Epiteli Tek Tabakalı Hücre Kültürlerinde BrdU Pozitif İşaretlenme Değerleri

^a Kontrol Grubuna Göre, ^b CAR Grubuna Göre, ^c LiCl Grubuna Göre

* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, *** $p > 0.05$

1-) Tek tabakalı Ishikawa Endometrium Epiteli hücre kültürlerindeki Kontrol grubundaki hücreler incelendiğinde; 24. saatte % 65, 72. saatte % 53 oranında BrdU pozitif işaretlenme görüldü.

2-) CAR grubundaki BrdU pozitif işaretlenme oranı 24. saatte % 31, 72. saatte ise %13 oranında izlendi. Her iki zaman dilimide kontrol grubu ile karşılaştırıldığında karboplatinin istatistiksel olarak anlamlı (24. saat $p < 0,01$; 72. saat $p < 0,01$) sentez fazı inhibisyonu yarattığı saptandı.

3-) LiCl grubundaki BrdU pozitif işaretlenme oranı 24. saatte %36, 72. saatte % 17 oranında görüldü. Her iki zaman dilimide kontrol grubuna oranla incelendiğinde Lityum klorür'ün hücreler üzerinde anlamlı (24. saat $p < 0,01$; 72. saat $p < 0,01$) bir sentez fazı inhibisyonu yarattığı görüldü.

4-) Kombinasyon (CAR + LiCl) grubu incelendiğinde 24. saatte % 27, 72. saatte % 3 oranında işaretlenme saptandı. Her iki zaman dilimide incelendiğinde;

Kontrol grubuna oranla kombinasyon grubunun hücreler üzerinde anlamlı (24. saat $p<0,01$; 72. saat $p<0,01$) bir sentez fazı inhibisyonu yarattığı gözlemlendi.

CAR grubuna oranla kombinasyon grubunun hücrelerin sentez fazındaki inhibisyon oranının anlamlı (24. saat $p<0,01$; 72. saat $p<0,01$) bir şekilde arttırdığı saptandı.

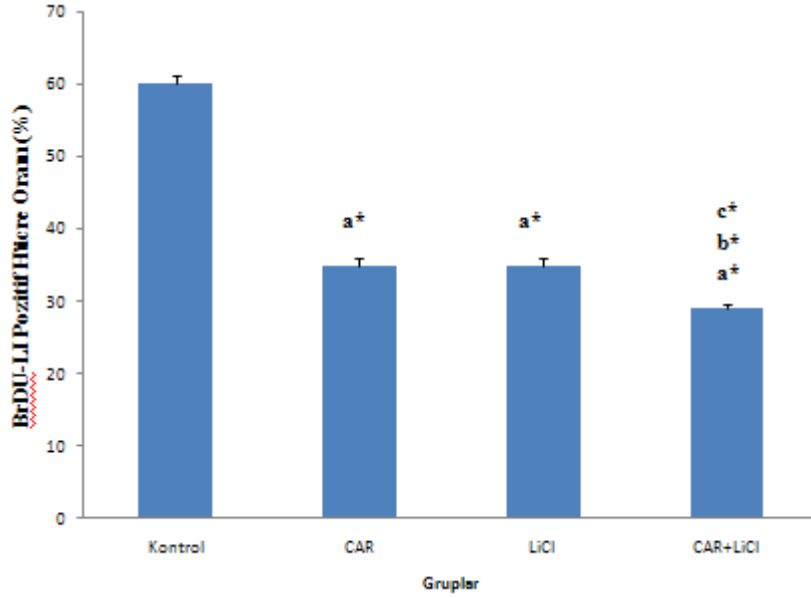
LiCl grubuna oranla kombinasyon grubunun hücrelerin sentez fazındaki inhibisyon oranını anlamlı (24. saat $p<0,01$; 72. saat $p<0,01$) bir şekilde arttırdığı saptandı (Şekil 4-2).

4.3. Üç Boyutlu (Sferoid) Hücre Kültürlerinde BrdU İşaretlenme İndeksi Değerleri (BrdU-LI)

Tablo 4-3: Ishikawa Endometrial Epiteli 3 Boyutlu (Sferoid Model) Hücre Kültürlerinde İlaçların Sentez Fazındaki Hücreler Üzerine Etkileri.

	24. SAAT
Kontrol	59,66 $\pm$ 1
CAR	35 $\pm$ 1
LiCl	35 $\pm$ 1
CAR + LiCl	29 $\pm$ 0,58

Tabloda Rakamlar BrdU Pozitif Olarak Düzenlenmiştir.



Şekil 4-3: Ishikawa Endometrium Epiteli 3 Boyutlu (Sferoid Model) Hücre Kültürlerinde BrdU Pozitif İşaretlenme Değerleri.

^a Kontrol Grubuna Göre, ^b CAR Grubuna Göre, ^c LiCl Grubuna Göre

* p<0.01, ** p<0.05, *** p>0.05

1-) 3 boyutlu (sferoid model) Ishikawa Endometrium Epiteli hücre kültürlerindeki Kontrol grubundaki hücreler incelendiğinde; 24. saatte % 59,66 oranında BrdU pozitif işaretlenme görüldü.

2-) CAR grubundaki BrdU pozitif işaretlenme oranı 24. saatte % 35 olarak saptandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sentez fazındaki hücrelerin inhibisyonunun anlamlı (p< 0,01) bir şekilde arttığı gözlemlendi.

3-) LiCl grubundaki BrdU pozitif işaretlenme oranı 24. saatte %35 olarak saptandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sentez fazındaki hücrelerin inhibisyonunun anlamlı (p< 0,01) bir şekilde arttığı gözlemlendi.

4-) Kombinasyon grubu (CAR + LiCl) incelendiğinde ise hücrelerdeki işaretlenme oranının % 29 olduğu saptandı. Kontrol grubuna oranla kombinasyon grubunun hücreler üzerinde anlamlı (24. saat p<0,01) bir sentez fazı inhibisyonu yarattığı gözlemlendi.

CAR grubuna oranla kombinasyon grubunun hücrelerin sentez fazındaki inhibisyon oranının anlamlı (24. saat p<0,01) bir şekilde arttırdığı saptandı.

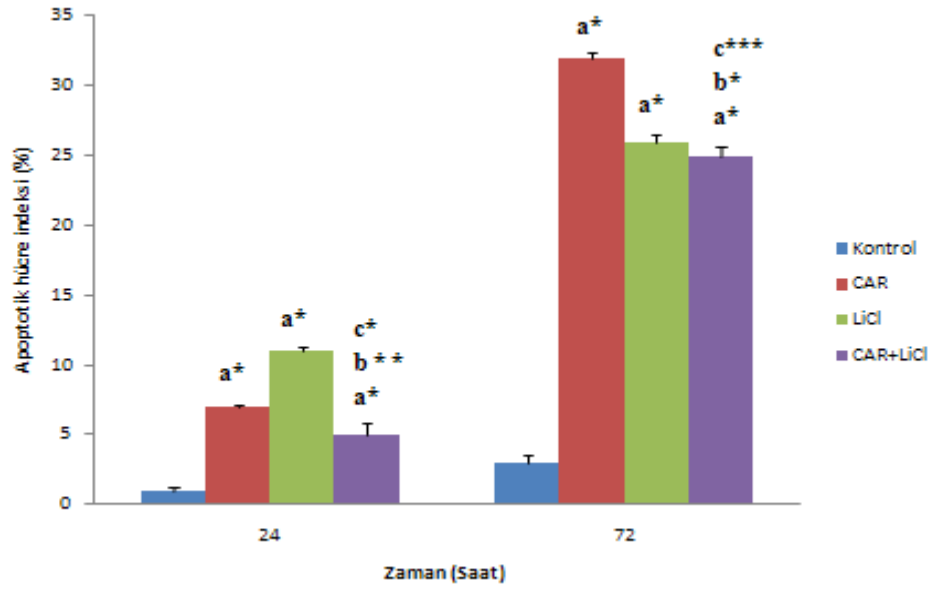
LiCl grubuna oranla kombinasyon grubunun hücrelerin sentez fazındaki inhibisyon oranını anlamlı (24. saat $p<0,01$) bir şekilde arttırdığı saptandı (Şekil 4-3).

4.4. Akım Sitometrik Anneksin-V-FITC/PI Boyaması ile İlaçların Programlı Hücre Ölümü Üzerine Etkileri

Tablo 4-4: İlaçların programlı hücre ölümü üzerine etkileri.

	24 SAAT	72 SAAT
Kontrol	1 ± 0	3 ± 1
CAR	7 ± 0	32 ± 1
LiCl	11 ± 1	26 ± 0
CAR + LiCl	5 ± 0	25 ± 1

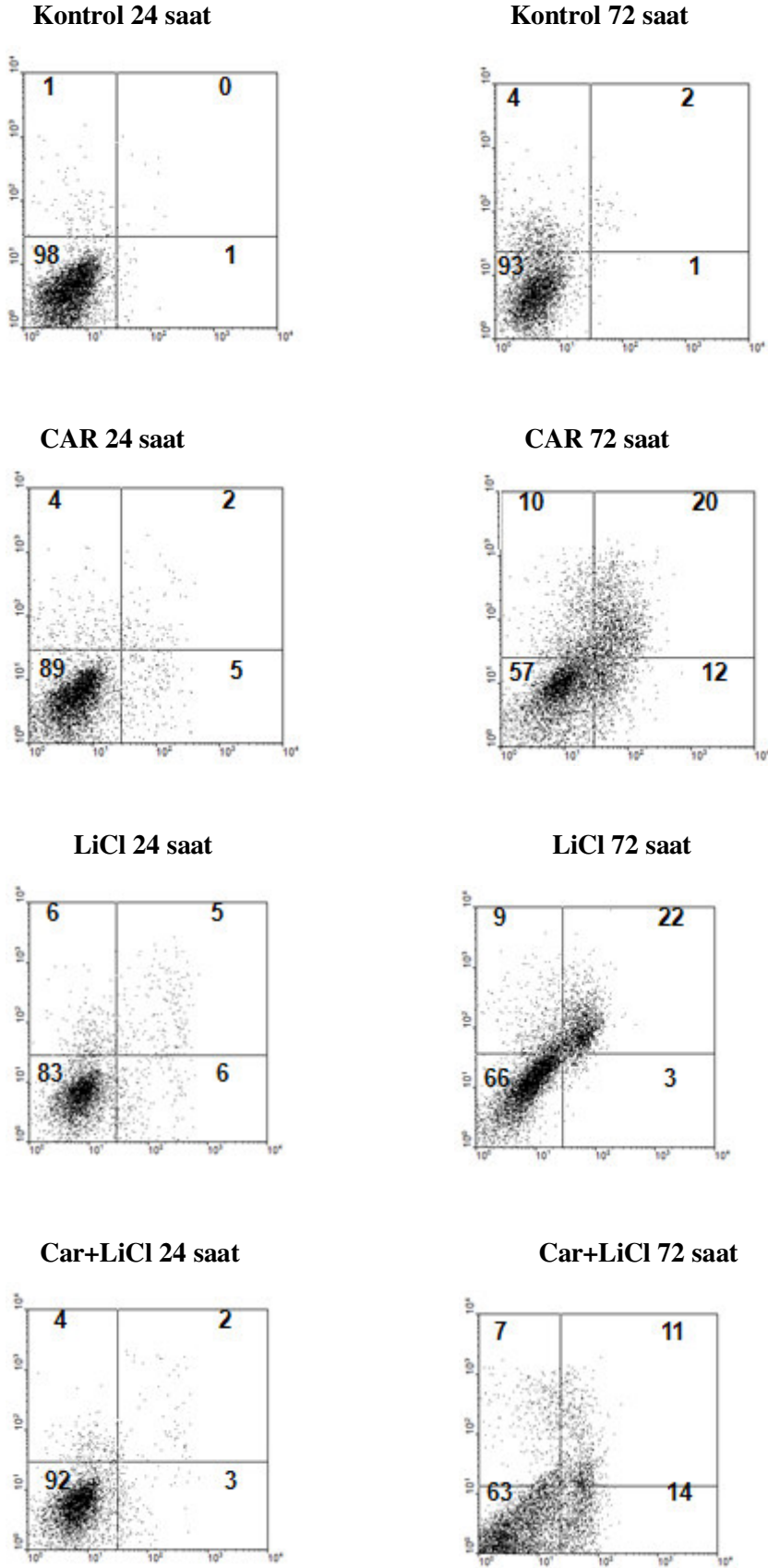
(Tablodaki rakamlar % olarak verilmiştir.)



Şekil 4-4: İlaçların Programlı Hücre Ölümü Üzerine Etkileri.

^a Kontrol Grubuna Göre, ^b CAR Grubuna Göre, ^c LiCl Grubuna Göre

* $p<0.01$, ** $p<0.05$, *** $p>0.05$



Şekil 4-5: İlaçların Programlı Hücre Ölümü Üzerine Etkileri (Panel)

1-) Kontrol grubunda 24. saatte apoptoza giden hücre oranı % 1 iken bu oran 72. saatte % 3 olarak gözlemlendi.

2-) CAR grubu incelendiğinde; 24. saatte % 7 olan apoptoz oranı 72. saatte % 32 olarak izlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki zaman dilimindedey anlamlı bir şekilde (24. saatte $p<0,01$; 72. saatte $p<0,01$) apoptoza giden hücre sayısını arttığı saptandı.

3-) LiCl grubunda 24. saatte % 11 olan apoptoz oranı 72. saatte % 26 ye çıkmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki zaman dilimindedey apoptoz oranında anlamlı (24. saatte $p<0,01$; 72. saatte $p<0,01$) bir artış saptandı.

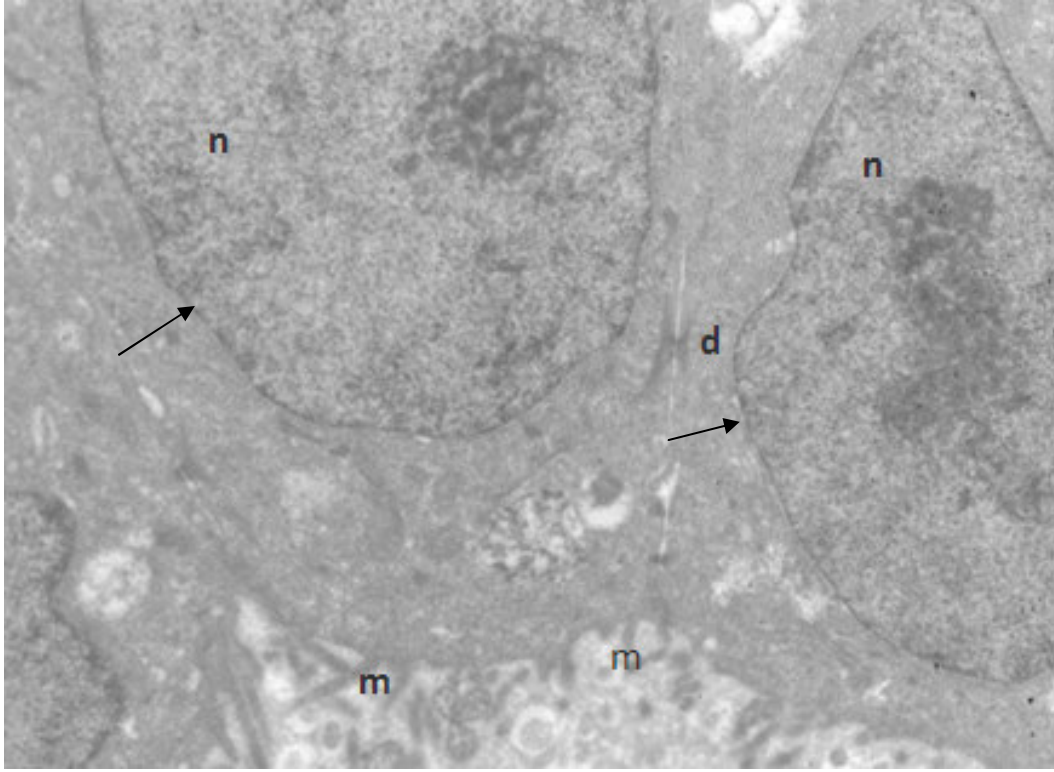
4-) Kombinasyon (CAR + LiCl) grubunda ise 24. Saatte % 5 olan apoptoz oranı 72. Saatte % 25' ya çıktığı görüldü. Kombinasyon grubu;

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki zaman dilimindedey apoptoz oranında anlamlı (24. saatte $p<0,01$; 72. saatte $p<0,01$) bir artış olduğu izlendi.

CAR grubu ile karşılaştırıldığında her iki zaman diliminde de apoptoz oranında anlamlı (24. saatte $p<0,05$; 72. saatte $p<0,01$) bir artış olduğu izlendi.

LiCl grubu ile karşılaştırıldığında ise 24 saat sonunda apoptoz oranında anlamlı bir artışın olduğu(24. saatte $p<0,01$), 72. Saatte ise kombinasyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü(72. saatte $p>0,05$; $p=0,13$) (Şekil 4-4, Şekil 4-5).

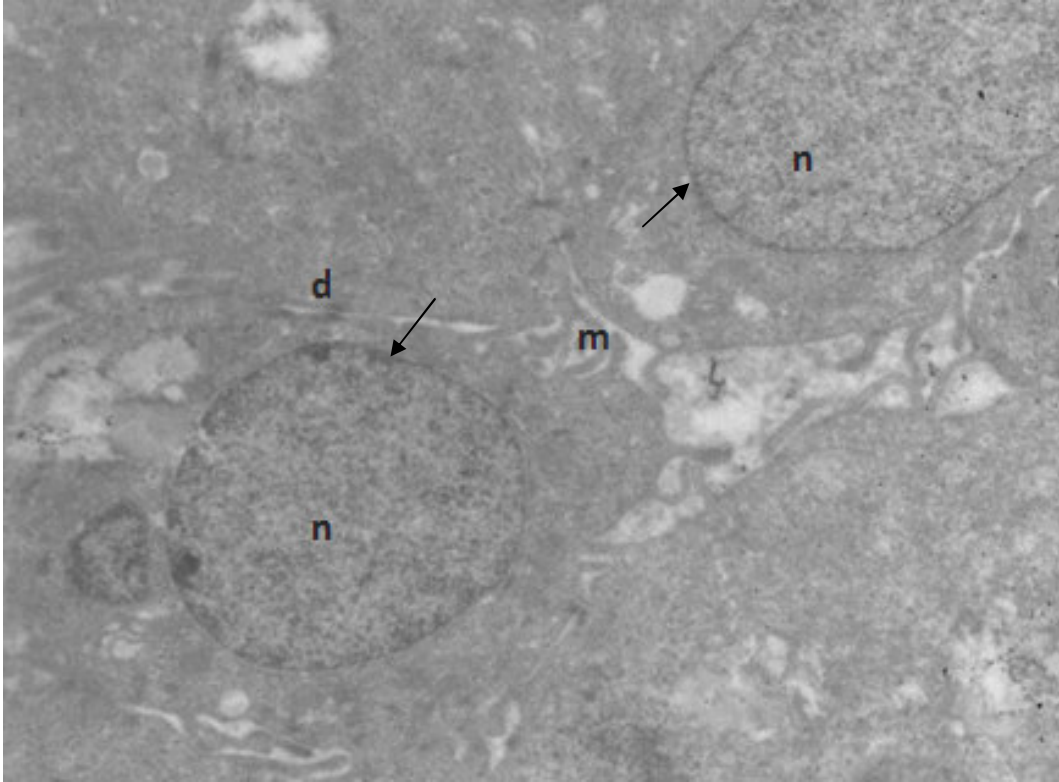
4.5. İlaçların Geçirimli Elektron Mikroskobu ile Hücre İnce Yapısı (Ultrastrüktürü) Üzerine Etkileri



Şekil 4-6: Kontrol Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.

(X 12000)

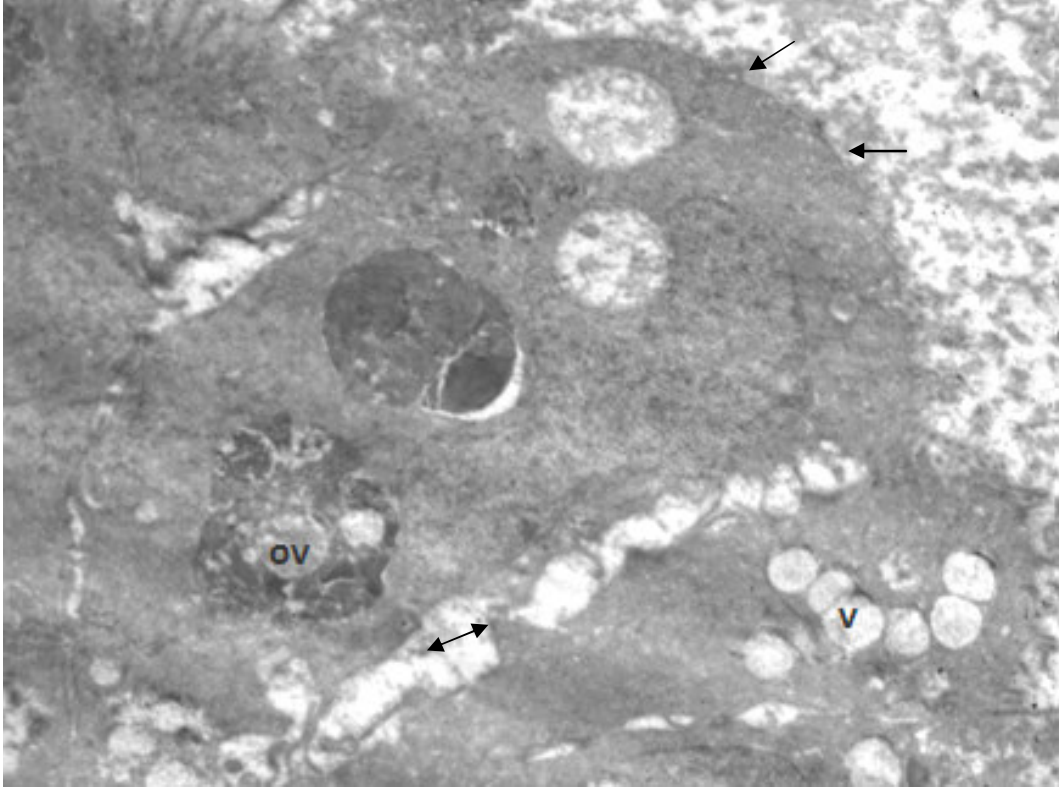
%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen Kontrol grubu fotoğrafında; hücre membranı ve nükleus membran(→) yapısının intakt olduğu, dezmozomların (d) düzgün yapıda bulunduğu ve ökromatik nükleusun (n) bulunduğu, mikrovillus (m) yapılarının düzgün olduğu gözlemlendi.



Şekil 4-7: Kontrol Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.

(X12000)

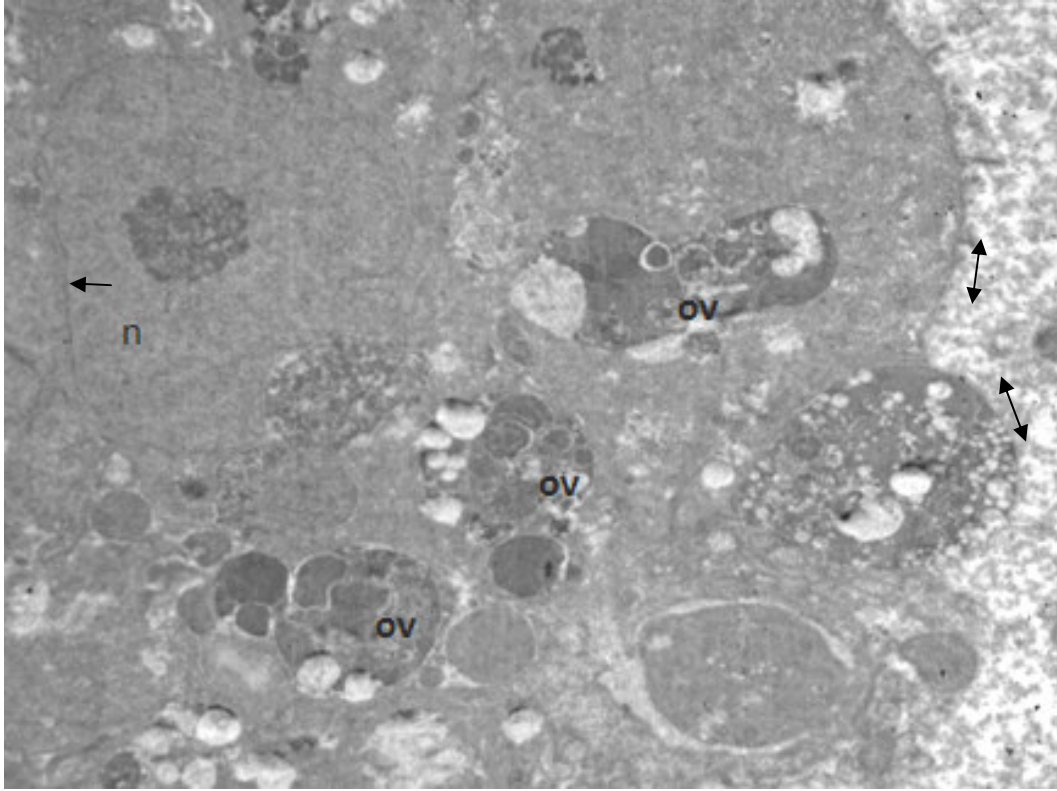
%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen Kontrol grubu fotoğrafında; hücreler arası bağlantıların düzgün, hücre membranı ve nükleus membran yapısının intakt olduğu(→), mikrovillus (m) yapısının düzgün olduğu ve dezmozomların (d) düzgün yapıda bulunduğu gözlemlendi.



Şekil 4-8: Karboplatin Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.

(X6000)

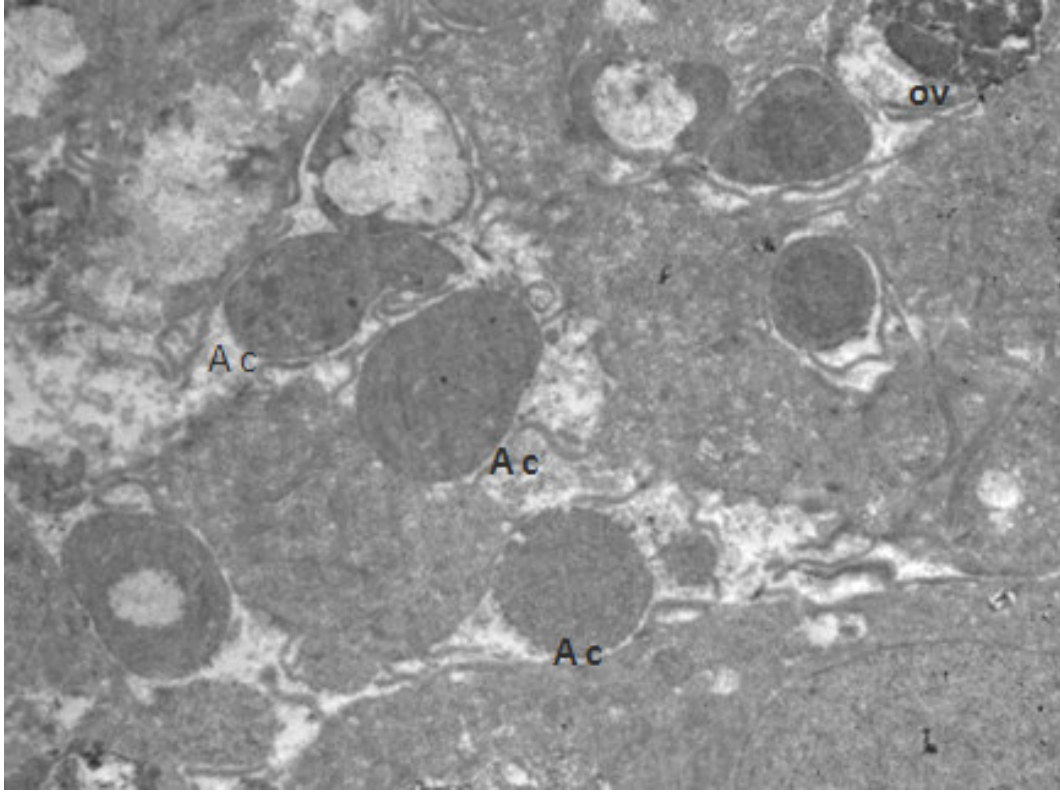
%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen CAR grubu fotoğrafında; sferoid bütünlüğünün bozulduğu, mikrovillus kaybının olduğu (→) ve otofajik vakuol (ov) yapısının oluştuğu, hücreler arası boşluklar (↔) ve vakollerin(v) oluştuğu gözlemlendi.(X6000)



Şekil 4-9: Lityum Klorür Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.

(X5000)

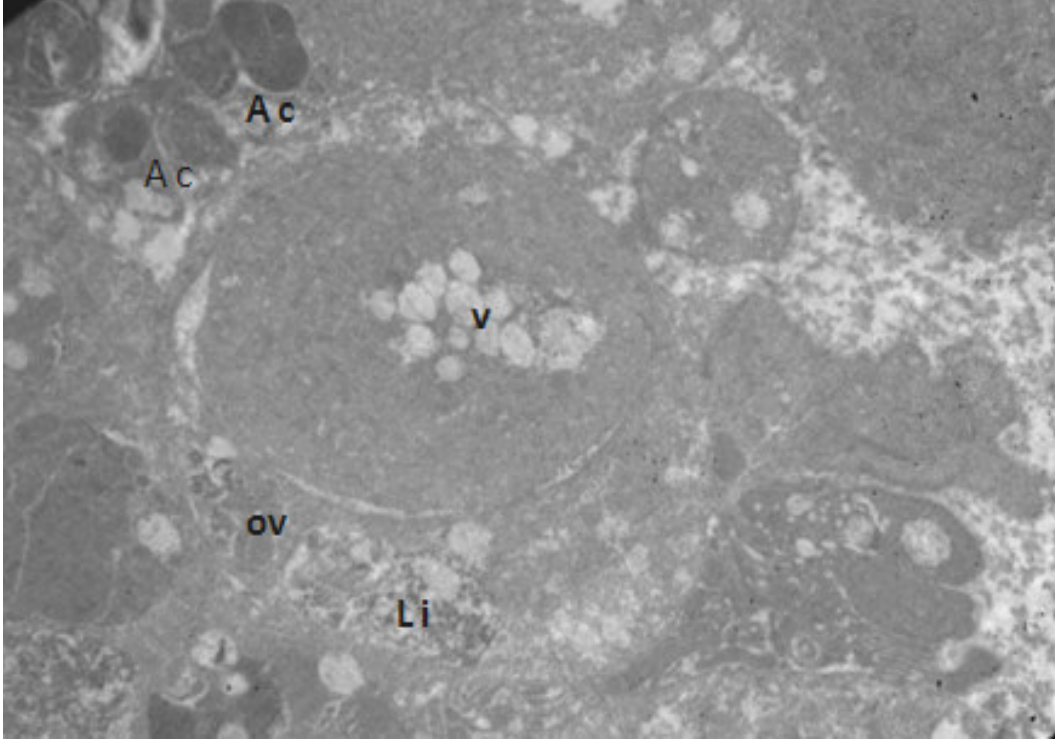
%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen LiCl grubu fotoğrafında; hücre ve nukleus (n) membranının intakt($\rightarrow$) olduğu ancak mikrovillus kaybının olduğu ($\leftrightarrow$) ve otofajik vokuol (ov) benzeri yapıların olduğu gözlemlendi. (X5000)



Şekil 4-10: Lityum Klorür Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.

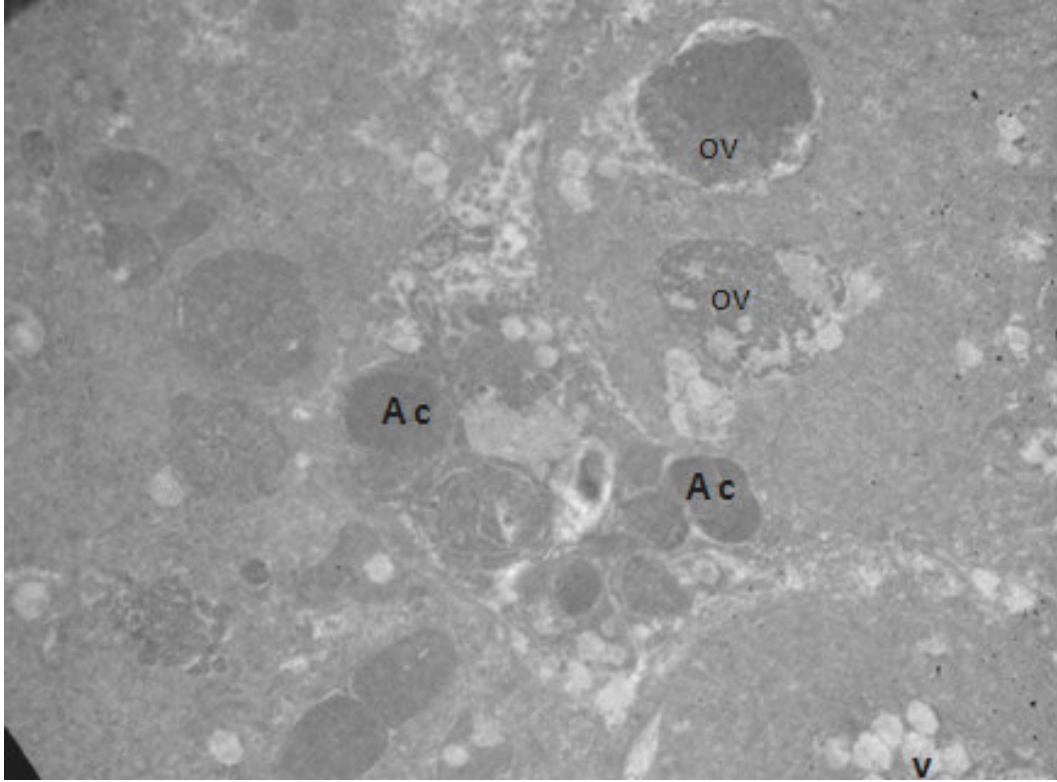
(x7500)

%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen LiCl grubu fotoğrafında; apoptotik cisimlerin(A c) oluştuğu, stoplazmik yıkımın gerçekleştiği ve otofajik vokuol (ov) benzeri yapıların oluştuğu izlendi. (X7500)



**Şekil 4-11: Kombinasyon (Car+ LiCl) Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.
(X5000)**

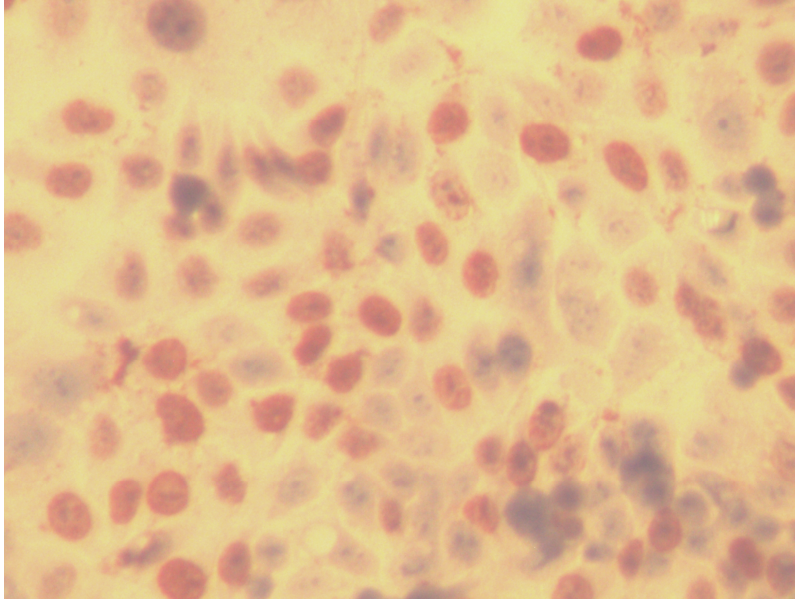
%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen kombinasyon (CAR + LiCl) grubu fotoğrafında; sferoid bütünlüğünün bozulduğu, hücre içinde litik değişikliklerin olduğu(L i), hücreler arası alanda apoptotik cisimlerin (A c) olduğu, otofajik vakuol(ov) benzeri yapıların ve vakuol yapılarının olduğu izlendi.



Şekil 4-12: Kombinasyon (Car+ LiCl) Grubu Elektron Mikroskobu Fotoğrafı.

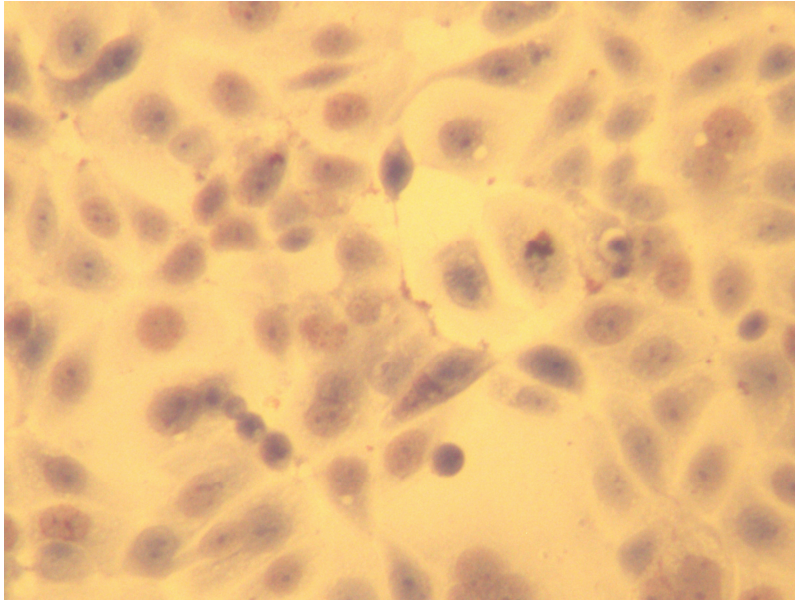
(X5000)

%100 canlı 1×10^6 ishikawa hücrelerinden oluşturulan sferoidlerden çekilen kombinasyon (CAR + LiCl) grubu fotoğrafında; apoptotik cisimlerin(A c) oluştuğu ve otofajik vakuol (ov) benzeri yapıların oluştuğu gözlemlendi.



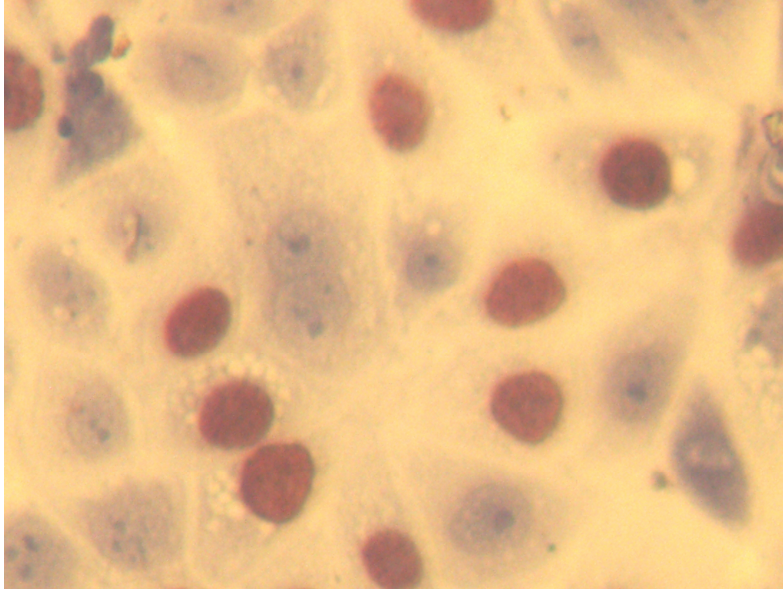
Şekil 4-13: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 24 Saat Kontrol Grubu BrdU İmmünohistokimyası.

(X160)



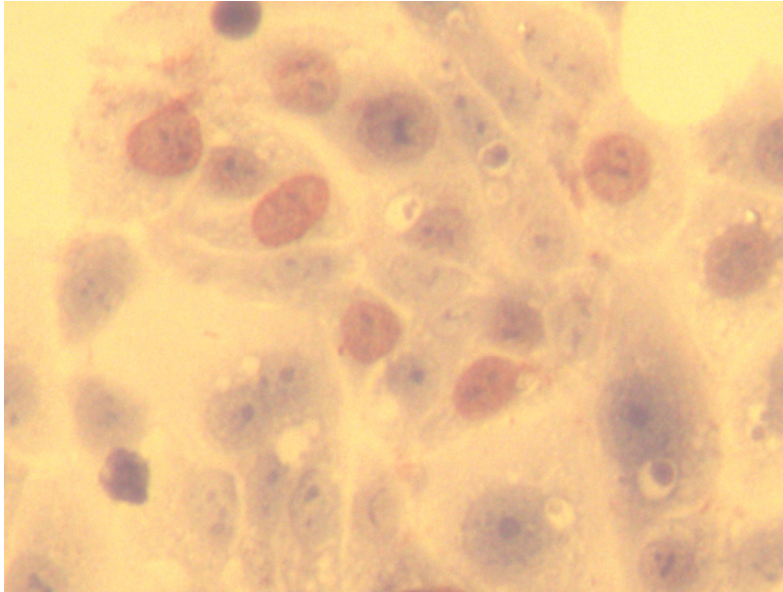
Şekil 4-14: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 24 Saat Karboplatin Grubu BrdU İmmünohistokimyası.

(X160)



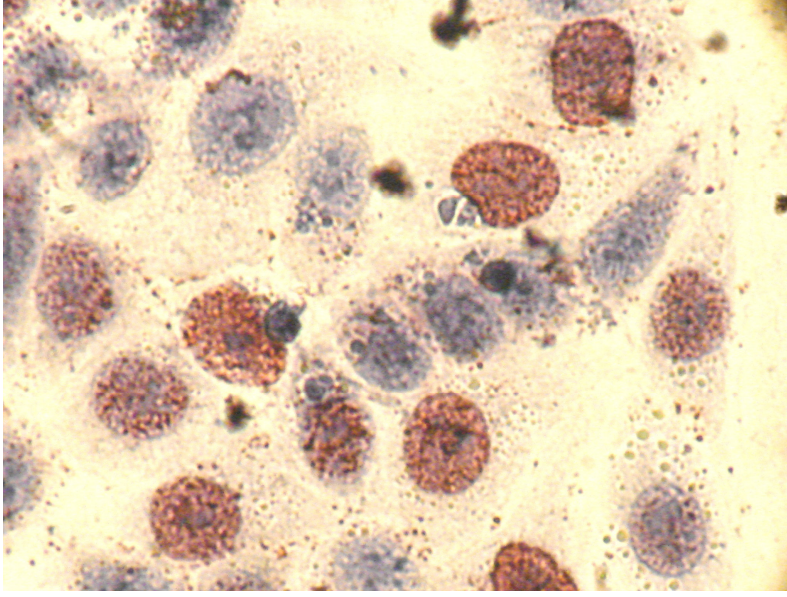
Şekil 4-15: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 24 Saat Lityum Klorür Grubu BrdU İmmünohistokimyası.

(X320)



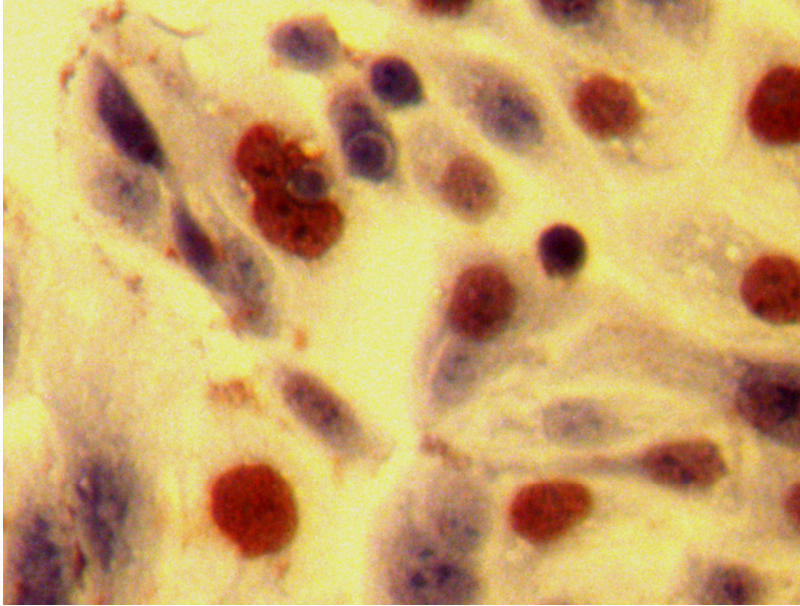
Şekil 4-16: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 24 Saat Kombinasyon Grubu BrdU İmmünohistokimyası.

(X160)



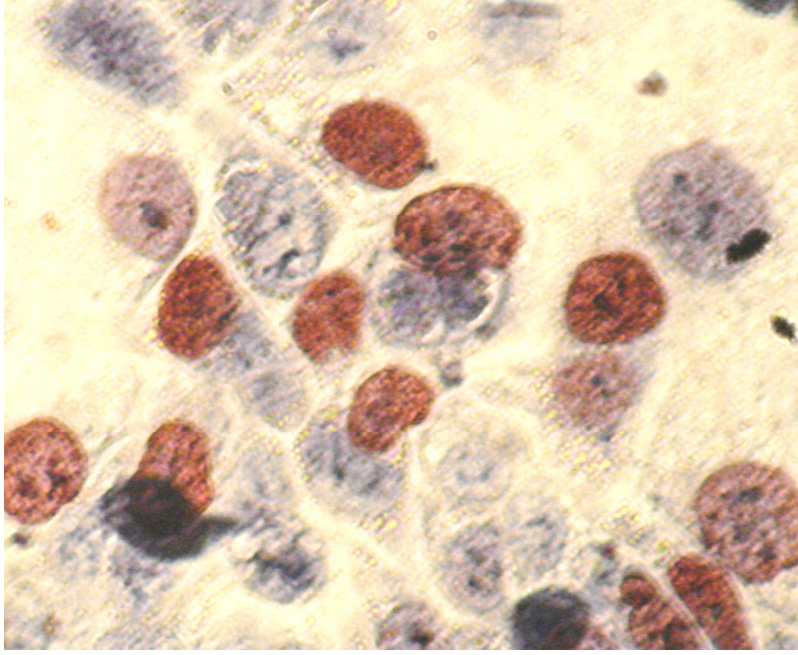
Şekil 4-17: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 72 Saat Kontrol Grubu BrdU İmmünohistokimyası.

(X180)



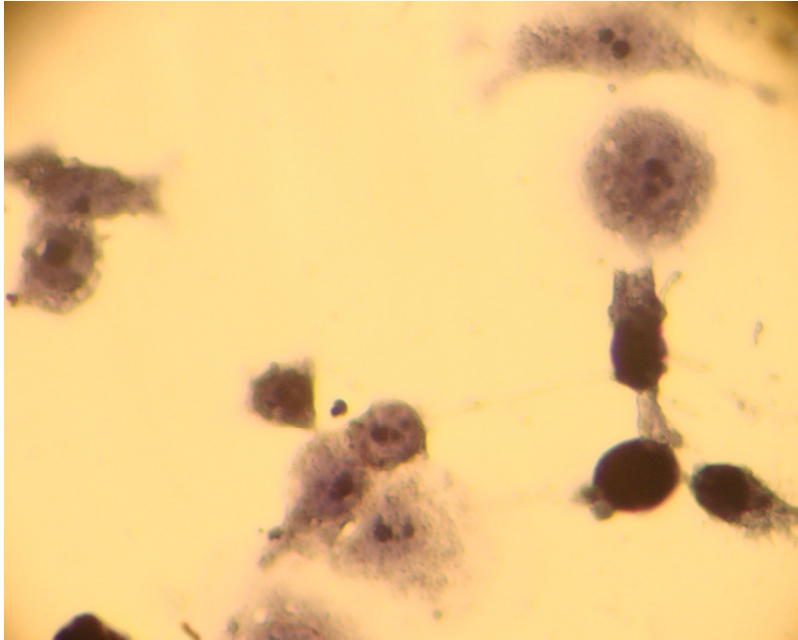
Şekil 4-18: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 72 Saat Karboplatin Grubu BrdU İmmünohistokimyası.

(X220)



Şekil 4-19: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 72 Saat Lityum Klorür Grubu BrdU İmmünohistokimyası.

(x180)



Şekil 4-20: 2 Boyutlu Ishikawa Endometrium Epiteli Hücre Kültürlerinde 72 Saat Kombinasyon Grubu BrdU İmmünohistokimyası.

(X440)

5. TARTIŞMA

Endometrium kanserleri kadın genital kanserleri arasında görülme sıklığı bakımından ilk sırada yer alan öldürücü kanser türlerinden biridir(1, 2). Endometrium kanseri hücrelerinde meydana gelen β -catenin genindeki mutasyon sonucu infertiliteye yol açabilen bir kanser çeşididir ve Endometrioid adenokarsinoma uterus serviks endometrioizisinden köken alan bir kanser türüdür(3, 21).

Ishikawa hücreleri insan uterus endometrium epitelinden köken alan adenokarsinoma hücre soyu olup östrojene duyarlıdır(4). Endometrium epitelinin östrojen ve diğer kemoterapotik ajanlara karşı yanıtlarının çalışılabileceği ideal bir hücre soyudur(4, 19).

Endometrium epitelinin östrojen ve diğer kemoterapotik ajanlara karşı yanıtlarının çalışılabileceği ideal bir hücre soyudur(4, 19).

Karboplatin, endometrial karsinomlarını da içine alan çeşitli tümörlerin tedavisinde kullanılan ikinci nesil alkilleyici bir antineoplastik ajandır(5, 6, 7). Hücre düzeyinde sitotoksik etkileri başlıca DNA hasarı meydana getirmesidir(8). Karboplatin nükleotidlerin onarımını içine alan direnç mekanizmasına yakalanmadan DNA ve RNA polimerazı engelleyerek antineoplastik aktivasyonunu gösterir(12). Karboplatin DNA nükleozom yapısının yeniden düzenlenmesine yol açarak hücre bölünmesini, büyümesini ve çoğalmasını engellediği gösterilmiştir(8,56).

Platinyum türevlerinin endometrial tümör hücrelerine karşı göstermiş oldukları sitotoksik etkilerin tayininde hücre canlılık oranlarının da içinde bulunduğu çeşitli metodlar kullanılmaktadır(8,56).

Lityum klorür, bipolar efektif bozukluğu olan hastaların tedavisinde duyudurum düzenleyici olarak kullanılan ilaçtır. Tedavi amaçlı son 50 yıldır kullanılmasına karşın hücre düzeyindeki terapotik etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır(51). Lityum klorür'ün tedavi edici düzeylerinde, glikojen sentez kinaz-3 β (GSK-3 β) etkinliğini baskıladığı gösterilmiştir(48, 49, 50). GSK-3 β hücrede cateinin adlı proteinin fosfatlanması ve degradasyonu sonucu transkripsiyonel olarak görev yapamaz hale gelir ve sonuç olarak hücrenin bölünememesine ve apoptoza gitmesine neden olur(9, 46).

Lityum klorür'ün glioma hücre sferodilerinde hücre göçünü GSK-3 β inhibisyonu üzerinden gerçekleştirdiği, Lityum klorür'ün etki yolağında bulunan bir molekül olan inositol monofosfataz enziminin engellenmesi ise sferoid hücre büyümesi ve hücre hareketlerinde etkili olmadığı bildirilmiştir(11)

Hücre kültürü çalışmaları hücrelerin antineoplastik ajanlara karşı etkinlik oranlarının saptanmasında etkin ve yaygın olarak kullanılmaktadır(53). İki ve üç boyutlu hücre kültürü modellerinden elde edilen sonuçlar in-vivo korelasyon bakımından çeşitlilik göstermektedir(52, 54)

Antineoplastik ajanların in-vitro etkinlk düzeyinin saptanmasında çok farklı hücre kültürü parametre ve yöntemleri kullanılmaktadır. Bu parametrelerin başında hücrelerin farklı doz ve zaman aralığında ilaçlarla etkilendirilerek doz ve zaman etkileşim grafiklerinin saptanması ve bunun sonucu olarak varsa bir engellemenin doza mı, zamana mı yoksa hücreye mi özgün olduğu belirlenebilmektedir.

Bizim çalışmamızda ishikawa Endometrium hücre kültürlerinde, hücrelere değişen doz ve zaman aralıklarında Karboplatin, Lityum klorür ayrı ayrı ve birlikte uygulandığında hücrelerin doza ve zamana bağlı olarak hücre sayılarında azalma olmuştur (Tablo 4-1). Bu azalma literatür bilgisiyle uyumlu (11, 14, 15, 55) gözükmemektedir ve istatistiksel olarak anlamlıdır($p<0,01$).

Kontrol grubu ishikawa hücreleri zamana bağlı olarak düzgün ivmeli bir artış göstermesine karşın, hem Karboplatin hemde Lityum klorür grubu hücreleri anlamlı düşüşler göstermiştir(Tablo 4-1, Şekil 4-1). Buna karşın kombinasyon grubu hücreleri sadece Karboplatin ve Lityum klorür grubu ile karşılaştırıldığında hücre sayısında görülen düşüşlerin istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p<0,01$). Bu anlamlılığın analizler sonucu sinerjistik bir sitotoksitesi olduğu gösterildi.

BrdU işaretleme indeksleri açısından değerlendirildiğinde 24 ve 72. Saatlerde kontrol grubunda işaretlenme indeksi değerleri %53 ve %65 arasında seyrederken, bu değerler Karboplatin grubunda zamana bağlı olarak azalmış ve 72. Saatte %13 seviyesine gerilemiştir. Benzer şekilde Lityum klorür grubu hücreleri de zamana bağlı olarak işaretlenme indeksinde azalma meydana gelmiştir($p<0,01$) bu bulgu literatürle uyumludur(61). Bu bulgu genellikle literatürlerle uyumlu olmakla birlikte(58, 59, 60) az sayıdaki farklı söylemde bulunan çalışmalar da bulunmaktadır(57). Kombinasyon grubu hücrelerinde ilerleyen saatlerde %3 gibi çok düşük bir BrdU işaretlenme indeksi

saptanmıştır. Bütün gruplar ve kombinasyon grubu hücrelerinin BrdU işaretlenme indeksi değerleri kontrol gruplarından istatistiksel olarak az bulunmuştur ve bu düşüş anlamlı($p<0,01$) ve literatürle uyumludur(56).

İlginç olan kombinasyon grubu BrdU işaretlenme indeksi değeri 72. Saatte belirgin bir şekilde hem Karboplatin hemde Lityum klorür grubuna göre azalmıştır. Bu düşüş ile maddelerin, beraber kullanıldığında sentez fazı inhibisyonu açısından sinerjistik bir etki gösterdikleri söylenebilir ve bu sonuç literatürle uyumludur(14, 15).

İlaç hücre etkileşimi için iki boyutlu hücre kültür sonuçlarının tam olarak in-vivo korelasyon sağlayamaması sonucu yeni etkin ve güvenilir kültür metodları geliştirilmeye çalışılmıştır. Multiselüler sferoid hücre kültürleri tümör mikro çevresini ve doğasını en iyi şekilde yansıtan bir method olarak ortaya çıkmış ve sonuçları itibariyle yüksek in-vivo korelasyon göstermektedir.

Çalışmamızda likit-overlay teknik kullanılarak oluşturulan sferoidler kullanılmış ve bu ilaçların tek tek ve kombinasyon uygulamaları sonucu sferoid BrdU işaretlenme indeksleri üzerine etkileri tartışılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubu sferoidlerinde %60 seviyelerinde saptanan BrdU indeksi hem Karboplatin hemde Lityum klorür ve Kombinasyon grubunda azalmıştır(Tablo 4-2, Şekil 4-3).

Sferoid doğası gereği sferoid çapı büyüdükçe dış ve iç hücrel farklılaşma sürecinin arttığı ve dışarıdan içeriye doğru proliferasyon, semi apoptotik veya apoptotik ve en içte ise nekrotik bir zon geliştiği görülmüştür. İlaçların proliferasyon indeksini azaltmış olması bu bilinen zonların daha belirgin hale geldiğini gösterebilir. Ayrıca sferoid çapı üzerinde inhibisyon meydana getirebilir. Bizim çalışmamızda saptanan işaretlenme indekslerindeki düşüş beklenen bir inhibisyon mekanizmasının yürüdüğünü göstermektedir.

Hücre proliferasyon ve canlılık oranlarının ve ilaçların etki düzeylerinin saptanmasında kullanılan güvenli metodlardan biri de Akım Sitometrik (Flow Cytometry, FCM,) analizlerinin değerlendirilmesidir. Çalışmamızda programlı hücre ölüm oranları kontrol grubu hücrelerinde 24 saatte %1, 72 saatte %3 iken (Tablo 4-4, Şekil 4-5) Karboplatin grubunda özellikle 72. Saatte %32, Lityum klorür grubunda %26 ve kombinasyon grubunda %25 (Tablo 4-4, Şekil 4-5) olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara bakıldığında hem Karboplatin hemde Lityum klorür ayrı ayrı hücreleri zamana bağlı olarak programlı hücre ölümüne yönlendirdikleri ancak kombinasyon grubunda ise ilave

(additive) veya sinerjistik bir yönlendirme olmadığı gözükmektedir. Buradan her iki ilacın etki yollarının kısmen farklı olması inkübasyon sırasında birbirleriyle yarışmalı olarak tetiklemediklerini göstermektedir. Yapılan istatistiksel değerlendirmede Lityum klorür grubu hücrelerinde kombinasyon grubuna oranla 24 saatte anlamlı bir artış ($p<0,01$) olurken 72 saate fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Karboplatin ve Lityum klorür grubu hücreleri kontrol grubu hücrelerine oranla programlı hücre ölüm oranlarını anlamlı ($p<0,01$) artmışlardır. Bu sonuçlar literatürle uyumluluk göstermektedir (56, 60). Kombinasyon grubu ile karşılaştırıldığında 24 ve 72 saatlerde saptanan fark anlamlı bulunmuştur. Karboplatin grubu tek başına kombinasyon grubuna oranla daha fazla programlı hücre ölümüne yönlendirmiş olması hangi moleküler temelde yaptığına dair yeterli bilgi bulunmamaktadır. Belkide Lityum klorür'ün nöro-protetif etkisi (62, 63) dikkate alındığında kombinasyon grubu hücrelerinde görülen azalmanın temeli anlaşılır hale gelmektedir.

Programlı hücre ölümünün hücresel düzeyde saptanmasında en güvenilir metodlardan biri elektron mikroskopik değerlendirmelerdir. Bizim çalışmamızda Kontrol grubu sferoidlerin elektron mikroskopik incelenmesinde; nukleus ve hücre membranlarının intakt olduğu sferoid bütünlüğünü sağlayan ve özellikle sferoidlerin proliferasyon bölgesi hücreleri arasında bol miktarda bulunan dezmozomların bulunduğu görülmektedir (Şekil 4-6). Ek olarak hücrelerin sferoid dışına doğru ve hücreler arası boş alanlara doğrudüzgün mikrovillus yapılarının uzandığı görülmektedir (Şekil 4-7). Karboplatin uygulanmış sferoidlerde; sferoid morfolojisi bozulmuş, hücreler arası açıklıklar belirginleşmiş, hücrelerde belirgin otofajik vakuol oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 4-8). Lityum klorür uygulanmış sferoidlerde; sferoid periferinde yer alan hücrelerde belirgin mikrovillus kaybı yanında belirgin ve sayıca artmış otofajik vakuol oluşumu gözlemlendi (Şekil 4-9). Ayrıca bu grup sferoidlerde hücreler arası alanlarda yerleşmiş çok sayıda apoptotik cisim oluşumu gözlemlendi (Şekil 4-10). Kombinasyon grubu sferoidlerde hücrelerde otofajik vakuol oluşumu yanında hücrelerarası alanlarda Lityum klorür grubuna benzer şekilde apoptotik cisimlerin yer aldığı ayrıca sferoid bütünlüğünün bozulması yanında hücresel düzeyde litik sitoplazmik değişikliklerin olduğu gözlemlendi (Şekil 4-11, Şekil 4-12).

Çalışmamızın bulguları bütünlük içerisinde değerlendirildiğinde deneyin kurgulanışı bakımında Karboplatin ve Lityum klorür'ün terapotik amaçlı hem iki

boyutlu kültür modellerinde hem de sferoid modelde anlamlı bir sitotoksosite gösterdiği, iki ve üç boyutlu kültürlerden elde edilen sonuçların çalışmamızda birbirlerini desteklediği görülmektedir. Üç boyutlu sferoidlerde yapısal ve moleküler işleyişin iki boyutlu kültürlerle oranla farklı olmasına rağmen ve bu iki maddenin hücresel etki yollarını farklı sinyal mekanizmalarıyla gerçekleştirdiği dikkate alındığında sonuçlar itibarı ile sinerjistik artmış inhibitör etkinin görülmesi tümörün geriletilmesinde, büyümesinin azaltılmasında veya tamamen durdurulmasında etkin ve güvenilir yeni bir model oluşturabileceği görülmektedir.

Endometrial kanser tedavisinin planlanmasında in-vitro kültür modellerinde ve özellikle 3 boyutlu sferoid kültürlerinden yararlanılabilir. Etki düzeylerinin ayrıntılı olarak saptanması için moleküler ve genetik düzeyde yeni araştırma yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Sonuçlar;

- 1) Karboplatin Ishikawa Endometrium hücrelerinde zamana bağlı olarak etkin bir sitotoksik etkiye sahiptir.
- 2) Lityum klorür Ishikawa hücrelerinde antineoplastik olan Karboplatin kadar etkin bir sitotoksosite göstermiştir.
- 3) Her iki ilacın birlikte kullanımı hücreler üzerinde çok daha etkin sitotoksik etki göstermektedir.
- 4) Her iki ilacın birlikte kullanımı ile değerlendirme yapılırken iki ve üç boyutlu kültür verileri dikkate alınarak değerlendirilmelidir.
- 5) Endometrial kanserlerin üzerine ilave sitotoksitenin değerlendirilmesinde popülasyon kinetik verilerinin önemli bir yer tutması yanında kabul görülen morfolojik ve FCM verilerinden de yararlanılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Boring CC, Squires TS, Tong T. Cancer statistics. (1993). *CA Cancer J Clin*, **43**:7.
2. Pallares J, Llobet D, Santacana M, Eritja N, Velasco A, Cuevas D, Lopez S, Palomar-Asenjo V, Yeramian A, Dolcet X, Matias-Guiu X. (2009). CK2beta is expressed in endometrial carcinoma and has a role in apoptosis resistance and cell proliferation. *The American Journal of Pathology*, **174**(1):287-96.
3. Park HM, Lee SS, Eom DW, Kang GH, Yi SW, Sohn WS. (2009). Endometrioid adenocarcinoma arising from endometriosis of the uterine cervix: a case report. *Korean Med. Sci.*, **24**:767-71.
4. Naciff JM, Khambatta ZS, Thomason RG, Carr GJ, Tiesman JP, Singleton DW, Khan SA, Daston GP. (2009). The genomic response of a human uterine endometrial adenocarcinoma cell line to 17alpha-ethynyl estradiol. *Toxicological Sciences*, **107**(1), 40-55.
5. Chen HH, Chen TW, Lin H. (2010). Pravastatin Attenuates Carboplatin-Induced Nephrotoxicity in Rodents via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha Regulated Heme Oxygenase-1. *Molecular pharmacology*, **10**:1124/mol.109.061101.
6. Yuh YJ, Lee HR, Kim SR. (2008). Gemcitabine and Carboplatin Combination Chemotherapy for Elderly Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer: A Feasibility Study. *Cancer Res Treat.*; **40**(3):116-120 2003.
7. Zagouri F, Bozas G, Kafantari E, Tsiatas M, Nikitas N, Dimopoulos MA. (2009). Endometrial cancer: what is new in adjuvant and molecularly targeted therapy? *Hindawi Publishing Corporation Obstetrics and Gynecology International*, Volume 2010, Article ID **749579**, 11.
8. Unger FT, Klasen HA, Tchartchian G, de Wilde RL, Witte I. (2009). DNA damage induced by cis- and carboplatin as indicator for in vitro sensitivity of ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer*, **9**:359.
9. Shorter E. (2009). The history of lithium therapy. *Bipolar Disorders*, **11** (2): 4-9.
10. Sahebgharani M, Nejati M, Sepehrizadeh Z, Khorramizadeh MR, Bahrololomi-Shapourabadi M, Hashemi-Bozchlou S, Esmaeili J, Khansari M G. (2008) Lithium

Chloride protects PC12 pheochromocytoma cell line from morphine-induced apoptosis. *Arch Iran Med* ,**11(6)**:639-648.

11. Nowicki MO, Dmitrieva N, Stein AM, Cutter JL, Godlewski J, Saeki Y, Nita M, Berens M E, Sander L M, Newton H B, Chiocca E A, Lawler S. (2008). Lithium inhibits invasion of glycogen synthase kinase-3. *Neuro oncology* **10**, 2008 690-699 doc. D07-00194
12. Danford AJ, Wang D, Wang Q, Tullius TD, Lippard SJ.(2005). Platinum anticancer drug damage enforces a particular rotational setting of DNA in nucleosomes. *PNAS* 2005,vol. **102**, no. 35 12311–12316.
13. Jope R.S. ve Martinez A. (2006). Lithium, the seminal gsk-3 inhibitor Castro A, Medina M. (Ed.) Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) and its inhibitors Drug Discovery and Development. *Wiley* **125-136**.
14. Bilir A., Erguven M., Yazihan N., Aktaş E., Oktem G., Sabancı A. (2010). Enhancement of vinorelbine-induced cytotoxicity and apoptosis by clomipramine and lithium chloride in human neuroblastoma cancer cell line SH-SY5Y. *J Neurooncology* 2010, epub ahead.
15. Wada A. J. (2009). Lithium and neuropsychiatric therapeutics: neuroplasticity via glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and neurotrophin cascades. *Pharmacol Sci.* **110**,14-28.
16. Mann L, Heldman E, Shaltiel G, Belmaker RH, Agam G. (2008). Lithium preferentially inhibits adenylyl cyclase V and VII isoforms. *International journal of Neuropsychopharmacolgy.* **11**,533-539.
17. Serretti A, Drago A, De Ronchi D. (2009). Lithium pharmacodynamics and pharmacogenetics: focus on inositol mono phosphatase (IMPase), inositol poliphosphatase (IPPase) and glycogen sinthase kinase 3 beta (GSK-3 beta). *Curr Med. Chem.* **16(15)**:1917-48.
18. Nishida M. (2002). The Ishikawa cells from birth to the present. *Hum Cell.* **15(3)**:104-17.
19. Heneweer C, Schmidt M, Denker HW, Thie M. (2005). Molecular mechanisms in uterine epithelium during trophoblast binding: the role of small GTPase RhoA in

- human uterine Ishikawa cells. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction* 2:4 doi: **10.1186/1743-1050-2-4**
20. Abraham L. Kierszenbaum. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Çeviri Editörü: Ramazan Demir.
 21. Chang SJ, Wang TY, Tsai CY, Hu TF, Chang MD, Wang HW. (2009). Increased epithelial stem cells traits in advanced endometrial endometrioid carcinoma. *BMC Genomics*, **10:613** doi: 10.1186/1471-2164/10/613.
 22. Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki H, Jones MW. (2000) Immunohistochemical profile of endometrial adenocarcinoma: A study of 61 cases and review of the literature. *Mod Pathol*. **13(4)**:379-88.
 23. Purdie DM, Green AC. (2001). Epidemiology of endometrial cancer. *Best Pract Res Clin*, **15:3**, pp. 341-354.
 24. Chaudhry P, Asselin E.(2009). Resistance to chemotherapy and hormone therapy in endometrial cancer. *Endocrine-Related Cancer*. **16** 363-380
 25. Song J, Rutherford T, Naftolin F, Brown S & Mor G. (2002). Hormonal regulation of apoptosis and the Fas and Fasligand system in human endometrial cells. *Molecular Human Reproduction*, **8 (5)**pp. 477-455.
 26. Atasoy P, Bozdogan O, Erekul S, Bozdogan N & Bayram M. (2003). Fas-mediated pathway and apoptosis in normal,hyperplastic, and neoplastic endometrium. *GynecologicOncology* **91** 309–317.
 27. Danial NN & Korsmeyer SJ. (2004). Cell death: critical controlpoints. *Cell* **116** 205–219.
 28. Puthalakath H & Strasser A. (2002). Keeping killers on a tightleash: transcriptional and post-translational control of thepro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death and differantiation*, **9**, 505-512.
 29. Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. (2006). A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immunity & Ageing*, **19;3**:5.
 30. Vogelstein B, Lane D & Levine AJ. (2000). Surfing the p53network. *Nature* **408** 307–310.

31. Li J, Feng Q, Kim JM, Schneiderman D, Liston P, Li M, Vanderhyden B, Faught W, Fung MF, Senterman M, Kournaluk G R, Tsang B K. (2001). Human ovarian cancer and cisplatin resistance: Possible Role of Inhibitor of Apoptosis Proteins. *Endocrinology*, **142**: 1
32. Qin LF & Ng IO. (2002). Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells. *Cancer Letters*, **175**(2002) 27-38
33. Milner BJ, Allan LA, Eccles DM, Kitchener HC, Leonard RC, Kelly KF, Parkin DE & Haites NE. (1993). p53 mutation is a common genetic event in ovarian carcinoma. *Cancer Res.* **53**: 2128-2132.
34. Saffari B, Hong DC, Sullivan-Halley J, Runnebaum IB, Grill HJ, Jones LA, El-Naggar A, Press MF. Association of p53 mutations and a codon 72 single nucleotide polymorphism with lower overall survival and responsiveness to adjuvant radiotherapy in endometrioid endometrial carcinomas. *Int J Gynecol Cancer*. **15**(5):952-63.
35. Burgering BM & Coffey PJ, Ito H. (1995). Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* **376** 599–602.
36. Osaki M, Oshimura M, Ito H. (2004). PI3K-Akt Pathway: Its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* **2004**; **9**: 667-676,
37. Vivanco I., Sawyers C. L. (2002). The Phosphatidylinositol 3-Kinase–Akt Pathway In Human cancer. *Nature Reviews Cancer*. **489-501**.
38. West K. A., Castillo S.S., Dennis P. A. (2002). Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resistance Updates*, **234-248**, 2002
39. Toker A., Lerner M. Y. (2006). Akt Signaling and Cancer: Surviving but not Moving On. *Cancer Res* **66**: (8).
40. Kapucuoglu N, Aktepe F, Kaya H, Bircan S, Karahan N & Ciris M. (2007). Immunohistochemical expression of PTEN in normal, hyperplastic and malignant endometrium and its correlation with hormone receptors, bcl-2, bax, and apoptotic index. *Pathology, Research and Practice* **203**: 153–162.

41. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Sato S, Akeshima R & Terakawa N. (2001). Correlation between loss of PTEN expression and Akt Phosphorylation in Endometrial Carcinoma. *Clin Cancer Res*, **7**:892-895
42. Marther JP, Roberts PE. (1998). Introduction to cell and tissue culture, theory and technique.
Eriřim03.11.2010,[http://books.google.com.tr/books?id=ClAN2x4cRQC&pg=PA163&lpg=PA163&dq=Marther+JP,+Roberts+PE\(1998\)+introduction+to+cell+and+tissue+culture&source=bl&ots=Z7JH9XCEMS&sig=6HFp_s3vLfDQGtK27Hk65x0gg&hl=tr&ei=KjrATIjQh5azBtjgsJ8I&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBUQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.tr/books?id=ClAN2x4cRQC&pg=PA163&lpg=PA163&dq=Marther+JP,+Roberts+PE(1998)+introduction+to+cell+and+tissue+culture&source=bl&ots=Z7JH9XCEMS&sig=6HFp_s3vLfDQGtK27Hk65x0gg&hl=tr&ei=KjrATIjQh5azBtjgsJ8I&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CBUQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false)
43. Friedrich J, Ebner R, Kunz-Schughart L A. (2007). Experimental anti-tumor therapy in 3-d: spheroids--old hat or new challenge? *Int J Radiat Biol*. Vol.83(**11-12**):849-71.
44. Pickl M, Ries CH.(2008). Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene*.**28**(3):461-8.
45. Casey R. M., Burleson K M, Skubitz K M, Pambuccian S E, Oegema T R, Ruff L E, Skubitz P N.(2001). β 1- Integrins Regulate the Formation And Adhesion of Ovarian Carcinoma Multicellular Spheroids. *American journal of pathology*, **159**:6
46. Quiroz J A, Gould T D, Manji H K. (2004). Molecular effects of lithium. *Molecular interventions*, **4**:5
47. King TD, Song L, Jope RS. (2006). AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Activating Agents Cause Dephosphorylation of Akt and Glycogen Synthase Kinase-3. *Biochem Pharmacol*, **71**(11):1637-1647.
48. Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci*, **93**:8455-8459.
49. Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J ve ark. (1997) Activation of the Wnt signaling pathway: A molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol*, **185**:82-91.

50. Stambolic V, Ruel LR, Woodgett JR ve ark. (1997) Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 activity and mimics wingless signaling in intact cells. *Curr Biol*, **6:1664-1668**.
51. Yıldız A. ve Tunca Z. (2001). Duygudurum Düzenleyici İki İlaç Lityum ve Valproatın Etki Mekanizmalarına İlişkin Bulgular. *Türk psikiyatri dergisi*, **12(2)**: 147-155
52. Khaitan D, Chandna S, Arya MB, Dwarakanath BS. (2006). Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *Journal of Translational Medicine*, **2;4:12**.
53. Santini T. M. ve Rainaldi G. (1999). Three-Dimensional Spheroid Model in Tumor Biology. *Pathobiology*, **67:148-157**.
54. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK (2002). Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng*. **20;83(2):173-80**.
55. Hoekstra AV, Ward EC, Hardt JL, Lurain JR, Singh DK, Buttin BM, Schink JC, Kim JJ. (2008). Chemosensitization of endometrial cancer cells through Akt inhibition involves FOXO1. *Gynecol Oncol*. **108(3):609-18**.
56. Lang DS, Droemann D, Schultz H, Branscheid D, Martin C, Ressmeyer AR, Zabel P, Vollmer E, Goldmann T. (2007) A novel ex vivo model for the analysis of molecular events during lung cancer chemotherapy. *Respir Res*. **14;8:43**.
57. Silva AK, Yi H, Hayes SH, Seigel GM, Hackam AS. (2010). Lithium chloride regulates the proliferation of stem-like cells in retinoblastoma cell lines: a potential role for the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Vis*. **13;16:36-45**.
58. Zhu Q, Yang J, Han S, Liu J, Holzbeierlein J, Thrasher JB, Li B. (2011). Suppression of glycogen synthase kinase 3 activity reduces tumor growth of prostate cancer in vivo. *Prostate*. **1;71(8):835-45**.
59. Sun A, Shanmugam I, Song J, Terranova PF, Thrasher JB, Li B (2007). .Lithium Supresses cell proliferation by interrupting E2F-DNA interaction and Subsequently reducing S-phase gene expression in prostate cancer. *Prostate*. **15;67(9):976-88**.

60. Sahebgharani M, Nejati M, Sepehrizadeh Z, Khorramizadeh MR, Bahrololoumi-Shapourabadi M, Hashemi-Bozchlou S, Esmaili J, Ghazi-Khansari M (2008). Lithium chloride protects PC12 Pheocromocytoma cell line from Morphine-induced Apoptosis. *Arch Iran Med.* **11(6)**:639-48.
61. Wang JS, Wang CL, Wen JF, Wang YJ, Hu YB, Ren HZ. (2008). Lithium inhibits proliferation of human esophageal cancer cell line Eca-109 by inducing a G2/M cell cycle arrest. *World J Gastroenterol.* **7;14(25)**:3982-9.
62. Chen RW, Chuang DM. (1999). Long term lithium treatment suppressed p53 and Bax expression but increases Bcl-2 expression. A prominent role in neuroprotection against excitotoxicity. *J Biol Chem.* **5;274(10)**:6039-42.
63. Nonaka S, Katsube N, Chuang DM. (1998). Lithium protects rat cerebellar granule cells against apoptosis induced by anticonvulsants, phenytoin and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther.* **286(1)**:539-47.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Mert	Soyadı	Şenyürek
Doğ. Yeri	Adana	Doğ. Tar.	18/08/1987
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	20608072476
Email	senyurekmert@hotmail.com	Tel	05372631020

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2011
Lisans	Uludağ Üni. Fen Fakültesi- Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Seyhan Ahmet Kurttepelı Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	52,5	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) ALES Puanı	81,1	74,1	66,2

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Programları (Word, Excel, Power point)	İyi seviye

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Müzik, Bateria, Futbol, Basketbol.